

03072 ³ 2eje.

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

"Sobreproducción de la enzima beta-galactosidasa de *Escherichia coli*
en *Bacillus subtilis*"

*Trabajo de Tesis que para obtener el grado de Maestro en
Biotecnología presenta:*

Q. F. B. VICTOR MARTIN BOLAÑOS GARCIA

Instituto de Biotecnología-UNAM.

Cuernavaca, Morelos. 1994.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I) RESUMEN

II) INTRODUCCION

III) OBJETIVOS

IV) CONCEPTOS FUNDAMENTALES

3.1) Características generales de *Bacillus subtilis*.

3.2) Características generales de la enzima beta-galactosidasa.

V) METODOLOGIA

VI) RESULTADOS EXPERIMENTALES

6.1) Construcción de los Sistemas de Expresión.

6.2) Resultados para cepas esporogénicas.

6.3) Resultados para cepas *spo0A9V*.

6.4) Formulación y cinéticas en medio químicamente definido.

VII) DISCUSION GENERAL DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

PERSPECTIVAS.

AGRADECIMIENTOS.

REFERENCIAS

RESUMEN

Debido a las características de la enzima beta-galactosidasa de *Escherichia coli*, que la hacen única entre las lactasas conocidas, existe interés por producirla a escala industrial. Sin embargo, dado que *E. coli* no es un microorganismo generalmente reconocido como seguro (esto es, grado GRAS según la Food and Drug Administration de EUA) esto no se lleva a cabo con esta bacteria. A diferencia de *E. coli*, *Bacillus subtilis* sí se considera grado GRAS y existe mucha experiencia en su uso a nivel industrial. Por estas razones en el presente trabajo se integró el gene *lacZ* -que codifica para la enzima beta-galactosidasa- proveniente de *Escherichia coli* en el cromosoma de diferentes cepas mutantes de *Bacillus subtilis*.

Para lograrlo, inicialmente fue construido un plásmido de integración en el cromosoma de *B. subtilis* y que denominamos paprlac2. Este plásmido posee las regiones del promotor y señales de regulación del gene *aprE* (que codifica para la proteasa subtilisina), haciendo la construcción de tal manera que el gene *lacZ* clonado ha quedado bajo control de las mismas señales que regulan al gene *aprE*.

Posteriormente, el plásmido paprlac2 se utilizó para integración al cromosoma de cepas de *B. subtilis* con diferentes fondos genéticos y estimar la producción de beta-galactosidasa en fermentaciones tipo lote a nivel de matraz y fermentador con medio complejo.

Las cepas utilizadas fueron también aquí construidas. De ellas, la denominada BB804 fue la mejor productora de beta-galactosidasa.

Finalmente, se diseñó un medio de composición química definida. Este medio fue luego utilizado para fermentaciones tipo lote con la cepa BB804 a nivel de matraz y fermentador con vaso de 4 L. La productividad de beta-galactosidasa con esta cepa y en las condiciones que se describen fue poco más de seis veces mayor que la reportada para un proceso totalmente optimizado que emplea *K. fragilis* el cual fue realizado en este mismo Instituto.

II. INTRODUCCION

La enzima beta-galactosidasa es una enzima que lleva a cabo la reacción de hidrólisis del disacárido lactosa. La beta-galactosidasa de *Escherichia coli* es una enzima cuyas propiedades únicas, como el pH óptimo de actividad, termoestabilidad y temperatura óptima, la hacen muy atractiva desde el punto de vista industrial. De aquí el interés por lograr su producción a escala comercial. sin embargo, a la fecha la producción de esta enzima no se hace a partir de *E. coli* ya que este no es un microorganismo GRAS. A diferencia de *E. coli*, *Bacillus subtilis* es generalmente reconocido como seguro desde hace más de 20 años por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica y hasta la fecha es muy empleado en la producción industrial de enzimas recombinantes por lo que los procesos fermentativos para este microorganismo están bien caracterizados. *B. subtilis* posee además un sistema de excreción eficiente. Este hecho es importante porque los productos biotecnológicos extracelulares disminuyen los costos de producción y mejoran los rendimientos en las operaciones de recuperación respecto a enzimas que son producidas y mantenidas dentro de la célula. Adicionalmente, *Bacillus subtilis* es un microorganismo bien conocido a nivel molecular y actualmente se está secuenciando su genoma lo que sin duda vuelve más atractivo su empleo en procesos biotecnológicos. Por las razones anteriores decidimos transferir y expresar el gene de la beta-galactosidasa de *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*.

Al mismo tiempo que la sobreproducción de la enzima beta-galactosidasa de *E. coli* en *Bacillus subtilis* resulta interesante desde un punto de vista industrial, el uso de ella permite estudiar y entender mejor aspectos importantes de la regulación genética en este microorganismo a nivel molecular. Esto último gracias a que los métodos donde se utilizan proteínas de fusión comunmente emplean el gene *lacZ* (que codifica para la enzima beta-galactosidasa) en virtud de que el ensayo es sencillo, reproducible y existe mucha literatura contra la cual comparar resultados.

Así entonces este trabajo atiende ambos aspectos que de ninguna manera están desvinculados: por un lado comprender más acerca de la regulación genética en *Bacillus subtilis* y por otro sobreproducir la beta-galactosidasa, lo que podría ser atractivo desde un punto de vista industrial.

III. OBJETIVOS

Objetivo General: Sobreproducir la enzima beta-galactosidasa de *Escherichia coli* en cepas mutantes de *Bacillus subtilis*.

Objetivos Particulares:

- Clonar el gene *lacZ* proveniente de *E. coli* e integrarlo al cromosoma de *B. subtilis* de modo que quede bajo control del promotor y las señales de regulación del gene *aprE* el cual codifica para la proteasa subtilisina.
- Utilizando diferente fondos genéticos, construir mutantes en genes involucrados en la regulación de la expresión del gene *aprE* y evaluar cómo afectan la producción de beta-galactosidasa.
- Realizar estimaciones de las cepas construídas a nivel de matraces y/o en fermentadores de 4L en medio complejo y en medios químicamente definidos.

IV. CONCEPTOS FUNDAMENTALES

4.1) Características Generales de *Bacillus subtilis*.

4. 1.1.) Taxonomía y aspectos fisiológicos más importantes.

Bacillus subtilis es una eubacteria ampliamente distribuida geográficamente que habita principalmente en el suelo aunque también se le halla en ríos y estuarios (Priest, 1989). Las bacterias del género *Bacillus* son aeróbicas, grampositivas, su morfología microscópica consiste en barras y son formadoras de endoesporas. Actualmente hay 65 especies validadas descritas (Claus y Fritze, 1989) pero éstas muestran una alta heterogeneidad. Mediante estudios taxonómicos basados en la subunidad 16s del ARN ribosomal (Priest, et al., 1981; Ash, et al., 1991) se ha considerado más apropiado dividir al género en 4 ó 5 subgéneros. El criterio que considera al porcentaje de GC es menos preciso: oscila de un 36 hasta un 60% (Harwood, 1992). Hasta el momento se siguen buscando criterios taxonómicos más precisos y uno reciente consiste en clasificar con base en el contenido de lípidos de la membrana plasmática. *B. subtilis* es una bacteria grado GRAS (Generalmente Reconocida Como Segura) por la FDA de los EUA por considerarse no potencialmente patógeno en gran parte debido a que no posee lipopolisacáridos sobre su superficie celular (Sietske, et al., 1991); posee un sistema natural de excreción muy eficiente y actualmente se está secuenciando su genoma completo (Kunst y Devine, 1991). Un factor importante a considerar para producir proteínas homólogas y heterólogas en este microorganismo es la presencia de proteasas intra y extracelulares que pueden rápidamente degradar los productos expresados (Coxon, et al., 1991; Wu, et al., 1991). No obstante lo anterior, esta bacteria se reporta un gran número de veces en la literatura para la producción de proteínas recombinantes (Zukowski, 1992).

4.1.2.) Proteasas de *Bacillus subtilis*.

Para propósitos prácticos la presencia de proteasas ha hecho difícil el uso de *Bacillus subtilis* como sistema hospedero para expresar y secretar proteínas foráneas al medio de crecimiento. Si bien la presencia de tres proteasas extracelulares relativamente mayoritarias se conoce desde hace muchos años, se sabe ahora también de la existencia de proteasas minoritarias las cuales parecen ser muy activas y pueden atacar a proteínas eucarióticas muy efectivamente (He, et al., 1991). Actualmente se conocen siete proteasas en *Bacillus subtilis* las cuales caen dentro de dos grandes categorías: las serinproteasas (que comprende a las proteasas AprE o subtilisina, Epr, Bpf, Isp-1 e Isp-2) y las metaloproteasas (que incluye a las proteasas NprE o proteasa neutra y Mpr). Hasta el momento sólo el gene que codifica para la proteasa Isp-2 no ha sido clonado ni secuenciado. Todas las proteasas conocidas son expresadas principalmente durante el inicio de la fase estacionaria y, al igual que sucede para otras enzimas degradativas, se conoce que están bajo control de la misma familia de genes reguladores. Respecto al papel fisiológico de las proteasas, el panorama no está del todo claro aún. Se ha postulado que las proteasas extracelulares juegan un papel en la esporulación (Priest, 1977), en la regulación del intercambio de la pared celular (Jolliffe, et al., 1980) y la eliminación de enzimas (Priest, 1977). A su vez, las proteasas intracelulares se ha sugerido que funcionan en el procesamiento de proteínas

y su recambio, ambos eventos importantes previos a la esporulación (Maurizi y Switzer, 1980; Switzer, 1977). No obstante el reciente avance, la elucidación de genes codificadores para proteasas permanece como un reto para los biólogos moleculares que trabajan con *Bacillus* pues resulta muy interesante y sorprendente a la vez que existan un gran número de genes codificando para estas proteasas y la compleja forma en que su expresión está regulada (Valle y Ferrari, 1989). Dado que la delección de genes codificadores para proteasas no parecen afectar el crecimiento ni la esporulación, estos genes parecen no ser esenciales. Sin embargo queda como paradigma elucidar por qué entonces se encuentran proteasas en gran número, la manera cuidadosa en que su expresión está regulada en la naturaleza y cómo el organismo ha logrado que la pérdida de una o más proteasas no afecte apreciablemente la fisiología celular.

4.1.3.) Reguladores del estado de transición.

Cuando una célula microbiana agota alguno o todos sus nutrientes disponibles durante su crecimiento y comienza a entrar a fase estacionaria, ciertos factores de estrés aparecen. En los bacilos así como en algunas otras bacterias, hongos y eucariotes inferiores, una respuesta a dicho estrés acumulado es la formación de una spora latente. En adición a aquellas proteínas necesarias para la iniciación de este complejo programa de desarrollo, ciertas nuevas proteínas, las cuales no son necesarias para la esporulación, son también sintetizadas en este momento. Muchas de estas proteínas son enzimas degradativas las cuales aparentemente son un intento de parte de la célula para sondear todas las fuentes disponibles de energía y metabolitos en el medio circundante. Además de la síntesis de estas enzimas degradativas, tales como levansacarasa, alfa-amilasa y las diferentes proteasas, algunas otras funciones son expresadas a este tiempo en *Bacillus subtilis* e incluyen el desarrollo de competencia para la asimilación de moléculas de ADN, la producción de antibióticos, la síntesis de flagelos y la inducción total del ciclo de Krebs (el cual normalmente no puede funcionar completamente durante el crecimiento vegetativo de este microorganismo). Se conocen al menos nueve genes, *abrB*, *hpr*, *sin*, *degU*, *degS*, *degR*, *degQ*, *senS* y *pai* que tienen efectos pleiotrópicos sobre la síntesis de muchas de estas proteínas. Debido a que dichos genes reguladores controlan funciones que son expresadas durante el estado de transición entre el crecimiento vegetativo y el encendido de la fase estacionaria y esporulación, se ha acuñado el término reguladores del estado de transición para describirlos (Perego, et al., 1988).

Si bien ninguna de las mutaciones conocidas en estos reguladores del estado de transición conduce a un defecto significativo en la esporulación, hay evidencia de que algunos de ellos están bajo el control de genes esenciales para la esporulación aunque también llegan a ejercer un control sobre algunos otros. Esto es, los controles de la síntesis de enzimas degradativas y otros procesos del estado de transición solapan con la red reguladora específica para la esporulación y pueden ser, de hecho, una parte de ella. Con objeto de comprender completamente cómo operan estos reguladores y cómo ellos son integrados con la vía de esporulación, se ha vuelto necesario definir las funciones bioquímicas de los productos de los genes reguladores y como interactúan uno con otro. Dado que la mayoría de los reguladores del estado de transición arriba mencionados se conoce que afectan la expresión del gene de subtilisina (*aprE*) y debido a que

el promotor y señales de regulación de este gene se utilizan en el presente trabajo, la atención se centrará aquí sobre aspectos de este control para describir las complejas interacciones regulatorias que están involucradas en la expresión genética postexponencial.

4.1.3.1) La proteína AbrB.

El gene *abrB* fue primero identificado por mutaciones que, si bien no compensaban los defectos en la esporulación, podían superar muchos de los otros efectos de las mutaciones *spo0* (Trowsdale, et al., 1979). El gene *abrB* no sólo afecta al gene de subtilisina *aprE* sino que también afecta la transcripción de una variedad de genes incluyendo *tycA* (Marahiel, et al., 1987), *hpr*, el mismo *abrB* (Strauch, et al., 1989a, b) y al menos dos genes necesarios para la esporulación normal: *spoVG* (FürbaB, et al., 1991) y *spo0E* (Strauch, et al., 1989a). Basados en estos estudios se ha sugerido (Perego, et al., 1988) que la proteína AbrB funciona como un regulador de la transcripción ambiaactivo -con efectos positivos y negativos- sobre ciertos genes que son expresados durante el estado de transición. AbrB puede ser un represor clásico de sólo algunos de los genes que controla y en el caso de su acción sobre el gene *aprE*, el control de este parece ser normal en una mutante *abrB*. El gene *abrB* codifica para una proteína de peso molecular 10,500 Da (FürbaB y Marahiel, 1991) siendo la proteína nativa un hexámero de estas subunidades (Strauch, et al., 1989b). Mediante estudios de unión de AbrB al ADN se ha sugerido que la proteína puede interferir de alguna manera con la interacción entre la ARN polimerasa y los promotores que afecta (Robertson, et al., 1989). A pesar de intensas búsquedas, no ha podido detectarse alguna secuencia definida como sitio consenso para la unión de AbrB. Mientras que cada una de las regiones protegidas es relativamente rica en AT, se cree ahora que la unión sucede sobre una estructura secundaria específica del ADN y que dicha estructura reconocida puede ser asumida por una variedad de secuencias de bases. En apoyo a lo anterior se ha encontrado, mediante experimentos de protección por metilación de residuos de guanina, que todas las del sitio de unión para AbrB se encuentran sobre una cara de la hélice de ADN (Strauch, et al., 1989a). También se ha mostrado que AbrB actúa como autoregulador y que está sujeto a represión por la proteína Spo0A siendo que la autoregulación ocurre principalmente durante el crecimiento vegetativo y la represión por Spo0A se da al inicio del estado de transición. También se ha señalado un efecto regulador positivo de AbrB sobre el gene *hpr*. Sin embargo no hay evidencia concluyente sobre la unión de la proteína sobre el sitio promotor de *hpr*. Esto puede deberse a que AbrB unida a promotores que activa es intrínsecamente distinta de la unida a promotores que reprime; alternativamente AbrB puede activar al gene *hpr* por algún modo indirecto.

