



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de la inactivación del sistema de
fosfotransferasa en *Bacillus subtilis*
sobre la capacidad de síntesis de
la proteína verde fluorescente**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Ingue Karen Carrasco Espinosa



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Guillermo Gosset Lagarda
2014**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS

1. Datos del alumno

Carrasco Espinosa Ingue Karen

57446397

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

40608540-1

2. Datos del tutor

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

3. Datos de jurado

Dr. José Luis Puente García (Presidente)

Dr. Luis Felipe Jiménez García (Vocal)

Dr. Guillermo Gosset Lagarda (Secretario)

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera

4. Datos de la tesis

Efecto de la inactivación del sistema de fosfotransferasa en *Bacillus subtilis*
sobre la capacidad de síntesis de la proteína verde fluorescente

126 p

2014

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Guillermo Gosset Lagarda en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México

Quisiera agradecer al Dr. Guillermo Gosset por ser una guía con gran claridad, paciencia y sentido humano en el mundo científico.

A mí jurado por su valioso tiempo y correcciones hechas a este trabajo; al Dr. José Luis Puente por la confianza y el apoyo expresado en el taller “La biología a partir de la biomoléculas: nuevos paradigmas y aplicaciones”, al Dr. Luis Felipe por enseñarme la pasión por la biología molecular, al Dr. Adelfo por su apoyo durante y después del trabajo de laboratorio y al M. en C. Alfonso Vilchis por su genuino interés y comentarios.

Al M. en C. Ramón de Anda por su apoyo entusiasta en todo lo que a proteínas respecta, a la M. en C. Georgina Hernández por la atención y paciencia con las muestras de *Bacillus* que siempre tapaban las columnas de HPLC, a la Biol. Erika Melchy del laboratorio de la Dra. Yvonne Rosenstein por el apoyo intrainstitucional que caracteriza al IBt y su ayuda en el uso del citómetro de flujo, al Dr. Paul Gaytán y al M. en C. Jorge Arturo Yañez de la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBt por su apoyo en la síntesis de oligos y la secuenciación del plásmido pSSBm85/XylR; al QFB Miguel Cisneros del laboratorio del Dr. Jean Louis Charli por su apoyo en el uso del fluorímetro, de manera muy especial y con mucho cariño a la Q.I. Luz María Martínez (LuzMa) que me llevo de la mano (literalmente) en el desarrollo de cada técnica aquí utilizada, y que vigiló y ayudó desde la planeación hasta la presentación de estos resultados, agradezco también su orientación en el plano personal y el haberme permitido conocer a su maravillosa familia.

A la Dra. Natividad Cabrera por dejarme jugar con sus monstruitos producto de la evolución adaptativa, por toda la información proporcionada y sus valiosos consejos.

A la C.D. Mercedes Enzaldo (Mechita) y a Aure que como a nadie, les debo el poder haber realizado los experimentos.

A todos los compañeros del laboratorio Bolívar-Gosset: Ale, Andrea, César, Estefa, Hanna, Iván, JJ, José, Karla, Mitsue, Sara y Susy por hacer divertido este viaje.

Por su puesto agradezco a mi Facultad por haberme enseñado en lo académico, en la lucha social y el haberme permitido conocer a grandes personas y amigos entre los que destaco a mis compadres Alejandro Ángeles y Paulina Guerrero con quienes compartí grandes momentos, pero sobre todo al amor en la persona de Alan quien me ha apoyado en todo momento difícil desde el primer día que lo conocí, así como su familia la cual considero mía también.

A mis padres Guillermo e Ingie que sin su apoyo incondicional y confianza originado por el inmenso amor que me tienen no estaría viva, les agradezco por los valores inculcados, la libertad de hacer lo que he querido hacer incluido el haber escogido esta hermosa carrera. A mi querido hermano Guillermo José por su cariño y compañía.

A las familias Carrasco-Espinosa que son un ejemplo de esfuerzo, trabajo, fortaleza y superación. A mis abuelos Raymundo, Conchita, José Luis y Elenita que los llevo siempre en el corazón, tíos, primos y sobrinos por su cariño sincero; esperando construir un círculo sólido de apoyo.

Por último a la personita más importante, mi corazoncito Darío cuya sonrisa ha sido el motor de mi vida desde que nació.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
ABREVIATURAS.....	13
I. RESUMEN	16
II. INTRODUCCIÓN	18
II.1 Biotecnología	18
II.2 Producción de proteína recombinante	19
II.3 <i>Bacillus subtilis</i> 168	22
II.4 Metabolismo de carbohidratos	23
II.5 Sistema de fosfotransferasa.....	26
II.6 Sistema de expresión génica inducible por xilosa.....	29
II.7 Secreción proteica en <i>Bacillus</i>	30
II.8 Proteínas modelo para el estudio de producción	32
II.8.1 Proteína verde fluorescente (GFP)	33
III. ANTECEDENTES	35
III.1 Ingeniería de Vías Metabólicas.....	35
III.2 Producción de GFP en <i>Escherichia coli</i> PTS ⁻	35
III.3 Producción de GFP en <i>Bacillus megaterium</i>	37
III.4 Evolución adaptativa de <i>Bacillus subtilis</i> 168 CVPTSGHI.....	39
IV. JUSTIFICACIÓN	41
V. HIPÓTESIS	42
VI. OBJETIVOS	42
VI.1 Objetivo general.....	42
VI.2 Objetivos particulares	42
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	43
VII.1 Instrumentos, químicos y kits.....	43
VII.1.1 Instrumentos	43
VII.1.2 Químicos y reactivos	44
VII.2 Cepas bacterianas y plásmidos	44
VII.3 Medio de cultivo y adicionales.....	46
VII.3.1 Medios de cultivo	46

VII.3.2	Adicionales	48
VII.4	Técnicas microbiológicas	48
VII.4.1	Esterilización	48
VII.4.2	Cultivo en placa	48
VII.4.3	Cultivo líquido	49
VII.4.4	Densidad celular	49
VII.4.5	Almacenamiento de bacterias	49
VII.5	Técnicas de biología molecular	50
VII.5.1	Extracción de DNA plasmídico en cepas de <i>E. coli</i>	50
VII.5.2	Digestión enzimática de DNA	50
VII.5.3	Ligación de DNA	50
VII.5.4	Cuantificación de ácidos nucleicos	51
VII.5.5	Preparación y transformación de células electro-competentes de <i>E. coli</i>	51
VII.5.6	Preparación y transformación de células competentes de <i>B. subtilis</i>	51
VII.5.7	Separación electroforética de DNA	52
VII.5.8	Secuenciación del plásmido pSSBm85XylR ⁻	52
VII.6	Técnicas bioquímicas	53
VII.6.1	Expresión de genes recombinantes en <i>B. subtilis</i>	53
VII.6.2	Análisis de auto-fluorescencia en <i>B. subtilis</i>	54
VII.6.3	Preparación de la fracción intracelular proteica	54
VII.6.4	Separación electroforética de proteínas	54
VII.6.5	Medición de fluorescencia de la proteína verde	56
VII.6.6	Análisis de proteasas	58
VII.6.7	Concentración de azúcares y productos del cultivo	58
VII.7	Cálculos de parámetros cinéticos y estequiométricos	59
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
VIII.1	Caracterización de las cepas evolucionadas de <i>B. subtilis</i> transformadas con pSSBm85	60
VIII.2	Versión constitutiva del plásmido pSSBm85	71
VIII.3	Caracterización de las cepas evolucionadas de <i>B. subtilis</i> transformadas con pSSBm85/XylR ⁻	73
VIII.4	Producción de la proteína GFP en <i>B. subtilis</i>	84
IX.	CONCLUSIONES	100
X.	PERSPECTIVAS	101
XI.	BIBLIOGRAFÍA	102