4.1.3.2.) La proteína Hpr.

El locus *hpr* fue definido originalmente por mutaciones que causaban sobreproducción de las proteasas neutra y subtilisina (Higerd, et al., 1972). El gene *hpr* ha sido clonado y secuenciado y la proteína purificada a homogeneidad. Mediante experimentos de protección con ADNasa I se ha encontrado que Hpr se une a cuatro regiones separadas, dos sitios muy cercanos

al promotor de subtilisina y otros dos sitios en la región que lo precede, aproximadamente 200 pb hacia arriba. Dos de estos sitios están localizados muy cerca uno del otro y muy lejos del promotor: -324 a -295 y -292 a -267. Los otros dos sitios están también cercanos uno del otro pero localizados muy cerca y solapando con el promotor: -79 a -59 y -35 a -14. El examen de todas las regiones protegidas ha revelado lo que parece ser la secuencia consenso de Hpr: ATANTATT. Estos resultados también revelan que el sitio de unión de Hpr de -35 a -14 está ubicado completamente dentro de la región a la cual se une la proteína AbrB (-59 a +15). Por la técnica de footprint y en experimentos donde se mezclan Hpr y AbrB, al parecer ambas moléculas se unen. Sin embargo, dado que se analiza siempre una población, es imposible determinar si Hpr y AbrB pueden enlazarse simultáneamente sobre la misma molécula de ADN. La presencia de dos series de sitios de unión de Hpr separados por distancias relativamente grandes (183 pb) posibilita que Hpr pudiera funcionar a través de la formación de una horquilla y la represión ocurra por la existencia de esta estructura. La regulación a través de la formación de horquillas se ha reportado en otros sistemas procarionóticos complejos, tales como el operón de arabinosa (Lee y Schlieff, 1989) y el operón de lactosa (Oehler, et al., 1990). Si bien Hpr es claramente un regulador negativo de subtilisina, este no es un represor clásico ya que en su ausencia la subtilisina no es expresada constitutivamente. En una mutante *hpr* la velocidad de expresión de subtilisina es incrementada notablemente pero queda sujeta aún a los controles temporales normales y es expresada sólo al final del crecimiento vegetativo. Hablando en particular de la mutación *hpr2*, ésta consiste en la delección de 359 pb del gene estructural, lo cual equivale a poco más del 65% de su extensión total (Perego y Hoch, 1988). Los genes *nprE* y *aprE* pueden no ser los únicos regulados por la proteína Hpr. El gene *hpr* ha sido implicado en el fenómeno de represión de la esporulación por glucosa (Dod y Balassa, 1978; Ito y Spizizen, 1973) y cuando está presente sobre un plásmido multicopia inhibe la esporulación (Perego y Hoch, 1988).

4.1.3.3.) La proteína Sin.

El gene *sin* fue aislado primero de un fragmento del cromosoma de *Bacillus subtilis* el cual, estando en alto número de copias en plásmidos, causaba una inhibición de la esporulación y la producción de proteasas extracelulares (Gaur, et al., 1986). El gene *sin* es parte de un operón dicistrónico y está precedido por un gene pequeño (ORF1, 57 aminoácidos) el cual codifica para la proteína sinI. Esta proteína actúa como antagonista de Sin compitiendo por su sitio de unión en el gene *aprE* (Bai, et al., 1993). Este operón es transcrito por tres diferentes promotores: dos transcriben ambos genes, mientras que uno transcribe sólo el gene *sin* y los dos genes parecen estar regulados diferentemente (Gaur, et al., 1988). La expresión de ORF1 se incrementa al final del crecimiento vegetativo y requiere las proteínas Spo0A y Spo0H. Sin embargo, el gene *sin* se expresa a bajo nivel de manera relativamente constante durante el crecimiento y la esporulación y es independiente de los genes *spo0A* y *spo0H*. Se cree que un mecanismo importante de regulación ocurre a nivel postranscripcional (Gaur, et al., 1988). La inactivación del gene *sin* en el cromosoma conduce a la pérdida de la capacidad para desarrollar competencia y movilidad. La proteína Sin purificada protege de la acción de ADNasa I secuencias de -263 a -216 relativas al punto de inicio de la transcripción de *aprE*. Esta región

está localizada adyacente a e inmediatamente hacia abajo (downstream) de una región a la cual se une la proteína Hpr (-292 a -265). Parece improbable que Sin antagonice la regulación ejercida por Hpr y viceversa. Al menos parecen actuar independientemente para reprimir la expresión de *aprE*; sin embargo, es probable que ellas puedan actuar de manera sinérgica.

4.1.3.4.). Las proteína Deg.

Mientras que AbrB, Hpr y Sin ejercen un efecto negativo sobre la expresión de subtilisina, una variedad de estudios han implicado que *degU* y *degS* son genes involucrados en la activación de la transcripción de *aprE* durante el estado de transición. Mutaciones en *degU* o *degS* afectan pleiotrópicamente la producción de muchas otras enzimas degradativas y procesos del estado de transición (Valle y Ferrari, 1989). Se reconocen dos diferentes fenotipos resultantes de estas mutaciones dependiendo de su naturaleza (Msadek, et al., 1990). Cepas con mutaciones con sentido cambiado *degU^h* o *degS^h* exhiben: 1) sobreproducción de subtilisina, levansacarasa, proteasa neutra, alfa-amilasa, beta-glucanasa, serinproteasa intracelular y 2) defectos en la síntesis de flagelo, el desarrollo de competencia y la represión normal de la esporulación por glucosa (Zukowski y Miller, 1986). Mutaciones conocidas como *degU* o *degS* generalmente muestran los efectos opuestos: ellas son deficientes en la producción de enzimas degradativas del estado de transición pero no afectadas en movilidad y competencia. Una excepción la constituyen las deleciones de *degU*, que como *degU^h* resultan en deficiencia en competencia. Un análisis de la secuencia de nucleótidos de los genes revela que *degU* y *degS* parecen ser miembros de la familia procarionota conservada de sistemas de señalización de dos componentes (Henner, et al., 1988; Kunst, et al., 1988). Se ha demostrado que DegS es una quinasa que fosforila la proteína DegU en respuesta a alguna(s) señal(es) ambiental(es). La proteína DegU parece ser una molécula reguladora -probablemente una proteína de unión a ADN- la cual cuando se fosforila conduce a la activación de ciertas respuestas específicas. Así, a través del sistema DegS-DegU una señal ambiental puede ser transducida a varios componentes de un regulón. Se ha concluido que la forma fosforilada de DegU, como AbrB, es ambivalente: tiene efectos tanto positivos como negativos pues activa la expresión de enzimas del estado de transición pero es un regulador negativo de la síntesis de flagelo y el desarrollo de competencia. Las mutaciones *degU^h* y *degS^h* son explicadas como conductentes a incrementar la fosforilación de la proteína DegU o en que de algún modo causa a la proteína DegU^h no fosforilada mimetizar la estructura asumida normalmente sólo cuando está fosforilada (Dahl, et al., 1992). A la inversa, *degU* y *degS* conducen a la ausencia de la forma DegU-PO₄. Los mismos efectos de deleciones *degU^h* y *degS^h* sobre el desarrollo de competencia se cree son el resultado de que la forma no fosforilada de DegU es un activador de ciertos genes de competencia: en este caso la ausencia de la proteína DegU debido a deleción o teniendo a DegU predominantemente en la forma fosforilada podría tener el mismo efecto. De las mutaciones *degU^h* reportadas, la que muestra los efectos más marcados es la conocida como *degU^h32*. Esta mutación consiste en la sustitución de Adenina por Timina en el nucleótido 2006, lo que causa un cambio de histidina a leucina en el aminoácido 12 del ORF2 (Henner, et al., 1988). De hecho, la mayoría de las mutaciones *degU^h* corresponden a modificaciones en el dominio N-terminal de la proteína efectora del sistema de dos componentes (Msadek, et al., 1990; Mukai, et al., 1990). No obstante, la unión a ADN de las proteínas efectoras DegU (incluyendo a DegU^h32) no ha podido ser demostrada (Henner, et al.,

1988) e incluso se ha sugerido que su mecanismo de acción puede ocurrir a nivel posttranscripcional (Aubert, et al., 1985) si bien otros autores reportan que su actuación es a nivel de la transcripción en virtud de que la proteína DegU³² se desfosforila más lentamente que la DegU del tipo silvestre—teniendo una vida media de 120 minutos y 18 minutos, respectivamente—resultando en una mayor duración de la acción en los genes que activa (Henner, et al., 1988).

Por su parte, los genes *degQ* y *degR* (que codifican para polipéptidos pequeños de 46 y 60 aminoácidos respectivamente) resultan cada uno en el incremento en la síntesis de enzimas degradativas cuando están presentes sobre plásmidos multicopia (Tomioaka, et al., 1985; Yang, et al., 1986; Nagami y Tanaka, 1986). Sin embargo ninguno de ellos es necesario para esta síntesis dado que su delección del cromosoma de *B. subtilis* muestran fenotipos no discernibles. Se conoce muy poco acerca del papel que estas pequeñas proteínas juegan en los circuitos reguladores de las células pero la expresión de *degQ* parece estar sujeta al control de *degU-degS*, represión por catabolito y regulación por fosfato y nitrógeno (Msadek, et al., 1990).

4.1.3.5) Las proteínas Pai y Sen.

Existen al menos otros dos genes que parecen codificar proteínas involucradas en la regulación de la expresión génica en el estado de transición. La presencia del operón *pai* en un plásmido multicopia resulta en la inhibición de alfa-amilasa, levansacarasa, proteasas neutra y alcalina así como inhibición de la esporulación (Honjo, et al., 1990). La disrupción de ORF2 en el cromosoma parece ser letal; disrupción de ORF1 no tiene efecto sobre la producción de enzimas degradativas pero puede resultar en la liberación de represión por acción de la glucosa sobre la esporulación.

El gene monocistrónico *senS*, cuando está presente en multicopia, tiene efectos opuestos a los vistos con *pai*: estimula a los genes de subtilisina, proteasa neutra, alfa-amilasa y fosfatasa alcalina (Wang, et al., 1988; Wang y Doi, 1990). Así mientras que *pai* parece codificar para un regulador negativo de subtilisina, *senS* parece codificar un activador. El hecho de que se hable poco de estas proteínas no significa que tengan apenas importancia sobre la regulación de los genes mencionados; la razón es que hasta la fecha el conocimiento que de ellas se tiene es muy limitado.

4. 1.4.) Proceso de Esporulación.

La esporulación es parte de un complejo programa de desarrollo y diferenciación celular que resulta en la formación de una estructura altamente resistente denominada espora. La formación de esta estructura es un ejemplo extremo de la adaptación de *Bacillus* al medio e involucra a más de 80 diferentes genes (Kunkel, 1991). Los loci *spo* se denominaron de acuerdo al estado en el cual mutaciones en el locus bloquean la esporulación. Así *spo0*, *spoII*, *spoIII*, etc., indican que las mutaciones permitan llegar hasta el estado cero, dos y tres respectivamente, pero no más allá (Errington, 1993).

La iniciación de la esporulación es compleja y se conocen al menos tres tipos de señales que se interrelacionan:

a) Señales nutricionales. La limitación nutricional de fuentes de Carbono, Nitrógeno o Fósforo pueden inducir la esporulación (Freese, 1981; Sonenshein, 1989); buenas fuentes de

carbono, como la glucosa, la reprimen (López, et al., 1980). Recientemente se ha demostrado que la concentración intracelular de GTP (o GDP) probablemente representa el efector clave de la señal nutricional (López, et al., 1979; 1981). Sin embargo aún se desconoce cómo es censada por la célula la concentración de GTP y cómo se transmite la señal al aparato transcripcional.

b) Densidad de población. Grossman y Losick (1988) observaron que la esporulación no puede inducirse eficientemente en células mantenidas a baja densidad de población. Sin embargo, una esporulación eficiente se obtuvo cuando las células se resuspendieron a baja densidad en medio previamente condicionado por crecimiento de células a alta densidad. El efecto no se debió al agotamiento de un factor esencial de crecimiento sino a la producción de substancias -posiblemente oligopéptidos- que son necesarios para una esporulación eficiente (Waldburger, et al., 1993). Se conoce poco acerca de la naturaleza de dichos factores y menos aún de cómo es censada su presencia e interpretada.

c) Ciclo celular. En su etapa más temprana, como ya se ha mencionado, la esporulación claramente comprende una división celular modificada (Hitchins, et al., 1969). También en este caso, a pesar de que la relación entre el ciclo celular y el inicio de la esporulación está bien establecido (Clarke, et al., 1980; Dunn, et al., 1978) permanece sin esclarecerse la manera en que la célula monitorea el desarrollo del ciclo celular y transmite esta información al aparato de transcripción.