XII.	ANEXOS	110
XII.1	Clasificación WHO. Indicaciones terapéuticas	110
XII.2	Protocolos	111
XII.2.1	Preparación de <i>E. coli</i> electro-competentes utilizando un medio de crecimiento libre de sales.....	111
XII.2.2	Método de transformación para <i>Bacillus</i>	112
XII.2.3	Test caseinasa modificado.....	113
XII.3	Curvas patrón para la cuantificación de azúcares y ácidos en HPLC	115
XII.4	Perfiles de fluorescencia en citómetro de flujo	118
XII.4.1	Perfil de fluorescencia y porcentaje de la población GFP-activa.....	122
XII.5	Tablas de fluorescencia de GFP en cepas de <i>B. subtilis</i> y evolucionadas.....	123
	Tabla XII.5 a Cinética de fluorescencia de las cepas de <i>B. subtilis</i> 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85 en medio LB-glucosa.	123
	Tabla XII.5 b Cinética de fluorescencia de las cepas de <i>B. subtilis</i> 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85 en medio LB-xilosa	124
	Tabla XII. 5 c Cinética de fluorescencia de las cepas de <i>B. subtilis</i> 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85-XylR- en medio LB-glucosa	125
	Tabla XII. 5 d Cinética de fluorescencia de las cepas de <i>B. subtilis</i> 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85-XylR- en medio LB-xilosa.....	126

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura II. a** Productos biofarmacéuticos aprobados por año desde 1982
- Figura II. b** Biofarmacéuticos recombinantes en diferentes sistemas de producción agrupados por indicaciones terapéuticas
- Figura II. c** Número acumulado de productos biofarmacéuticos recombinantes aprobados en EU y UE
- Figura II. d** Árbol de distancia evolutiva que muestra la heterogeneidad filogenética del género *Bacillus*
- Figura II. e** Relación entre la ruta de las pentosas fosfato y glucólisis
- Figura II. f** Sistema de fosfotransferasa en *B. subtilis*
- Figura II. g** Redes mediadas por CcpA en *B. subtilis*
- Figura II. h** Características principales del sistema de expresión génica inducible por xilosa para *Bacillus megaterium*
- Figura II. i** Transporte de proteína dependiente de Sec en *Bacillus subtilis*.
- Figura II. j** Representación de la estructura tridimensional de la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* (Thr65)
- Figura III. a** Vías de producción de acetato a partir de glucosa en *E. coli*
- Figura III. b** Dinámica del proceso de evolución de la cepa CVPTSGHISp
- Figura VII. a** Estrategia experimental para generar el plásmido pSSBm85/XylR-
- Figura VII. b** Población de *B. subtilis* 168 GFP-negativa
- Figura VIII. a** Cinéticas de crecimiento celular y de producción en *B. subtilis* 168 y evolucionadas transformadas con el plásmido pSSBm85
- Figura VIII. b** Velocidad específica de consumo de glucosa y producción de ácido acético en las cepas de *B. subtilis* 168 y evolucionadas transformadas con pSSBm85
- Figura VIII. c** Biomasa y ácido acético producidos por las cepas de *B. subtilis*: 168, CV842, CV846 y CV863 transformadas con el plásmido pSSBm85 durante la fase de crecimiento exponencial en medio LB glucosa y xilosa
- Figura VIII. d** Rendimiento biomasa-sustrato de los cultivos de *B. subtilis*: 168, CV842, CV846, CV863 y CV879 en medio LB con glucosa/xilosa.
- Figura VIII. e** Digestión del plásmido pSSBm85 con la enzima XbaI

Figura VIII. f Alineamiento de las secuencias de pSSBm85 y pSSBm85/XylR-

Figura VIII. g Cinéticas de crecimiento celular y de producción en *B. subtilis* 168 y evolucionadas transformadas con el plásmido pSSBm85/XylR-.

Figura VIII. h Rendimiento biomasa-sustrato y producción de ácido acético durante la fase exponencial de los cultivos de *B. subtilis*: 168, CV842, CV846, CV863 y CV879 transformados con pSSBm85/XylR-, en medio LB con glucosa.

Figura VIII. i Producción de ácido acético durante la fase exponencial de los cultivos de *B. subtilis*: 168, CV842, CV846, CV863 y CV879 transformados con pSSBm85 (inducible) y pSSBm85/XylR- (constitutivo) en medio LB glucosa.