En el inicio de la esporulación la proteína Spo0A juega un papel central. El gen *spo0A* es transcrito a partir de dos promotores, Pv y Ps. Pv es reconocido por el factor de transcripción E sigmaA y aparentemente proporciona un nivel basal de Spo0A en células vegetativas. Ps es controlado por E sigmaH lo cual resulta en un incremento súbito de Spo0A al inicio de la esporulación (Chibazakura, et al., 1991; Yamashita, et al., 1989). Spo0A regula negativamente varios genes, principalmente *abrB* (Perego, et al., 1988; Strauch, et al., 1990). La regulación positiva de Spo0A es responsable de la activación de ciertos genes específicos de esporulación como los operones de *spolIA* (Perego, et al., 1991), *spolIG* (Satola, et al., 1991; 1992) y *spolIE* (York, et al., 1992). La proteína Spo0A pertenece a una familia de proteínas bacterianas llamada reguladores de respuesta (Stock, et al., 1989). La fosforilación de Spo0A es la clave en el control del inicio de la esporulación. El fosfato es transferido a Spo0A por un mecanismo complejo involucrando histidin-protein-cinasas y al menos dos acarreadores de fosfato que actúan como intermediarios. Las interacciones entre los distintos participantes han sido reproducidas in vitro recientemente (Burbuly, et al., 1991). Al menos dos histidin-protein-cinasas codificadas por los genes *kinA* y *kinB* pueden transferir el fosfato a la proteína Spo0F la cual a su vez transfiere el fosfato a un segundo acarreador, Spo0B. La proteína Spo0B es el donador directo del fosfato a Spo0A. Esta intrincada vía puede permitir que mediante sensores ambientales tanto internos como externos, sea controlado el nivel de Spo0A fosforilada (Grossman, 1991). En apoyo a esta idea, se ha demostrado que las cinasas KinA y KinB pueden responder a diferentes señales. Existen además otras proteínas involucradas en este sistema, denominado de fosforelevos, como son Spo0E y Spo0K pero su blanco preciso aún no está determinado.

La elucidación del sistema de fosforelevos ha sido un logro importante puesto que la existencia de varias proteínas que actúan vía este sistema muestra en principio como la información proveniente de muchas diferentes fuentes puede ser integrada para determinar la

elección entre proliferación y diferenciación. Sin duda, el conocimiento de este sistema puede tener importantes consecuencias cuando se piensa en las vías por las cuales decisiones similares son efectuadas en organismos superiores.

4.2) Características generales de la enzima beta-galactosidasa.

La enzima beta-galactosidasa (E.C. 3.2.1.23) también llamada lactasa, cataliza la hidrólisis de lactosa rompiendo el enlace beta-galactósido entre la D-galactosa y un alcohol dando lugar a los monosacáridos glucosa y galactosa. Esta enzima resulta de importancia comercial por diversas razones, de las cuales destacan:

a) Utilización en los sectores Alimentario y de Salud.

Se utiliza en la industria láctea con el objeto de producir leche libre de lactosa para personas con intolerancia a este disacárido. Se estima que aproximadamente el 47% de la población mestiza mexicana presenta mala absorción de lactosa mientras que en la población indígena la incidencia llega al 75% (Simoons, 1978; Houts, 1988). Además se ha demostrado la bondad de la leche con lactosa hidrolizada para la alimentación de pacientes por vía enteral, haciendo de éste un producto con características superiores y más económico que las fórmulas nutricionalmente completas que suelen utilizarse en estos casos (García-Garibay, 1992). También es un alimento adecuado para niños con diarrea, para los cuales está contraindicado el consumo de lactosa por la incapacidad de hidrolizar este disacárido a consecuencia del estado subnormal de las células del intestino delgado. Una ventaja adicional del uso de esta enzima estriba en que incrementa la capacidad edulcorante de los productos con lactosa hidrolizada sin que aumente su contenido calórico. Esto es debido a que la lactosa tiene un poder edulcorante del 40% en tanto que para glucosa es del 75% y para galactosa del 70% respecto al obtenido con sacarosa pura (Coughlin y Charles, 1980).

b) Sector Industrial. En productos lácteos fermentados se ha reportado un ahorro considerable en el tiempo de la fermentación, con mayor producción de ácido láctico, al utilizar leche con lactosa hidrolizada como materia prima gracias a que ambos monosacáridos son más fácilmente asimilables por microorganismos. Asimismo en productos lácteos endulzados el disacárido tiende a precipitar debido a su baja solubilidad cosa que no ocurre al hidrolizarla pues los productos de hidrólisis son de 3-4 veces más solubles (Nijpels, 1982).

c) Sector Contaminación. Durante el procesamiento de lácteos (en la producción de quesos, por ejemplo) el suero obtenido es desechado, convirtiéndose así en una fuente contaminante. La hidrólisis de lactosa puede convertir este desecho en un producto reutilizable lo cual, concomitantemente, implica reducción en los costos que genera el tratamiento de aguas residuales.

Industrialmente se producen en la actualidad lactasas provenientes de hongos filamentosos y levaduras. Se reconoce que el pH óptimo de actividad de las lactasas es el factor predominante que determina las áreas particulares potenciales de aplicación de la enzima. Algunas propiedades de lactasas se muestran a continuación en la Tabla I:

TABLA I. PROPIEDADES DE ALGUNAS BETA-GALACTOSIDASAS

Fuente	pH óptimo ^{a,b}	Temperatura óptima (° C) ^c	Estabilidad térmica ^b	Estabilidad inmovilizada ^d
<i>Aspergillus niger</i>	3-4	55	+	+
<i>Aspergillus oryzae</i>	4.8	46	+	+
<i>Escherichia coli</i>	6.9-7.5	45	+++	+++
<i>Sacharomyces fragilis</i>	6.5	50	++	++
<i>Kluyveromyces lactis</i>	7.0-7.3	37	+	+
<i>Candida pseudotropicalis</i>	7.5	30	+	++

a) Fellows, 1988. b) Gerhartz, 1990. c) Morisi, et al., 1973. d) Laskin, 1985.

Como se aprecia de la tabla anterior, las enzimas provenientes de *E. coli* y *K. lactis* actúan óptimamente a valores de pH que comprenden el de muchos productos lácteos, lo que las hace atractivas para el tratamiento de leches, sueros, helados, yogurt, concentrados congelados de leche y para la elaboración de quesos, por ejemplo. La enzima proveniente de *E. coli* posee ventajas adicionales únicas, como son: mayor termoestabilidad, mucha mayor actividad específica y alta estabilidad al ser inmovilizada (Sharp, et al., 1969; Morisi, et al., 1973). Para la enzima proveniente de *E. coli* se ha estimado que el peso molecular es de aproximadamente 518,000 Daltones y se encuentra como tetrámero (Craven, et al., 1965) presentando cada subunidad un sitio activo que puede actuar independientemente de los otros (Melchers y Messer, 1973).

CAPITULO V. METODOLOGIAS

5.1.) Construcción del plásmido paprlac2.

Como parte del proyecto construimos aquí un vector de integración el cual se denominó paprlac2 y que se integra en el locus del gene *apre* por recombinación de tipo Campbell. Para construir este vector integrativo se utilizaron los plásmidos pJF751 (Ferrari, et al., 1985) y pSG35.1 (Ferrari, et al., 1988). El primero de ellos posee el gene estructural *lacZ* de *E. coli* y adyacente a este se encuentra un sitio múltiple de clonación (SMC); también posee el gene *cat* que codifica para la cloranfenicolacetiltransferasa mediante la cual se confiere resistencia a dicho antibiótico. El plásmido pSG35.1 por su parte contiene el promotor completo, las señales de regulación del gene *apre* y los primeros ocho codones del gene estructural de subtilisina, también posee el gene *lacZ* de *E. coli* así como los dos fragmentos terminales del gene *amy*, que codifica para la enzima alfa-amilasa de *B. subtilis*, por lo que una parte de este vector cuando se integra al cromosoma (en el locus de *amy* mediante recombinación doble) resulta en la interrupción del gene estructural.

Con objeto de propagarlos, ambos vectores se utilizaron para transformar, independientemente, a células competentes de *E. coli* cepa JM101 (*lac-pro*) supE thiF⁻ tra D36 pro AB lacI^s Z M15 mediante la técnica de choque térmico (Perbal, 1988). Las células transformadas fueron seleccionadas sembrando en medio de Luria-Bertani (LB) conteniendo ampicilina y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galactopiranosido) e incubando a 37° C por 24 hrs. Después los plásmidos se purificaron por el método de lisis alcalina reportado por Birnboim y Doly (1979). Luego de hacer el análisis de restricción para ambos vectores con objeto de corroborar su identidad, se digirieron doblemente con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* (Boehringer, Mannheim) por tres horas bajo las condiciones especificadas por el proveedor. El vector pJF751 ya cortado se guardó a -20°C y luego de 24 horas se trató con fenol-cloroformo para retirar las enzimas de restricción. Por su parte, la banda de aproximadamente 600 pares de bases (pb) cortada del vector pSG35.1 fue separada del resto mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% (Bio-Rad) a 85 voltios por aprox. 3 hrs. Luego de tefir con bromuro de etidio (a concentración 0.5ug/ml) el gel fue lavado con agua destilada y observado en un transiluminador (FotoprepII de Fotodyne) con radiación ultravioleta de baja intensidad. La banda fue cortada del gel de agarosa, transferida a un tubo Eppendorf y luego machacada con un porta-asa estéril, congelando y descongelando en CO₂ para facilitar la operación. Después de someter la banda a tratamiento con fenol (Maniatis, et al., 1989) el sobrenadante se pasó a un tubo limpio y finalmente se purificó el fragmento de ADN por el procedimiento de Glass-Max (GIBCO-BRL, Life Technologies Inc.).

El vehículo pJF751 fue linearizado al cortarlo con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* y se le ligó el fragmento de aproximadamente 600 pb obtenido del plásmido pSG35.1 utilizando la ligasa T4 (Boehringer-Manheim) según las condiciones descritas por Perbal (1988). Luego de 24 horas se adicionaron al tubo Eppendorf donde se llevó a cabo la ligación, 50 ul de células competentes de la cepa JM101 de *E. coli* y transformando por la técnica ya mencionada. Se incubó por 24

horas en medio LB conteniendo ampicilina y X-gal y fueron seleccionadas las colonias azules obtenidas. Estas se resembraron por dos ocasiones más en medio LB y posteriormente el nuevo vector logrado (paprlac2) se purificó mediante el método de lisis alcalina antes citado. Finalmente la identidad del plásmido paprlac2 fue confirmada mediante digestiones sencillas y dobles con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* y posterior electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

5.2.) Transformación de cepas de *B. subtilis* con paprlac2.

Una vez obtenido, este vector de integración se utilizó para transformar diferentes cepas de *Bacillus subtilis* siguiendo el método reportado por Bott y Wilson (1968). Por las características de la proteína beta-galactosidasa, la producción de lactasa se da intracelularmente.

5.2.1.) Transformación de cepas esporogénicas.

Con el vector paprlac2 se transformaron las siguientes cepas:

Cepa receptora	Fenotipo	Cepa construida	Fenotipo de la cepa construida
BB80	<i>nprE-hisA</i>	BB801	<i>nprE-hisA-lacZ-Cm^R</i>
BB82	<i>nprE-hpr2-hisA</i>	BB802	<i>nprE-hpr2-hisA-lacZ-Cm^R</i>

La selección de las transformantes se hizo en cajas Petri conteniendo medio Skim Milk (DIFCO) con cloranfenicol (5 ug/ml) y X-gal. Fueron elegidas aquellas colonias que fueron capaces de crecer en presencia del antibiótico y que además mostraron coloración azul. Mediante la determinación de coloración azul se detecta la actividad de la enzima beta-galactosidasa pues al hidrolizar al compuesto X-gal se da lugar a una interconversión de grupo funcional del sacárido que presenta grupo cromóforo, el cual emite en la longitud de onda que corresponde a dicho color.

5.2.2.) Transformación de cepas serie BB-Spo0A.

Hasta que fueron construidas y evaluadas las cepas anteriores se procedió a la construcción de mutantes asporogénicas (incapaces de esporular). Para lograr estas cepas se recurrió a la técnica de congresión transformando las cepas BB801 y BB802 con ADN cromosomal procedente de una cepa con el genotipo *spo0A9V* y con el plásmido pBS7 (Yansura y Henner, 1984). Este plásmido posee un gene que confiere resistencia al antibiótico fleomicina y es poco estable en *Bacillus subtilis*. El ADN cromosomal fue obtenido mediante la técnica descrita por Perbal (1988). Las cepas construidas tienen las siguientes características:

Cepa receptora	Cepa construída	Fenotipo de la cepa construída
BB801	BB805	<i>nprE-hisA-lacZ-Cm^R-Fleo^R-spo0A9V</i>
BB802	BB806	<i>nprE-hpr2-hisA-lacZ-Cm^R-Fleo^R-spo0A9V</i>

La selección se realizó en cajas de Petri conteniendo medio de Schaeffer (Schaeffer, 1965) con Fleomicina (5 ug/ml) siguiendo el criterio propuesto por Stuart (comunicación personal). Las cepas BB805 y BB806 deben guardarse en ultracongelador a -70°C (REVCO, Inc.) en frascos viales conteniendo glicerol al 50% como crioprotector pues la mutación *spo0A9V* de otro modo puede revertir fácilmente.

5.3.) Transducción de *degU^{h32}*.

En ausencia de un sistema de transformación con alta frecuencia de recombinación (Hfr) basado en la conjugación, la transducción generalizada usando el fago pBS-1 ha resultado sumamente adecuado para estudios de mapeo de grandes extensiones genómicas. El fago pBS-1 es capaz de transducir fragmentos extremadamente grandes de ADN cromosomal: arriba del 8% del genoma (esto es, aproximadamente 300 kb) (Ferrari y Hoch, 1982).

Teniendo lo anterior en mente, se decidió incorporar la mutación *degU^{h32}* a las cepas BB801, BB802, BB805 y BB806. Para ello se realizó la transducción generalizada con el fago pBS-1. Fue necesario preparar un lisado utilizando una cepa de *B. subtilis* que poseyera la mutación *degU^{h32}*. La cepa elegida fue la BG2223 que ha sido previamente reportada (Ferrari, 1986) y el lisado se preparó según el método descrito por Cutting y Vander Horn (1990). El lisado se tituló posteriormente encontrándose un valor de 2.47×10^8 unidades formadoras de placa (UFP) siguiendo el método propuesto por Lovett y Young (1970). El procedimiento empleado para la transducción fue sugerido por Ferrari (comunicación personal). Se aprovecha aquí el hecho de que la mutación *degU^{h32}* está muy cercana al gene *hisA* (posiciones en el cromosoma 306° y 298°, respectivamente. Anagnostopoulos, et al., 1993). Las cepas utilizadas y las construídas son descritas a continuación:

Cepa receptora	Cepa Transducida	Fenotipo de la nueva cepa transducida
BB801	BB803	<i>nprE-lacZ-Cm^R-degU^h32</i>
BB802	BB804	<i>nprE-hpr2-lacZ-Cm^R-degU^h32</i>
BB805	BB807	<i>nprE-lacZ-Cm^R-Fleo^R-degU^h32-spo0A9V</i>
BB806	BB808	<i>nprE-hpr2-lacZ-Cm^R-Fleo^R-degU^h32-spo0A9V</i>

5.4.) Fermentación y producción de beta-galactosidasa en las cepas esporogénicas BB801, BB802, BB803 y BB804.

Las cepas BB801, BB802, BB803 y BB804 fueron crecidas para analizar los tiempos en los cuales es producida la enzima beta-galactosidasa así como los niveles de actividad específica alcanzados.

Para este estudio se utilizaron matraces Fernbach de 2800 ml de capacidad conteniendo cada uno 400 ml de medio de Schaeffer ajustado a pH=7.2 con NaOH 10 M antes de esterilizar. Las cinéticas se efectuaron a 37°C y 300 rpm en una incubadora con agitación oscilatoria (New Brunswick).

5.5.) Conservación, fermentación y producción de beta-galactosidasa en cepas BB805, BB806, BB807 y BB808.

Debido a que la cepa con la mutación *spo0A9V* revierte fácilmente al parecerse consecutivamente, las cepas recién construidas se crecieron en medio Luria hasta tener una alta densidad celular (1.5-2.0 unidades de Densidad Óptica a 600 nm) e inmediatamente después fueron guardadas en ultracongelador a -70°C en viales estériles conteniendo glicerol al 50% como crioprotector. Para cada cinética se confirmó el fenotipo *spo0A9V* sembrando en cajas de Petri conteniendo medio Schaeffer e incubando a 37°C por 48 h y usando una cepa esporogénica como control. A juzgar por la pigmentación de las colonias estriadas, no se tuvieron problemas de reversión del fenotipo *spo0A9V*. Adicionalmente en cada fermentación, luego de ocho horas de iniciado el crecimiento, se realizó al menos una observación directa de las células utilizando microscopía de contraste de fases (Microlux, Iroscope) a un aumento de 400x; en ningún de los

estudios se observaron esporas. Para la realización de las cinéticas una asada de los viales se estrió sobre caja Petri conteniendo medio TBAB (Difco, 1985) y se incubó a 37°C por 12 h. Luego de tener crecimiento de colonias aisladas, un tubo conteniendo 3 ml de medio Schaeffer fue inoculado con una sola colonia. Cuando la D.O. del cultivo llegó a 1.0 unidades, se transfirió este inóculo en una matraz Fernbach de 2800 ml de capacidad conteniendo 400 ml de medio Schaeffer a pH=7.00 y realizando el estudio a 37°C y 300 rpm por 24 h.

5.6.) Determinación de la actividad de la enzima beta-galactosidasa.

La actividad específica se reporta en unidades Miller/mg de proteína, siendo definida una unidad Miller como la cantidad de enzima que hidroliza una micromol de sustrato ONPG (orto-nitro-fenil-beta-D-galactopiranosido) por minuto a 28°C.

5.7.) Determinación de proteína celular.

La determinación de la concentración de proteína celular por mililitro de cultivo se hizo mediante el procedimiento reportado por Lowry (1951) y la curva patrón, construida en el intervalo de concentraciones de 0 a 600 ug/ml utilizando albúmina sérica bovina (Sigma Chemicals, Co.) quedó definida por los parámetros siguientes que corresponden a la ecuación de la recta: $m=0.001839$, $b=0.02331$ con una correlación entre datos del 99.94%.

5.8.) Formulación del medio químicamente definido.

Inicialmente se realizó una búsqueda bibliográfica de reportes donde se incluyen formulaciones de medios definidos y/o mínimos. De los más de veinte reportes elegidos, se encontró que la gran mayoría de ellos utilizan las mismas fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y micronutrientes, radicando la mayor diversidad en los niveles de concentración empleados de las fuentes de carbono y de los elementos traza CaCl_2 y MnSO_4 . Posteriormente fueron construidas tablas donde se listaron cada uno de los componentes comunmente utilizados y los valores mínimos y máximos de concentración que se reportan (datos no mostrados). Así y de manera arbitraria, se eligieron las concentraciones promedio entre ambos extremos con base en las tablas construidas.

El medio químicamente definido quedó entonces formulado así:

Compuesto empleado	Concentración (en g/L)
Glucosa	10
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4
K_2HPO_4	5.32
KH_2PO_4	6.40
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.40
	(en mg/L)
MnCl_2	50
CaCl_2	40
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30

Este medio se prepara disolviendo el sulfato de amonio y las sales de fosfatos en agua destilada, ajustando luego el pH a 7.20 con hidróxido de sodio 10M para después esterilizarlo. Se preparan soluciones patrón de glucosa (50%), sulfato de magnesio (40%), cloruro de manganeso (25%), cloruro de calcio (20%) y sulfato de hierro (15%) para adicionar, por litro de medio, 20ml de sol. de glucosa, 1ml de sol. de sulfato de magnesio y 0.2 ml de cada solución de micronutrientes. Estas soluciones se esterilizan por separado y se adicionan al medio esterilizado en el orden mencionado.

En el caso de estudios en fermentador con vaso de 4 litros, el pH se controla mediante la adición de NaOH 1N y de ácido fosfórico 0.1N.

CAPITULO VI. RESULTADOS EXPERIMENTALES

6.1) Construcción de sistemas de expresión.

6.1.1.) Antecedentes.

Bacillus subtilis fue el primer microorganismo no patógeno en ser transformado hace más de treinta años (Anagnostopoulos y Spizizen, 1961). Spizizen usó la cepa 168, una auxótrofa a triptofano y en consecuencia, esta cepa ha formado las bases de casi todas los estudios genéticos posteriores. La transformación de células competentes por ADN cromosomal es un proceso relativamente simple y reproducible. La competencia, es decir, el estado fisiológico en el cual las células son capaces de incorporar ADN exógeno, se desarrolla naturalmente en *Bacillus subtilis* hacia el final del crecimiento exponencial pero puede ser inducido experimentalmente por regímenes específicos de crecimiento. A concentraciones saturantes de ADN, las células individuales pueden incorporar más de una molécula de ADN. Este proceso es conocido como congresión. La congresión es una técnica extremadamente valiosa para la construcción de cepas; particularmente para marcadores que no son posibles de seleccionar directamente desde un inicio (Hoch, 1991). Sin embargo, si bien la transformación natural es altamente eficiente para asimilar fragmentos lineales de ADN homólogo, es muy ineficiente para la asimilación de ADN plasmídico. Las limitaciones de la transformación natural han conducido al desarrollo de otros procedimientos de transformación para *Bacillus subtilis*. Así, se han intentado la transformación con protoplastos y la electroporación (Audit y Anagnostopoulos, 1972) si bien ambos son procedimientos comparativamente muy largos y difíciles de reproducir.

En general el uso de plásmidos replicativos no ha sido exitoso en el caso de *Bacillus subtilis* pues éstos muestran inestabilidad estructural y segregacional. Se ha demostrado que parte de dicha inestabilidad se debe al modo de replicación de ADN monocatenario de estos plásmidos, el cual se lleva a cabo de modo similar a como sucede en fagos. Esto puede resultar en deleciones, intermediarios de cadena sencilla y moléculas de alto peso molecular. En muchos casos, la extensión en la cual son producidas estas formas aberrantes depende de la localización y tamaño del ADN insertado (Bron, et al., 1989; Gruss y Ehrlich, 1989).

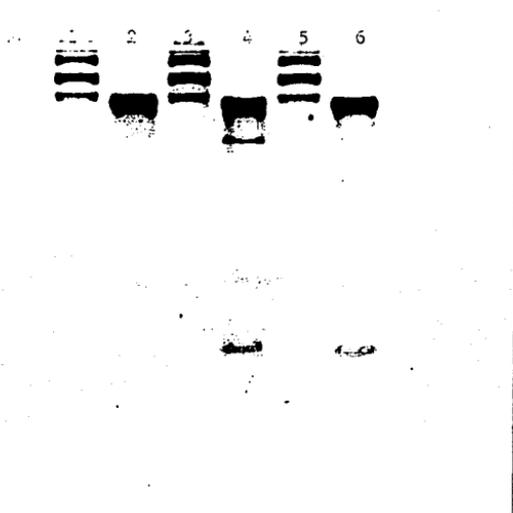
Una de las herramientas más utilizadas y valiosas para clonar y mantener genes en *Bacillus subtilis* la constituyen los vectores de integración. Estos permiten la reintroducción de genes de interés en localizaciones específicas del cromosoma (Cutting y Vander Horn, 1990; Youngman, 1990). Los vectores de integración son básicamente plásmidos de *Escherichia coli* que poseen marcadores que pueden ser seleccionados en *B. subtilis*. En algunos de estos vectores se incluyen también fragmentos del ADN cromosomal de *B. subtilis* para dirigir los genes a un locus específico del cromosoma vía recombinación quasi-recíproca; en otros casos, los genes homólogos clonados proporcionan un sitio para eventos de integración tipo Cambell. Estos vectores han sido muy utilizados para generar mutantes y estudiar la expresión génica. Es pertinente señalar que el uso de plásmidos ha mostrado que, mientras los genes de *E. coli* no son normalmente expresados en *B. subtilis*, genes de éste sí son usualmente expresados en *E. coli*. La factibilidad de *B. subtilis* para expresar la mayoría de genes de bacterias gramnegativas parece encontrarse a niveles de transcripción y traducción. Si bien *E. coli* y *B. subtilis* tienen secuencias consenso de promotores virtualmente idénticas (TTGACA-16 a 19 pb-TAATAT) es evidente que

son requeridas características estructurales adicionales para una eficiente utilización de promotores por la ARN polimerasa de *Bacillus subtilis*, particularmente para una región rica en AT arriba de la región -35 (Moran, et al., 1982). De manera similar, la mayoría de los sitios de unión al ribosoma (RBS en inglés) de *E. coli* parecen funcionar ineficientemente en *Bacillus subtilis*.

Así entonces, por todas las ventajas arriba señaladas, inicialmente el trabajo se orientó hacia la construcción de un vector de integración para clonar el gene *lacZ* de *Escherichia coli* en el cromosoma de *B. subtilis*.

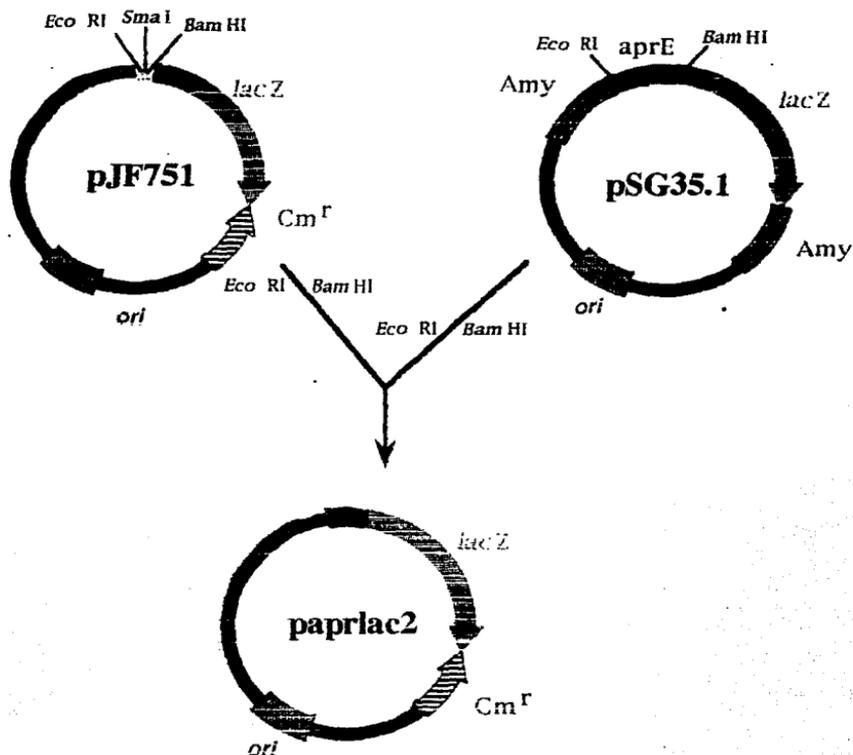
6.1.2.) Parte Experimental de la construcción de un vector de integración al cromosoma de *B. subtilis*.

Los resultados de estas evaluaciones se muestran en la siguiente fotografía:



- Carril 1. Vector pJF751 sin digerir.
- Carril 2. Vector pJF751 digerido con EcoRI-BamHI.
- Carril 3. Plásmido pSG35.1 sin digerir.
- Carril 4. Plásmido pSG35.1 cortado con EcoRI-BamHI.
- Carril 5. Plásmido paprlac2 sin digerir.
- Carril 6. Plásmido paprlac2 digerido con EcoRI-BamHI.

En la siguiente figura se muestran las características más importantes de los vectores pJF751 y pSG35.1 así como del vector de integración aquí construido, denominado paprlac2:

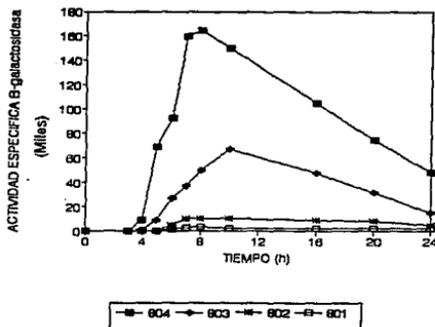


Construcción del plásmido de integración paprlac2

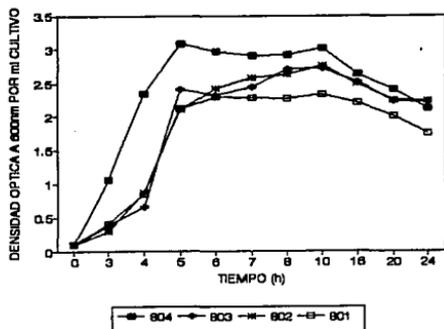
Como se aprecia de la figura anterior, el plásmido paprlac2 posee el gene *lacZ* de *E. coli* bajo las señales de regulación del gene *aprE* y también el gene *cat* mediante el cual se confiere resistencia para el antibiótico cloranfenicol.

6.2.) Resultados de fermentación y producción de beta-galactosidasa en las cepas esporogénicas BB801, BB802, BB803 y BB804.