Figura VIII. j Consumo de xilosa y producción de acético durante la fase exponencial de los cultivos de *B. subtilis*: 168, CV842, CV846, CV863 y CV879 transformados con pSSBm85/XylR-

Figura VIII. k Biomasa producida y consumo de xilosa de las cepas de *B. subtilis*: 168, CV842, CV846 y CV863 transformadas con el plásmido inducible y constitutivo durante la fase de crecimiento exponencial en medio LB xilosa.

Figura VIII. l Fenotipo de las cepas de *B. subtilis* 168 y evolucionadas transformadas con los plásmidos inducibles y constitutivos en medio LB-glucosa y xilosa.

Figura VIII. m Patrones de expresión de proteína en electroforesis no desnaturizante de *B. subtilis* 168 transformada con pSSBm85/XylR-

Figura VIII. n Perfiles de fluorescencia de las cepas de *B. subtilis* 168 y evolucionadas en medio LB en glucosa y xilosa transformadas con los plásmidos inducibles y constitutivos

Figura VIII. o Productividad volumétrica de GFP en *B. subtilis* 168 y evolucionadas CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85 y pSSSBm85/XylR- en medio LB-glucosa y xilosa

Figura VIII. p Test de caseína de las cepas de *B. subtilis*, 168, CV842, CV846, CV863 y CV879 transformadas con pSSBm85 y pSSBm85/XylR-

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla II. a Mercados de biotecnología farmacéutica

Tabla II. b Productos aprobados por la FDA

Tabla II. c Azúcares utilizados por *Bacillus subtilis*

Tabla VII. a Instrumentos y dispositivos técnicos

Tabla VII. b Químicos y reactivos

Tabla VII. c Características de las cepas utilizadas

Tabla VII. d Características de los plásmidos utilizados

Tabla VII. e Soluciones adicionales

Tabla VII. f Cultivos líquidos

Tabla VII. g Primers-Oligonucleótidos

Tabla VII. h Fórmulas utilizadas para los cálculos cinéticos y estequiométricos

Tabla VIII. a Parámetros cinéticos de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85 en medio LB-glucosa en fase exponencial

Tabla VIII. b Parámetros cinéticos de las cepas 168, CV842, 46, 63 y 79 de *Bacillus subtilis* transformadas con pSSBm85 en medio LB-glucosa en fase estacionaria

Tabla VIII. c Parámetros cinéticos de las cepas 168, CV842, 46, 63 y 79 de *Bacillus subtilis* transformadas con pSSBm85 en medio LB-xilosa en fase exponencial

Tabla VIII. d Parámetros cinéticos de las cepas 168, CV842, 46, 63 y 79 de *Bacillus subtilis* transformadas con pSSBm85 en medio LB-xilosa en fase estacionaria

Tabla VIII. e Parámetros cinéticos de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85/XylR⁻ en medio LB-glucosa en fase exponencial

Tabla VIII. f Parámetros cinéticos de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85/XylR⁻ en medio LB-glucosa en fase estacionaria

Tabla VIII. g Parámetros cinéticos de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85/XylR⁻ en medio LB-xilosa en fase exponencial

Tabla VIII. h Parámetros cinéticos de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85/XylR⁻ en medio LB-xilosa en fase estacionaria

Tabla VIII. i Rendimientos y productividades de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85 en medio LB glucosa

Tabla VIII. j Rendimientos y productividades de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85 en medio LB xilosa

Tabla VIII. k Rendimientos y productividades de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85/XylR⁻ en medio LB glucosa

Tabla VIII. l Rendimientos y productividades de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85/XylR⁻ en medio LB xilosa

Tabla VIII. m Productividad volumétrica máxima a las 9 hr de cultivo de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, CV846, CV863 y CV879 transformadas con pSSBm85 y pSSBm85/XylR⁻ en medio LB-glucosa y xilosa