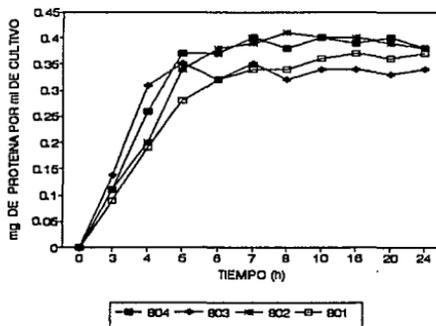
Los estudios se realizaron por triplicado encontrándose los siguientes resultados:



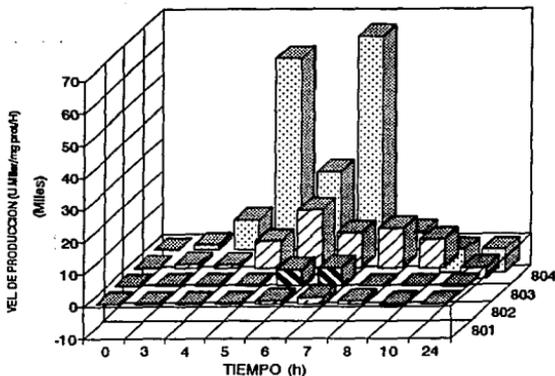
Gráfica 1. Comparación entre las cepas BB801, BB802, BB803 y BB804 respecto a la actividad específica de beta-galactosidasa a lo largo del crecimiento. Cepa 801= WT; 802= *hpr2*; 803= *degU^{A32}* y 804= *hpr2-degU^{A32}*. La actividad específica se reporta como Unidades Miller/mg de proteína.



Gráfica 2. Determinación de la densidad óptica a lo largo de la curva de crecimiento para las cepas BB801, BB802, BB803 y BB804.



Gráfica 3. Determinación de la biomasa con base en la concentración de proteína celular para las cepas BB801, BB802, BB803 y BB804.



Gráfica 4. Comparación de las velocidades de producción (unidades Miller/mg proteína/hora) entre las cepas esporogénicas BB801, BB802, BB803 y BB804.

De la gráfica 1 se aprecia que la mayor actividad específica para la beta-galactosidasa se encuentra en la cepa BB804 la cual corresponde a la doble mutante *hpr2-degU^h32*. En orden decreciente le siguen las cepas BB803 (esta es la cepa que posee la mutación *degU^h* solamente), BB802 (con la mutación *hpr2*) y BB801, que corresponde aquí a la cepa de referencia o tipo silvestre. La determinación de actividad específica se hizo mediante el método modificado de Miller (1992).

Por lo que respecta a la gráfica 2, el comportamiento mostrado aquí es que la cepa BB804 alcanza una mayor densidad óptica, siguiéndole en orden decreciente las cepas BB803, BB802 y BB801 respectivamente. Esto es, la biomasa, medida como unidades de densidad óptica, mostró el comportamiento señalado. Sin embargo, una estimación de la biomasa en términos de la concentración de proteína celular (gráfica 3) siguió un comportamiento diferente; aquí las cuatro cepas alcanzan una concentración de biomasa similar.

En la gráfica 4 puede observarse que la mayor velocidad de producción, calculada con base en la actividad específica, corresponde a la cepa BB804, continuando en orden decreciente de actividad las cepas BB803, BB802 y BB801. Para todas las cepas la producción de la enzima es máxima entre T_1 - T_2 ; esto es, de una a dos horas después de haber ingresado al estado de transición, para luego disminuir rápidamente. Así, en el caso particular de la cepa que mostró las mayores actividad específica y productividad (BB804) al cabo de 24 horas de crecimiento se mantiene sólo el 30% de la máxima actividad beta-galactosidasa alcanzada.

A continuación en la Tabla II se muestran una serie de datos comparativos que serán discutidos en el apartado correspondiente. Considerando a la cepa BB801 como referencia -por tener el fenotipo "silvestre"- resulta interesante comparar cuántas veces más que esta producen las tres cepas mutantes. En la última columna de la Tabla II se muestran los resultados de dichas estimaciones tomando como parámetro la máxima actividad específica alcanzada.

TABLA II. Comparación de varios parámetros para las cepas esporogénicas construídas.

Cepa	Vel. esp. crecimiento	Máx. activ. específica	Productividad	No. de veces con base en la actividad específica
BB801	0.569	3800	1869	1x
BB802	0.590	10629	5479	2.79x
BB803	0.639	67174	17825	17.67x
BB804	0.787	164533	66160	43.29x

6.2.1.) Discusión de resultados de fermentaciones y producción de beta-galactosidasa para este grupo de cepas.

La producción de la enzima comienza a partir del inicio del estado de transición (T_0) para todas las cepas, lo que confirma que la construcción integrada a cromosoma ha quedado bajo control del promotor y las señales de regulación del gene *aprE*. Como ya se indicó, este gene es inducible y se expresa al comenzar el estado de transición, lo que resulta atractivo desde un punto de vista industrial pues implica que la producción de la enzima (en este caso beta-galactosidasa) se inicia cuando existe una alta concentración de biomasa, como se aprecia del análisis conjunto de las gráficas 1, 2 y 3.

Respecto de las actividades específicas determinadas para estas cepas, la denominada BB804 mostró los valores más altos. Este comportamiento es probablemente el resultado de la doble mutación que posee la delección en el gene represor *hpr* y la mutación *degU/h32*, activadora de

la expresión de *aprE*, resultando en un efecto combinado que no es logrado con las mismas mutaciones por separado. Este efecto sumatorio de la doble mutante puede ser explicado tentativamente considerando que Hpr y DegU actúan por mecanismos distintos pero no del todo independientes, de tal manera que con la delección *hpr2* podría facilitarse la activación por parte de DegU³² y de aquí el incremento en la transcripción del gene *lacZ*. Varios mecanismos de acción pueden sugerirse a este nivel: i) la proteína DegU³² puede unirse directa y más fácilmente al ADN como resultado de evitarse la inhibición alostérica causada por la proteína Hpr; ii) al no tenerse unión de la proteína Hpr sobre sus sitios en el ADN, esta molécula adquiere una conformación local que hace más accesible el (los) sitio(s) activado(s), directa o indirectamente, por DegU³².

Respecto a la actividad específica encontrada para las mutantes construidas, le siguen a la cepa BB804 en orden decreciente las cepas: BB803, BB802 y BB801 lo que significa que la contribución de la mutación *degU³²* para activar al gene *aprE* es mayor que la obtenida al suprimir la expresión de la proteína Hpr y ambas contribuciones mayores que la observada para la cepa silvestre. Este efecto es fácilmente visualizado en la última columna de la Tabla II. Cabe destacar que para ninguna de las mutaciones *hpr2*, *degU³²* ni *hpr2-degU³²* se vió que la enzima beta-galactosidasa fuera expresada constitutivamente, comportamiento que puede deberse al control normal ejercido por otros genes que regulan la expresión de *aprE*.

Al comparar por dos métodos distintos la biomasa alcanzada, existen discrepancias. Mientras que siguiendo el criterio de las unidades de densidad óptica la cepa BB804 pareciera lograr mayor biomasa que todas las demás, siguiéndole en orden decreciente las cepas BB803 y BB802 (ambas con similares concentraciones) y ligeramente abajo la cepa BB801, el criterio que toma como base la concentración de proteína celular indica que todas las cepas presentan niveles similares de biomasa. De ambos criterios el que toma como referencia las unidades de densidad óptica es menos preciso pues en suspensión existen no sólo células sino también compuestos y estructuras celulares -tales como esporas- que pueden absorber luz a la longitud de onda empleada. El efecto mostrado en la gráfica 2 posiblemente sea artefactual y deba ser explicado tomando en cuenta que la espora es una estructura con propiedades ópticas de alta refringencia y por lo tanto absorberá más luz y tendrá mayores valores de densidad óptica. Si a este hecho se le suma que existen reportes en la literatura donde se ha encontrado que diversas mutaciones (*sin*, *degU^h* y *sin-degU^h*) adelantan el programa de desarrollo celular en *B. subtilis*, de tal modo que estas cepas ingresan antes a esporulación (Olmos, manuscrito en preparación) es posible que la mutación *hpr2* y la combinación *hpr2-degU³²* sigan un comportamiento similar. En nuestros experimentos y tal como se aprecia de las gráficas 1, 2 y 3, la doble mutante siempre entra primero a fase exponencial y luego a estacionaria siguiéndole, en ese orden, las cepas BB803, BB802 y BB801. Este hecho es apoyado por los comportamientos encontrados al calcular las velocidades específicas de crecimiento. Los resultados obtenidos para la cepa BB804 hacen de ella la más atractiva de las cuatro con fines de producción de beta-galactosidasa. Sin embargo, para las cepas BB803 y BB804 es observada una rápida caída en la actividad específica siendo al cabo de aproximadamente 24 horas, sólo una cuarta parte del valor máximo alcanzado. Como este efecto no es detectado en las cepas BB801 y BB802 en los tiempos aquí considerados, se atribuye a la mutación *degU³²*. Inicialmente se trató de explicar aquí esta caída en la actividad específica como debida a la acción de enzimas autolisinas ya que su existencia y la tendencia

de *B. subtilis* hacia la lisis celular son hechos bien documentados (Jelliffe, et al., 1981; Harwood, et al., 1990). No obstante, considerando que con la mutación *degU*³² también se incrementa la expresión de todas las proteasas, tanto intracelulares como extracelulares, del estado de transición (a excepción de la neutra, cuyo gene está deletado en todas las cepas utilizadas) es muy probable que ocurra degradación proteolítica de la beta-galactosidasa producida. La existencia de actividad proteolítica fue demostrada al cultivar en medio Skim Milk siendo que para las cepas BB804 y BB803 se aprecia claramente un halo de proteólisis el cual es 1-2 veces mayor que el que presenta la cepa BB802, mientras que no se detecta halo de proteólisis en la cepa BB801. Además, la posible degradación por proteólisis de la beta-galactosidasa producida es muy probable pues la caída en la actividad específica es observada incluso cuando se calcula la actividad de esta enzima por miligramo de biomasa. Si el efecto fuera causado por autolisinas, cabría esperar una disminución de la biomasa, lo cual no ocurre según los resultados mostrados en la gráfica 3. Del mismo modo, de existir lisis celular y en consecuencia haber menor biomasa, la actividad específica no tendría por que disminuir ya que este parámetro considera precisamente la actividad de lactasa por cada miligramo de proteína celular. Una explicación adicional puede darse considerando tanto la acción proteolítica como el "apagado" de la transcripción del gene *aprE* por lo que, conforme continúa el programa de desarrollo que conduce a la formación de la espora, cesa la producción de beta-galactosidasa.

Como no se cuenta en el laboratorio con cepas que posean deleciones en los genes *isp-1* e *isp-2*, los cuales codifican para las dos proteasas intracelulares que hasta ahora se conocen (He, et al., 1991), se consideró conveniente intentar la construcción de cepas en las cuales la producción de la enzima pueda extenderse por más tiempo. Una alternativa interesante consiste en trabajar con cepas asporogénicas (es decir, incapaces de generar una espora madura) para lo cual pueden construirse cepas que inician el programa de desarrollo que conduce a la formación de la espora pero evitando que lleguen más allá del estado II (pues entonces el programa de diferenciación celular se torna irreversible y la viabilidad de las mutantes generadas se abate drásticamente). Se espera que de esta manera pueda mantenerse la producción de productos del estado de transición por más tiempo. El resultado de este tipo de estrategia se presenta enseguida.

6.3.) Resultados de fermentaciones y producción de beta-galactosidasa en cepas que llevan *spo0A9V*.

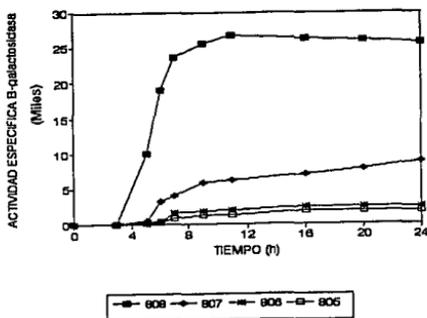
6.3.1) Antecedentes.

De todas las mutaciones *spo0* reportadas, la más importante sin duda es la conocida como *spo0A* pues este gene controla el inicio de la esporulación en *Bacillus subtilis* (Strauch, et al., 1990). Es interesante el hecho de que el sitio de unión para la proteína Spo0A se halla hacia abajo (downstream) en promotores que son regulados negativamente y hacia arriba (upstream) en aquellos promotores que son activados, lo cual parece indicar que la localización de la caja OA (TGNCGAA) puede ser un factor determinante en el modo de acción de esta proteína. Entre todas las mutaciones *spo0A* reportadas, sólo dos (*spo0A153* y *spo0A9V*) han mostrado fenotipos muy poco pleiotrópicos (Ferrari, 1985). De estas mutaciones únicamente la *spo0A9V* se ha reportado como productora de proteasas (Zuber y Losick, 1987) que mantiene una represión

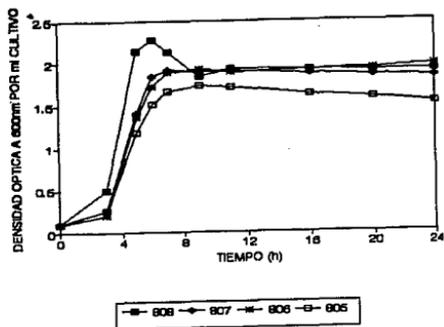
normal sobre el gene *abrB* según estudios con fusiones *abrB-lacZ* y es incapaz de activar la transcripción del gene *spolIA* interrumpiendo así el programa de desarrollo que resulta en la formación de una spora (Perego, et al., 1991). La proteína Spo0A consiste de dos grandes dominios: el N-terminal que está fosforilado y muestra homología con reguladores de respuesta de sistemas de dos componentes y un dominio C terminal el cual probablemente incluye el sitio de unión a ADN (Ronson, et al., 1987). La mutación *spo0A9V* es del tipo sentido cambiado y se localiza en el onceavo codón que precede al C-terminal de la proteína. Su fenotipo se reconoce en ciertos medios de cultivo porque, al no poder formar una spora madura, las colonias presentan deficiencia en la pigmentación.

6.3.2.) Parte Experimental.

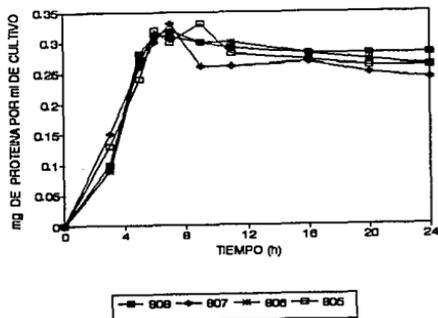
Los resultados de estos experimentos, realizados por triplicado, se muestran en las siguientes gráficas:



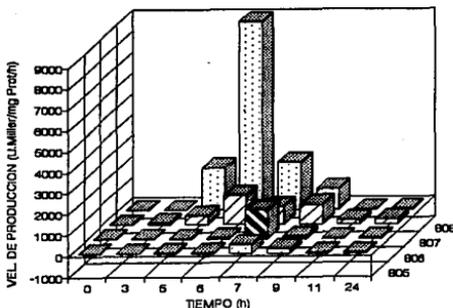
Gráfica 5. Comparación de las actividades específicas a lo largo de la curva de crecimiento para las cepas *spo* BB805, BB806, BB807 y BB808. Cepa 805 = *spo0A9V*(WT de la serie); 806 = *hpr2-spo0A9V*; 807 = *degU^{Δ32}-spo0A9V* y 808 = *hpr2-degU^{Δ32}-spo0A9V*. La actividad específica se define como el número de Unidades Miller/mg de proteína.



Gráfica 6. Evaluaciones de biomasa mediante la determinación de la densidad óptica a 600 nm para las cepas BB805, BB806, BB807 y BB808.



Gráfica 7. Determinación de biomasa, según la concentración de proteína celular, para las cepas BB805, BB806, BB807 y BB808.



Gráfica 8. Comparación de las velocidades de producción alcanzadas (Unidades Miller/mg proteína/hora) a lo largo de la curva de crecimiento entre las cepas BB805, BB806, BB807 y BB808.

De la gráfica 5 se desprende que, al igual que sucede con las cepas BB801, BB802, BB803 y BB804, la producción de la enzima beta-galactosidasa coincide con el inicio del estado de transición en todas las cepas *spo0A9V*. También se observa que la que posee el fenotipo *degU³²-hpr2-spo0A9V* mostró la mayor actividad específica (cepa BB808), siguiéndole en orden decreciente de actividad las cepas BB807, BB806 y BB805 que corresponden a los fenotipos *degU³²-spo0A9V*, *hpr2-spo0A9V* y *spo0A9V*, respectivamente. Sin embargo, a diferencia de la cepa BB804 (fenotipo *hpr2-degU³²*), la actividad específica encontrada para la cepa BB808 fue mucho menor.

Respecto a la medición de biomasa, mediante la estimación de las unidades de densidad óptica, la cepa BB808 mostró los valores más altos; las cepas BB806 y BB807 presentan concentraciones similares entre sí. Estos valores son ligeramente menores a los obtenidos con la cepa anterior, mientras que los valores más bajos se encontraron para la cepa BB805, como se aprecia en la gráfica 6.

Al comparar las biomásas utilizando el criterio de la concentración de proteína microbiana por ml de cultivo (gráfica 7) los valores determinados para las cepas BB805, BB806, BB807 y BB808 son muy parecidos entre sí. Este comportamiento es similar al encontrado con las primeras cuatro cepas *spo0A* (+) cuando se compararon los valores de densidad óptica y proteína.

En la gráfica 8 son mostrados los resultados de las velocidades de producción alcanzadas por estas cepas deficientes en la esporulación. La máxima velocidad de producción se tuvo, para las cuatro cepas, al cabo de 1-2 h de haber ingresado al estado de transición (To). Los valores más altos se encontraron para la cepa BB808 continuándole, en orden decreciente de velocidad de producción, las cepas BB807, BB806 y BB805.

En la Tabla III son mostrados una serie de datos comparativos que se discuten más adelante. En la última columna se calcularon cuántas veces más producen las cepas mutantes considerando a la cepa BB805 como referencia.

TABLA III. Comparación de varios parámetros entre las cepas no esporogénicas *spo0A9V*.

Cepa	Velocidad esp. de crecimiento	Máxima actividad específica	Productividad	* No. de veces (*)
BB805	0.477	1876	268.0	1x
BB806	0.509	2446	349.4	1.3x
BB807	0.512	8835	1472.5	4.7x
BB808	0.606	26700	4450.0	14.2x

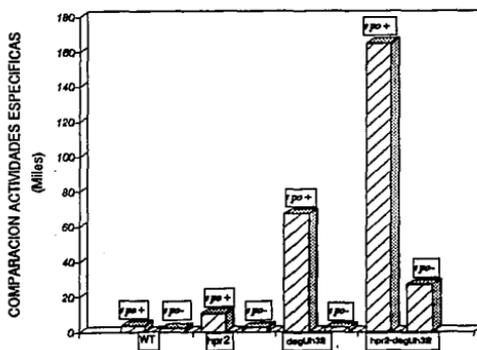
(*)= Comparaciones hechas con base en la actividad específica.

La Tabla IV muestra una comparación entre la máxima actividad específica beta-galactosidasa para las cepas esporogénicas respecto de las cepas mutantes en *spo0A9V*. En la última columna se ha incluido una estimación consistente en el número de veces que produce una cepa *spo0A** respecto de la correspondiente *spo0A9V*.

TABLA IV. Comparación de las máximas actividades específicas para cepas esporogénicas versus cepas *spo0A9V*.

Cepa	Máxima actividad específica	Cepa	Máxima actividad específica	Relación <i>spo0⁺/spo0A9V</i>
BB801	3800	BB805	1876	2.02
BB802	10629	BB806	2446	4.34
BB803	61174	BB807	8835	7.60
BB804	164533	BB808	26700	6.16

La siguiente gráfica muestra esta misma comparación entre las cepas esporogénicas y las correspondientes *spo0A9V*.



Gráfica 9. Comparación entre mutantes esporogénicas y las correspondientes mutantes *spo0A9V* respecto de las máximas actividades específicas logradas. La actividad específica se reporta como el número de Unidades Miller/mg de proteína.

6.3.3.) Discusión de Resultados

Para las cepas BB805, BB806, BB807 y BB808 es observado un comportamiento similar respecto a la cepa correspondiente BB801, BB802, BB803 y BB804 en cuanto al momento en el cual se inicia la producción de beta-galactosidasa. Este hecho indica que la mutación *spo0A9V* no modifica el momento en el cual comienza a expresarse el gene *aprE*. Así también en todas las cepas *spo0A9V* siempre se encontró que la que contiene la doble mutación *degU^{h32}-hpr2* tuvo la mayor actividad específica continuando en orden decreciente la que sólo tiene la mutación *degU^{h32}*, luego la que posee la mutación *hpr2* y finalmente la cepa denominada silvestre. Sin embargo, en todas las cepas *spo0A9V* la máxima actividad específica alcanzada es mucho menor (hasta siete veces) que la obtenida con las cepas esporogénicas, como se visualiza en la última columna de la Tabla IV. Este hecho puede ser explicado tentativamente asumiendo que la proteína Spo0A9V no está ejerciendo un control negativo sobre el gene *abrB* como se ha asegurado (Perego, et al., 1991) por lo que la proteína AbrB mantiene su efecto represor sobre el gene *aprE*. Incluso para otras mutantes *spo0A* se ha sugerido la sobreproducción de la proteína AbrB (Perego, et al., 1988b). La determinación de hasta 25,000 unidades de actividad específica en la cepa BB808 y valores menores para las restantes tres cepas indican que esta represión no llega a ser total, lo cual había sido encontrado para otras mutantes *spo0A* (Ferrari, et al., 1986). El hecho de que se haya asignado acción represora sobre el gene *abrB* a la proteína Spo0A9V, obedece a los resultados de una serie de experimentos donde se midieron halos de proteólisis y la actividad beta-galactosidasa en fusiones *lacZ-abrB*. En el primer caso y por experiencia personal se ha encontrado que el criterio de medición de halos de proteólisis no es cuantitativo ni fácil de reproducir, mientras que en el segundo los resultados reportados en el mismo trabajo donde se describió la construcción de la mutante *spo0A9V* contradicen la discusión y conclusiones a que llegan estos autores (Perego, et al., 1991). En las cepas BB807 y BB808 se aprecia el mantenimiento de la actividad beta-galactosidasa por varias horas después de alcanzado el To lo cual contrasta con la rápida disminución de la actividad específica encontrada con las cepas BB803 y BB804. Este hecho da apoyo adicional a la idea de la posible falta de represión sobre el gene *abrB* pues en las mutantes *spo0A9V* la ausencia de sobreexpresión de proteasas, incluida la subtilisina, resulta en una menor velocidad de degradación de la beta-galactosidasa producida.

Respecto a los valores de densidad óptica (gráfica 6) los niveles determinados para estas cepas son similares a los encontrados en las cepas esporogénicas. De igual manera, como sucede con la cepa BB804 (*hpr2-degU^{h32}*), la cepa BB808 (*hpr2-degU^{h32}-spo0A9V*) mostró valores ligeramente superiores que todas las demás cepas *spo0A9V* construidas y las dos cepas que tienen la mutación *degU^{h32}* (BB807 y BB808) presentaron un adelanto en sus curvas de crecimiento.

Las diferencias arriba señaladas al estimar la biomasa tomando como medida las unidades de densidad óptica, no fueron encontradas cuando se determinó la concentración de proteína celular por mililitro de cultivo; como ya se señaló, este mismo comportamiento se detectó al medir las biomásas de las cuatro cepas esporogénicas construidas según este último criterio. De la gráfica 7 se aprecia que todas las cepas mantienen a lo largo de la curva de crecimiento niveles similares de biomasa y, como se observa también en las gráficas 5 y 6, es notado un ligero adelanto en las curvas de crecimiento para las cepas BB807 y BB808. Esto indica que la

mutación *spo0A9V* tuvo poco efecto sobre la velocidad específica de crecimiento y la concentración de biomasa alcanzada, según comparaciones hechas contra las mutantes esporogénicas. Dicho de otra manera, en el caso de las cepas *degU^{h32}-spo0A9V* la primera mutación parece causar el incremento en la velocidad específica de crecimiento y un adelanto en la curva de crecimiento mientras que la segunda mutación no modifica ambas cosas pues las mutantes se comportan de manera similar a las respectivas cepas esporogénicas (cepas BB803 y BB804).

Como sucede con la actividad específica, estas cepas deficientes en la esporulación presentan también una menor velocidad de producción (gráfica 8) y, contrario a lo esperado, no se aprecia que se mantengan produciendo por mucho más tiempo comparando contra las cepas esporogénicas (ver gráfica 4). Así entonces, no se encontró incremento alguno en la producción de beta-galactosidasa respecto a la mejor cepa anterior construida (cepa BB804). La explicación tentativa ya se indicó: una posible falta de regulación negativa sobre el gene *abrB*. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis es necesario construir una doble mutante *spo0A9V-abrB* y evaluar la producción de beta-galactosidasa pues se sabe que la mutación *abrB* remonta la baja expresión de proteasas en cepas *spo0A* (Ferrari, et al. 1986).

6.4.) Formulación de medio químicamente definido y fermentación de cepa BB804.

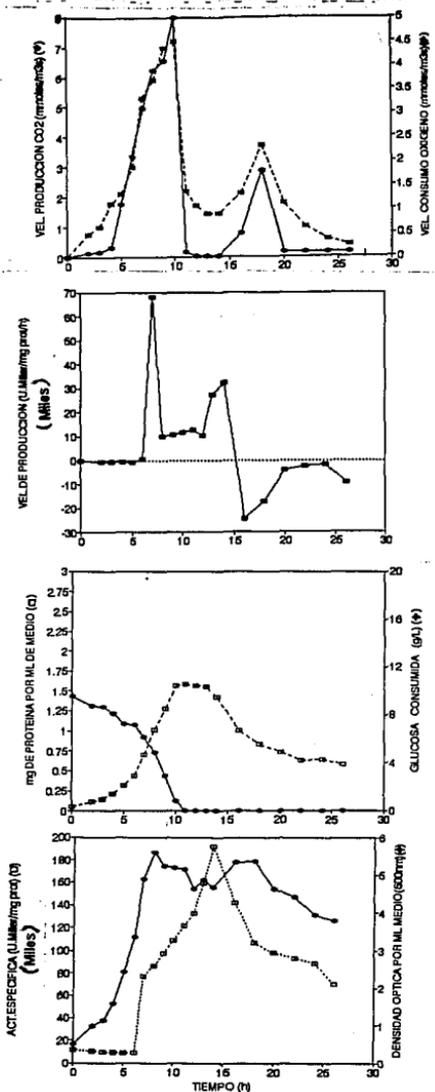
6.4.1.) Antecedentes.

Como parte de la línea de investigación del grupo, se tiene incluida la realización de estudios sobre *Bacillus subtilis* en el área de Tecnología de Fermentaciones y Bioingeniería. Tales estudios están iniciándose y los esfuerzos actuales se centran sobre aspectos básicos. Una de las necesidades más urgentes era el contar con al menos un medio químico definido para cultivos de *B. subtilis* que permitiera obtener información tan importante como: balances de masa y energía, cálculos de rendimiento y coeficiente respiratorio, velocidad de consumo de sustrato, etc. En virtud de que el medio Schaeffer es del tipo complejo, su composición varía de fabricante a fabricante y de lote a lote; posee también más de una fuente de carbono y nitrógeno por lo que no es posible emplearlo para los anteriores estudios. Por estas razones se trabajó en la formulación de un primer medio definido con el cual iniciar investigaciones que permitan conocer más de la fisiología de *B. subtilis* cuando se crece en cultivos tipo lote.

6.4.2.) Parte experimental.

En el caso de estudios comparativos a nivel de matraces, la actividad específica alcanzó valores similares a los encontrados en medio Schaeffer (aprox. 180,000-190,000 unidades Miller) pero la biomasa alcanzada fue un 25% mayor aquí.

En la Gráfica 10 se muestran los resultados obtenidos de una fermentación en vaso de 4 litros utilizando el medio definido aquí formulado y la cepa BB804. El estudio se realizó a 37 °C, 600 rpm y pH=7.00.



Gráfica 10. Resultados de la fermentación en medio químicamente definido para la cepa BB804 en vaso de 4 L.

TABLA V. CARACTERISTICAS DE PRODUCCION DE BETA-GALACTOSIDASA DE *E. coli* en *B. subtilis* CEPA BB804 y de *K. fragilis*.

	BB804	<i>K. fragilis</i> (Torres, 1992)
Medio	Químicamente definido que tiene glucosa, magnesio, manganeso, calcio y fierro.	Suero de leche o lactosa complementado con extracto de levadura y sales de amonio, fosfato, magnesio y azufre.
Condiciones	37°C, 600 rpm, pH=7.0 fermentador de 4L. Cultivo en lote. Sin optimizar condiciones de fermentación.	37°C, 600 rpm, pH=5.5, fermentador de 10L. Cultivo en lote. Condiciones de fermentación optimizadas.
Actividad	A las ocho horas de fermentación (T2), se obtienen en promedio 67.02×10^6 U/g _{cdl} .	A las doce horas de fermentación se obtienen en promedio 4×10^6 U/g _{cdl} .
Biomasa	4.05 g _{cdl} /L	9.0 g _{cdl} /L
Producción Volumétrica	271.4×10^6 U/L	36×10^6 U/L
Productividad	19.42×10^6 U/L/h	3.0×10^6 U/L/h

6.4.2.) Discusión de Resultados.

Para los datos mostrados en la gráfica 10 respecto al consumo de sustrato puede verse que el cultivo estuvo limitado, al menos, por la concentración de glucosa en el medio. Como no se midió nitrógeno, fósforo ni alguna de las sales empleadas, se ignora si concomitantemente fue(ron) agotado(s) alguno(s) de estos sustratos. El criterio de limitar las fermentaciones de *Bacillus subtilis* por control de la fuente de carbono es el más ampliamente utilizado (de Boer, et al., 1982; Kole, et al., 1988a, b), en gran parte debido a que se sabe que la esporulación de este microorganismo es reprimida por la presencia de glucosa en exceso (Fisher, 1987). Con respecto a la actividad específica de beta-galactosidasa, es observado que al cabo de cuatro horas de superado el T_0 se tiene el máximo para después decaer drásticamente. Este hecho es atribuido primero a la actividad proteolítica y también quizá, en parte, debido a la acción de autolisinas. De la misma manera puede explicarse el comportamiento encontrado al estimar la velocidad de producción; no obstante, es bien conocido que cuando las poblaciones microbianas llegan a estar limitadas por nutrientes, captan estos a partir de constituyentes celulares esenciales tales como ribosomas (Kaplan y Apirion, 1975) y en consecuencia pierden gradualmente su integridad metabólica y productividad, por lo que una respuesta más concisa puede darse considerando ambos hechos.

Un importante incremento en la biomasa producida fue logrado con el medio definido en comparación con la alcanzada en el medio Schaeffer (de hasta un 69%) y el análisis de las curvas de velocidad de consumo de oxígeno y de velocidad de producción de CO_2 muestra que ocurre un cambio importante en el comportamiento fisiológico de *B. subtilis* cuando el cultivo alcanza el T_0 , lo cual es reflejo de la serie de ajustes en su metabolismo realizados en tal punto. Así, la evaluación de ambos parámetros puede servir como parte de las estrategias de control para fermentaciones con *Bacillus subtilis*.

Como se aprecia de la tabla V, hasta el momento se tiene una cepa que produce aproximadamente siete veces más beta-galactosidasa respecto a un proceso optimizado que emplea a la levadura *K. fragilis* aún cuando la concentración de biomasa es tan sólo de aproximadamente la mitad y el proceso no tiene optimización alguna. En este sentido se pueden hacer mejoras considerando algunos estudios. Por ejemplo, se ha reportado que en cultivos de *B. subtilis* los niveles muy altos de nutrientes y sales amortiguadoras del pH así como nutrientes limitantes pueden ser de suma importancia en la formulación del medio de cultivo adecuado (Hanlon, et al., 1982) y que mediante un control simultáneo de las concentraciones de glucosa y amonio la producción de proteasas es incrementada (Kole, et al., 1988a). También por cultivo de tipo lote alimentado y controlando la concentración del oxígeno disuelto así como mediante la combinación de un medio de cultivo optimizado y cultivo de tipo lote alimentado se logra incrementar la producción de subtilisina (Moon y Parulekar, 1991). Finalmente, se ha reportado que controlando adecuadamente la concentración de glucosa en la fase estacionaria se logra disminuir considerablemente la tendencia a la autólisis (Joliffe, et al., 1981). Una o más de estas estrategias de control así como la optimización del medio y/o condiciones ambientales y la construcción de cepas sobreproductoras con mayores ventajas, redundarán en un incremento en la producción de la enzima beta-galactosidasa con lo que se tendrá un proceso de posible interés industrial. En este sentido, consideraciones adicionales tales como estudios del tamaño del mercado y otras de índole económica deben ser previamente planteadas y contestadas. Tales aspectos escapan a los objetivos de este trabajo por lo que no se intentó abordarlos aquí.

DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo fueron evaluados los efectos de diversas mutaciones sobre la expresión del gene *lacZ* de *Escherichia coli* puesto bajo control de la región regulatoria del gene *aprE* de *Bacillus subtilis*. Se ha logrado la sobreproducción de la enzima beta-galactosidasa. La mejor cepa productora de *B. subtilis* fue aquella que posee la doble mutación *hpr2-degU³²*, con la cual se alcanzan hasta 200,000 unidades de actividad específica. Sin embargo, la acción proteolítica de las proteasas sintetizadas también en el estado de transición obligan a contemplar la construcción de nuevas cepas con mejores características. Una manera posible de superar el problema de la degradación de la enzima expresada consiste en construir cepas deficientes en la biosíntesis de proteasas para así lograr mantener la beta-galactosidasa producida por más tiempo. No obstante, tal objetivo no es fácil de cubrir pues un factor adicional a considerar es que mutantes con estas características ya han sido patentadas. Por ello la manera en que se abordó el problema fue tratando de aumentar la producción mediante la utilización de cepas que fueran incapaces de esporular. Se empleó entonces la mutación *spo0A9V* porque había sido reportada como la única que expresaba una proteína que mantenía su acción regulatoria normal sobre el gene *abrB* y al mismo tiempo no activaba al gene *spolIE*. Se creyó que de esta manera se podría mantener a la célula produciendo beta-galactosidasa por más tiempo entre el estadio 0 y II del programa de diferenciación que conduce a la formación de una espora. Los resultados obtenidos aquí para las cepas *spo'* no fueron los esperados y hacen pensar en la falta de regulación sobre el gene *abrB*; esto claramente contradice los resultados ya citados que se han reportado en la literatura. Como un problema de la sobreexpresión del gene *lacZ* en algunas cepas, como la BB804, es también la lisis de la célula, otra posible alternativa para mantener la producción de beta-galactosidasa consiste en construir mutantes que tengan deleciones en los genes que inducen lisis (genes *lyt*). Estos genes parecen ser parte de un programa de muerte celular (apoptosis) y actualmente en el laboratorio se está comenzando a trabajar con ellos (de Anda, comunicación personal).

Adicionalmente, el cultivo de *Bacillus subtilis* en medio químico definido ha permitido aumentar la producción de beta-galactosidasa y cabe destacar que falta aún mucho por hacer respecto a la optimización del proceso, lo que seguramente resultará en un incremento en la cantidad de enzima producida. En el presente trabajo se logró la producción de hasta siete veces más beta-galactosidasa proveniente de *E. coli* que la obtenida en un proceso optimizado donde se utilizó la levadura *K. fragilis*.

PERSPECTIVAS

- Construir cepas deficientes en la expresión de proteasas intra y extracelulares para evitar la degradación proteolítica de la beta-galactosidasa producida.
- Construir cepas con deleciones en los genes *lyt* para mantener por más tiempo la integridad de la célula.
- Demostrar la posible falta de represión de la proteína Spo0A9V sobre el gene *abrB* mediante la construcción de mutantes.
- Mejorar la producción de beta-galactosidasa mediante estudios en el área de tecnología de fermentaciones y eventualmente optimizar el proceso.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guillermo Gosett por la asesoría en la construcción del plásmido paprlac2; a los Drs. Eugenio Ferrari y Stuart Causey por su ayuda para los estudios de transducción con pBS-1 y la selección de mutantes *spo0A9V*, respectivamente. A Jorge Olmos por la ayuda brindada a lo largo del proyecto. También al M. en C. Alfredo Martínez con quien tuve la fortuna de trabajar en el área de fermentaciones. A mi amigo Raúl Noguez quien tuvo la gentileza de enseñarme el manejo del paquete Gene Construction Kit. A mis compañeras y amigas Paulina Balbás, Elizabeth Ponce, Queta Muñoz y Araceli Molina de quienes aprendí mucho más que Biología Molecular. A Ramón de Anda y Noemí Flores por compartir sus experiencias conmigo así como al resto de los compañeros del laboratorio por todo su generoso apoyo. De manera especial al Dr. Fernando Valle Baheza por haberme confiado, en un momento difícil, el desarrollo del proyecto amén de toda su paciencia y el cúmulo de enseñanzas recibidas. Finalmente, a cada uno de los miembros del Comité Tutorial: Dr. Francisco Bolívar Zapata, Dr. Fernando Valle Baheza, Dra. Alejandra Bravo de la Parra y Dr. Héctor Pérez Reyes quienes han sido desde entonces parte fundamental de mi desarrollo académico.

REFERENCIAS

- Anagnostopoulos, C. y Spizizen, J. (1961). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 81, 741-746.
- Anagnostopoulos, C., Piggot, P.J. y Hoch, J.A. (1993). The Genetic Map of *Bacillus subtilis*. Capítulo 29 en *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria. (Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. y Losick, R. ed.) American Society for Microbiology, USA. p. 425-462.
- Ash, C., Farrow, J.A., Walbanks, S. y Collins, M.D. (1991). Letters of Applied Microbiology. 13, 202-206.
- Aubert, E., Klier, A. y Rapoport, G. (1985). Cloning and Expression in *E. coli* of the Regulatory *sacU* Gene from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 161, 3:1182-1187.
- Audit, C. y Anagnostopoulos, C. (1972). Spores V. p. 117-125.
- Bai, U., Mulec-Mandic, I. y Smith, I. (1993). SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. *Genes and Development* 7: 139-148.
- Birnboim, H. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acid. Res.* 7: 1513-1523.
- Bott, K.F. y Wilson, G.A. (1968). Metabolic and nutritional factors influencing the development of competence for transfection in *Bacillus subtilis*. *Bacteriol. Rev.* 32: 370-378.
- Bron, S., Peijnenburg, A., Petters, B., Haima, P. y Venema, G. (1989). en *Genetic Transformation and Expression*. (Buttler, L.D., Harwood, C.R. y Moseley, B.E. ed.) p. 205-219.
- Burbulys, D., Trach, K.A. y Hoch, J.A. (1991). Initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell*, 64: 545-552.
- Chibazakura, T., Kawamura, F. y Takahashi, H. (1991). Differential Regulation of *spo0A* Transcription in *Bacillus subtilis*: Glucose Represses Promoter Switching at the Initiation of Sporulation. *J. Bacteriol.* 173: 2625-2632.
- Clarke, S. y Mandelstam, J. (1980). Dissociation of an early event in sporulation from chromosome replication in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 121: 487-490.

- Claus, D. y Fritze, D. (1989). en *Biotechnology Handbook 2: Bacillus* (Harwood, C.R. ed.). Plenum Press, USA. p. 5-26.
- Coughlin, R.W. y Charles, M. (1980). Applications of Lactase and Immobilized Lactase in Immobilized Enzymes for Food Processing (Pitcher, H.W. ed.) CRC Press, USA. p. 154-171.
- Coxon, R.D., Harwood, C.R. y Archibald, A.R. (1991). Protein export during growth in *Bacillus subtilis*: the effect of extracellular protease deficiency. *Letters in Applied Microbiology*, 12: 91-94
- Craven, G.R., Steers, E. Jr. y Anfinsen, C.B. (1965). Purification, Composition and Molecular Weight of the Beta-Galactosidase of *Escherichia coli* K12. *J. of Biol. Chem.* 240, 6: 2468-2477.
- Cutting, S.M. y Vander Horn, P.B. (1990) en *Molecular Methods for Bacillus*. (Harwood, C.R. y Cutting, S.M. ed.) John Wiley & sons. p.27-74.
- Dahl, M.K., Msadek, T., Kunst, F. y Rappoport, G. (1992). The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 267: 14509-14514.
- de Boer, W.R., Meyer, P.D., Jordens, C.G., Kruyseen, F.J. y Wouters, J.T. (1982). Cell Wall Turnover in Growing and Nongrowing Cultures of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 149: 977-984.
- Difco, Laboratories. (1985). *Difco Manual*. Tenth edition, USA. p. 1032.
- Dod, B. y Balassa, B. (1978). *Mol. Gen. Genet.* 163: 57-63.
- Dunn, G., Jeffs, P., Mann, H., Torgersen, D.M. y Young, M. (1978). The relationship between DNA replication and the induction of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 108: 189-195.
- Errington, F. (1993). *Bacillus subtilis* Sporulation: Regulation of Gene Expression and Control of Morphogenesis. *Microbiol. Rev.* 57, 1: 1-33.
- Fellows, P. (1988). *Food Processing Technology. Principles and practice*. VCH-Ellis Horwood. England. p.179.
- Ferrari, E., Henner, D.J., Perego, M. y Hoch, J.A. (1988). Transcription of *Bacillus subtilis* Subtilisin and Expression of Subtilisin in Sporulation Mutants. *J. Bacteriol.* 170, 1: 289-295.

- Ferrari, E. y Hoch, J.A. (1982). en *Molecular Cloning and Gene Regulation* (Ganesan, A.T., Chang, S. y Hoch, J.A. ed.). Academic Press. p. 53-61.
- Ferrari, E., Howard, S.M. y Hoch, J.A. (1986). Effect of Stage 0 Mutations on Subtilisin Expression. *J. Bacteriol.* 166, 1: 173-179.
- Ferrari, F.A., Trach, K., Le Coq, D., et al. (1985). Characterization of *spoOA* locus and its deduced product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 2647-2651.
- Ferrari, F.A., Trach, K. y Hoch, J.A. (1985). Sequence Analysis of the *spoOB* Locus Reveals a Polycistronic Transcription Unit. *J. Bacteriol.* 161: 556-562.
- Fisher, S. (1987). Catabolite repression in *Bacillus subtilis* and *Streptomyces* en Sugar transport and metabolism in Gram-positive bacteria. (Reizar, J. y Peterkosky, A. ed.) Ellis Harwood Limited. Chichester, England. p. 365-385.
- Fresse, E. (1981). Initiation of bacterial sporulation en *Sporulation and Germination*. (Levinson, H.S., Sonenshein, A.L. y Tipper, D.J. ed.) American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 1-12.
- FürbaB, R., Gocht, M., Zuber, P. y Marahiel, M.A. (1991). Interaction of AbrB, a transcriptional regulator from *Bacillus subtilis* with the promoters of the transition state-activated genes *tycA* and *spoVG*. *Mol. Gen. Genet.* 225: 347-354.
- FürbaB, R. y Marahiel, M.A. (1991). Mutant analysis of interaction of the *Bacillus subtilis* transcription regulator AbrB with the antibiotic biosynthesis gene *tycA*. *FEBS* 1, 2: 153-156.
- García-Garibay, M. (1992). Recuperación de enzimas intracelulares de interés industrial. *Ciencia*, 43: 23-33.
- Gaur, N.K., Cabane, K. y Smith, I. (1988). Structure and Expression of the *Bacillus subtilis* *sin* Operon. *J. Bacteriol.* 170: 1046-1053.
- Gaur, N.K., Dubnau, E. y Smith, I. (1986). Characterization of a Cloned *Bacillus subtilis* Gene That Inhibits Sporulation in Multiple Copies. *J. Bacteriol.* 168: 860-869.
- Gerhartz, W. (1990). *Enzymes in Industry. Production and Applications*. VCH, Weinheim. p. 123-124.
- Grossman, A.D. (1991). Integration of developmental signals and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 65: 5-8.

- Grossman, A.D. y Losick, R. (1988). Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 4369-4373.
- Gruss, A.D. y Ehrlich, S.D. (1989). Microbiol. Rev. 53, 231-241.
- Hanlon, G.W., Hodges, N.A. y Rusell, A.D. (1992). The influence of glucose, ammonium, and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*. J. Gen. Microbiol. 128: 845-851.
- Harwood, R.C. (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives in molecular biological and industrial workhorses. Trends in Biotechnology. 10: 247-256.
- Harwood, C.R., Coxon, R.D. y Hancock, I.C. (1990). The *Bacillus* envelope and secretion. en Molecular biological methods for *Bacillus*. (Harwood, C.R. y Cutting, S.M. ed.). John Wiley & sons. Chichester, England. p. 327-390.
- He, X.S., Brückner, R. y Doi, R.H. (1991). The protease genes of *Bacillus subtilis*. Res. Microbiol. 142: 797-803.
- Henner, D.J., Ferrari, E., Perego, M. y Hoch, J.A. (1988a). Location of the Targets of the *hpr-97*, *sacU32(Hy)* and *sacQ36 (Hy)* Mutations in Upstream Regions of the Subtilisin Promoter. J. of Bacteriol. 170, 1: 296-300.
- Henner, D.J., Yang, M. y Ferrari, E. (1988b). Localization of *Bacillus subtilis sacU(Hy)* Mutations to Two Linked Genes with Similarities to the Conserved Prokaryotic Family of Two-Component Signalling Systems. J. Bacteriol. 170, 11: 5102-5109.
- Higerd, T.B., Hoch, J.A. y Spizizen, J. (1972). Hyperprotease-producing mutants of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 112: 1026-1028.
- Hitchins, A.D. y Slepecky, R.A. (1969). Bacterial spore formation as a modified prokaryotic cell division. Nature, 223: 804-807.
- Hoch, J.A. (1991). Methods. Enzymol. 204: 305-320.
- Honjo, M., Nakayama, A., Fukazawa, K., et al. (1990). A Novel *Bacillus subtilis* Gene Involved in Negative Control of Sporulation and Degradative-Enzyme Production. J. Bacteriol. 172: 1783-1790.
- Houts, S.S. (1988). Lactose Intolerance. Food Technology. March p.110-113.
- Ito, J. y Spizizen, J. (1973). Colloq. Int. C.N.R.S. 227: 81-82.

- Jolliffe, L.K., Doyle, R.J. y Streips, U.N. (1980). Extracellular Proteases Modify Cell Wall Turnover in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 141: 1199-1208.
- Jolliffe, L.K., Doyle, R.T. y Streips, U.N.(1981). The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. Cell, 25: 753-763.
- Kaplan, R. y Apirion, D. (1975). Decay of ribosomal acid in *Escherichia coli* cells starved for various nutrients. J. Biol. Chem. 250: 3174-3178.
- Karamata, D. y Gross, J.D. (1970). Isolation and Genetic Analysis of Temperature-Sensitive Mutants of *Bacillus subtilis* Defective in DNA Synthesis. Mol. Gen. Genet. 108: 277-287.
- Kole, M.M., Draper, L. y Gerson, D.F. (1988a). Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. J. Chem. Tech. Biotechnol. 41: 197-206.
- Kole, M.M., Draper, L. y Gerson, D.F. (1988b). Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen-controlled, glucose fed-batch fermentations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 404-408.
- Kunkel, B. (1991). Compartmentalized gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. Trends in Genetic. 7, 5: 167-172.
- Kunst, F., de Barbouille, M., Msadek, T., et al. (1988). Deduced Polypeptides Encoded by the *Bacillus subtilis* *sacU* Locus Share Homology with Two-Component Sensor-Regulator Systems. J. Bacteriol. 170: 5093-5101.
- Kunst, F. y Devine, K. (1991). The project of sequencing the entire *Bacillus subtilis* genome. Res. Microbiol. 142: 905-912.
- Laskin, A.I. (1985). Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology. The Benjamin Cummins Publishing Co. Inc. USA. p. 14-19.
- Lee, D.H. y Schlieff, R.F. (1989). *In vivo* DNA loops in *araCBAD*: Size limits and helical repeat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 476-480.
- López, J.M., Dromerick, A. y Freese, G. (1981). Response of Guanosine 5'-triphosphate Concentration to Nutritional Changes and Its Significance for *Bacillus subtilis* Sporulation. J. Bacteriol. 146, 2: 605-613.
- López, J.M., Marks, L.L. y Freese, E. (1979). The decrease of guanine nucleotides initiates sporulation of *Bacillus subtilis*. Biochem. Biophys. Acta 587: 238-252.

- López, J.M., Uratani-Wong, B. y Freese, E. (1980). Catabolite Repression of Enzyme Synthesis Does Not Prevent Sporulation. *J. Bacteriol.* 141, 3: 1447-1449.
- Lovet, P. S. y Young, F.E. (1970). Genetic Analysis in *Bacillus pumilus* by PBS-1-mediated Transduction. *J. Bacteriol.* 101: 603-608.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, K.T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marahiel, M.A., Zuber, P., Czekay, G. y Losick, R. (1987). *J. Bacteriol.* 169: 2215-2222.
- Maurizi, M.R. y Switzer, R.L. (1980). Proteolysis in bacterial sporulation. *Current. Top. Cell. Regul.* 16: 163-224.
- Melchers, F. y Messer, W. (1973). The Activity of Individual Molecules of Hybrid B-Galactosidase Reconstituted from the Wild Type and an Inactive-Mutant Enzyme. *Eur. J. Biochem.*, 34: 228.
- Miller, H.J. (1992). *A Short Course in Bacterial Genetic.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA p. 61-63.
- Moon, S.H. y Parulekar, S.J. (1991). A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnol. Bioeng.* 37: 467-483.
- Moran, C.P. Jr., Lang, N., Le Grice, S.F., et al. (1982). *Mol. Gen. Genet.* 186: 339-346.
- Morisi, F., Pastore, M. y Viglia, A. (1973). Reduction of Lactose Content of Milk by Entrapped Beta-Galactosidase. I. Characteristics of Beta-Galactosidase from Yeast and *Escherichia coli*. *J. of Dairy Sci.* 56, 9: 1123-1127.
- Msadek, T., Kunst, F., Henner, D., et al. (1990). Signal Transduction Pathway Controlling Synthesis of a Class of Degradative Enzymes in *Bacillus subtilis*: Expression of the Regulatory Genes and Analysis of Mutations in *degS* and *degU*. *J. Bacteriol.* 172, 2: 824-834
- Mukai, K., Kawata, M. y Tanaka, T. (1990). Isolation and Phosphorylation of the *Bacillus subtilis degS* and *degU* Gene Products. *J. Biol. Chem.* 265, 32: 20000-20006.
- Nagami, Y. y Tanaka, T. (1986). Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of a DNA Fragment from *Bacillus natto* That Enhances Production of Extracellular Proteases and Levansucrase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 166: 20-28.

- Nijpels, M.H. (1982). Lactases. Capítulo 2 en Developments in Food Carbohydrate-3. (Lee, C.K. y Lindley, M.G. ed.). Applied Science Publishers, London. p. 23-47.
- Oehler, S., Eismann, E.R., Kramer, H. y Muller-Hill, B. (1990). EMBO J. 8, 973-979.
- Perbal, B. (1988). A practical guide to molecular cloning. 2nd. ed. John Wiley & sons. USA. p. 394-411.
- Perego, M. y Hoch, J.A. (1988). Sequence Analysis and Regulation of the *hpr* Locus, a Regulatory Gene for Protease Production and Sporulation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 170, 6: 2560-2567.
- Perego, M., Spiegelman, G.B. y Hoch, J.A. (1988). Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. Molec. Microbiol. 2, 6:689-699.
- Perego, M., Wu, J., Spiegelman, G.B. y Hoch, J.A. (1991). Mutational dissociation of the positive and negative regulatory properties of the Spo0A sporulation transcription factor of *Bacillus subtilis*. Gene, 100: 207-212.
- Priest, F.G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bact. Rev. 41: 711- 753.
- Priest, F.G. (1989). en Biotechnology Handbooks 2: *Bacillus* (Harwood, C.R. ed.) Plenum Press, USA. p.27-56.
- Priest, F.G., Goodfellow, M. y Todd, C. (1981). en The Aerobic Endospore-Forming Bacteria: Classification and Identification (Berkeley, R.C. y Goodfellow, M. eds). Academic Press. p.91-103.
- Robertson, J.B., Gocht, M., Marahiel, M.A. y Zuber, P. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 21: 8457-8461.
- Ronson, C.W., Nixon, B.T. y Ausubel, F.M. (1987). Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. Cell, 49: 579-581.
- Satola, S.W., Baldus, J.M. y Moran, C.P. Jr. (1992). Binding of Spo0A stimulates *spoIIG* Promoter Activity in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 174: 1448-1453.
- Satola, S.W., Kirchman, P.A. y Moran, C.P. Jr. (1991). Spo0A binds to a promoter used by sigma A RNA polymerase during sporulation in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 4533-4537.

- Schaeffer, P., Millet, J. y Aubert, J. (1965). Catabolite repression of bacterial sporulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 54, 704-711.
- Sharp, A.K., Kay, G. y Lilly, M.D. (1969). The kinetics of beta-galactosidase attached to porous cellulose sheets. Biotech. Bioeng. 11: 363-368.
- Sietske, de Boer, A. y Diderichsen, B. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 1-4.
- Simoons, F.J. (1978). The geographic hypothesis and lactose malabsorption: A weighing of the evidence. Digest. Dis. 23: 963.
- Sonenshein, A.L. (1989). Metabolic regulation of sporulation and other stationary-phase phenomena. en Regulation of prokaryotic development: a structural and functional analysis of sporulation and germination (Smith, I. Slepecky, R.A. y Setlow, P. eds.) American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 109-130.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J. y Stock, A.M. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol. Rev. 53: 450-490.
- Strauch, M.A., Spiegelman, G.B., Perego, M. et al., (1989a). EMBO J. 8, 1615-1621.
- Strauch, M.A., Perego, M., Burbulys, D. y Hoch, J.A. (1989b). Mol. Microbiol. 3, 1203-1209.
- Strauch, M., Webb, V., Spiegelman, G. y Hoch, J.A. (1990). The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1801-1805.
- Switzer, R.L. (1977). The inactivation of microbial enzymes in vivo. Ann. Rev. Microbiol. 31, 135-157.
- Tomioka, N., Honjo, M. y Funahashi, K. (1985). J. Biotechnol. 3, 85-96.
- Torres, C.L. (1992). Contribución al desarrollo de un proceso para la obtención de un biocatalizador con actividad de beta-galactosidasa que puede ser aplicado en leche y suero dulce de leche. Tesis Doctoral. UACPyP-CCH, Universidad Nacional Autónoma de México. p. 5-16.
- Trowsdale, J., Chen, S. y Hoch, J.A. (1979). Molec. Gen. Genet. 173: 71-72.
- Valle, F. y Ferrari, E. (1989). Subtilisin: a Redundantly Temporally Regulated Gene? Capítulo 6 en Regulation of Prokaryotic Development (Smith, I., Slepecky, A. y Setlow, P. eds). American Society for Microbiology. p.131-146.

- Waldburger, L., González, D. y Chambliss, G. H. (1993). Characterization of a New Sporulation Factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175, 19: 6321-6327.
- Wang, L.F. y Doi, R.H. (1990). Complex Character of *senS*, a Novel Gene Regulating Expression of Extracellular-Protein Genes of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 172: 1939-1947.
- Wang, L.F., Wong, S.L., Park, S.S. y Doi, R.H. (1988) en *Bacillus Molecular Genetics and Biotechnology Applications*. Vol. 3 (Ganesan, A. y Hoch, J.A. ed.). Academic Press Inc. New York. p.45-60.
- Wu, Xu-Chu., Lee, W., Tran, C. y Wong, S. (1991). Engineering a *Bacillus subtilis* Expression-Secretion System with a Strain Deficient in Six Extracellular Proteases. *J. Bacteriol.* 173, 16: 4952-4958.
- Yamashita, S., Kawamura, F., Yoshikawa, H. et al., (1989). Dissection of the expression signals of the *spoOA* gene of *Bacillus subtilis*: glucose sporulation-specific expression. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1335-1345.
- Yang, M., Ferrari, E., Chan, E. y Henner, D.J. (1986). Identification of the Pleiotropic *sacQ* Gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 166- 113-121.
- Yasura, D.G. y Henner, D.J. (1984). Use of the *Escherichia coli lac* repressor and operator to control gene expression in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 439-443.
- Youngman, P. (1990). en *Molecular Methods for Bacillus* (Harwood, C.R. y Cutting, S.M. eds.) John Wiley & sons. p. 221-266.
- York, K., Kenney, T.J., Satola, S., et al. (1992). Spo0A controls the sigmaA-dependent activation of *Bacillus subtilis* sporulation-specific transcription unit *spolIE*. *J. Bacteriol.* 174: 2648-2658.
- Zuber, P y Losick, R. (1987). Role of the AbrB in Spo0A and Spo0B-dependent utilization of a sporulation promoter in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169, 5: 2223-2230.
- Zukowski, M.M. (1992). Production of Commercially Valuable Products Capítulo 11 en *Biology of Bacilli*. (Doi, R.H. y Mc Gloughlin, M. ed). Butterworth-Heinemann, USA p. 311-331.
- Zukowski, M.M. y Miller, L. (1986). Hyperproduction of an intracellular heterologous protein in a *Sacu^h* mutant of *Bacillus subtilis*. *Gene* 46: 247-255.