ABREVIATURAS

Símbolo	Definición
AcCoA	Acetil coenzima A
<i>ackA</i>	acetato cinasa
<i>alsS</i>	acetolactato sintasa
amp	ampicilina
ATP	Adenosín Tri Fosfato
bp	pares de bases (base pairs)
Bs 168	<i>Bacillus subtilis</i> 168
CcpA	proteína A de control catabólico (Catabolite control protein A)
CDW	peso celular seco (cell dry weight)
Cre	elementos de respuesta catabólicos (catabolite response elements)
DECHEMA	Sociedad para la Ingeniería Química y Biotecnología (Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie)
dH ₂ O	agua destilada
DNA	ácido desoxiribonucleico (desoxiribonucleic acid)
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilenediaminitetracético (etildiamintetracetic acid)
e.g	por ejemplo (<i>exempli gratia</i>)
EMA	Agencia Europea de Medicinas (European Medicines Agency)
<i>et al</i>	y otros (<i>et alteri</i>)
EU	Estados Unidos
FBF	fructosa 1,6-bifosfato
FDA	Food and Drug Administration
FSC	Forward Scatter: tamaño de las células reflejado
for	forward
g	gramos
<i>g</i>	gravedad terrestre: centrifugación
GalP	permeasa de galactosa
GC	guanina-citocina

<i>gfp</i>	gen que codifica para la proteína verde fluorescente
GFP	proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)
Glc	glucosa
GRAS	generalmente considerado como seguro (Generally Regarded As Safe)
h	hora
IVM	Ingeniería de Vías Metabólicas
kb	kilobases
L	litro
LB	Luria Bertani
LPS	lipopolisacáridos
m	mili
M	molar [mol L ⁻¹]
μ	micro
μ	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)
mcs	sitio múltiple de clonación (multiple cloning site)
min	minuto
mod	modificado
mRNA	RNA mensajero
n	nano
O/N	toda la noche (over-night)
ORF	marco de lectura abierto (open reading frame)
<i>ori</i>	origen de replicación
PEP	fosfoenolpiruvato
<i>pta</i>	gen que codifica para la fosfotransacetilasa
PTS	sistema de fosfotransferasa (phosphotransferase system)
PykA	piruvato cinasa A
PykF	piruvato cinasa F
rbs	sitio de unión al ribosoma
RCC	Represión Catabólica por Carbono
rDNA	DNA recombinante
rev	reverse

RNA	ácido ribonucleico (ribonucleica cid)
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SDS	duodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS electroforesis en gel de poliacrilamida
SP	péptido señal (signal peptide)
SSC	Side Scatter: complejidad o granularidad de las células reflejado
SRP	partícula de reconocimiento señal (Signal Recognition Particle)
TEMED	N,N,N',N',-tetrametilen-diamina
tet	tetracilina
Tm	melting temperature
Tris	tris (hidroximetil)-aminometano
trp	triptófano
ua	unidad de absorbancia
UE	Unión Europea
UV	ultravioleta
V	volts
v/v	volumen por volumen
w/v	peso por volumen
Xil	xilosa
XylA	xilosa isomerasa
XylB	xilulocinasa
XylR	proteína represora del operón <i>xylAB</i>
XylT	xilosa permeasa
X_{max}	biomasa máxima alcanzada (g_{cdw}/L)
$Y_{p/s}$	rendimiento producto/sustrato (g_p/g_s)
q_s	velocidad específica de consumo de sustrato (g_s/g_{cdw}^h)
q_p	velocidad específica de formación de producto (g_p/g_{cdw}^h)

I. RESUMEN

La industria biotecnológica en 2010 reportó ventas por más de 70 billones de dólares anuales, de los cuales 50 de ellos corresponden al mercado de proteínas recombinantes. Actualmente cerca del 30% de éstas se produce en bacterias principalmente en *Escherichia coli*, sin embargo *Bacillus subtilis* es un organismo atractivo y ampliamente utilizado debido a la capacidad natural de producir y secretar proteínas al medio.

Uno de los mayores retos de producción en los sistemas bacterianos es el sobreflujo metabólico que se produce al cultivar con medios ricos en glucosa (fuente de carbono de uso preferente) y cuyos intermediarios metabólicos activan vías relacionadas con la producción de ácidos orgánicos, en especial ácido acético que a concentraciones mayores a 1.5g/L resulta inhibitorio para el crecimiento en *E. coli*.

En este trabajo se plantea la caracterización de cepas derivadas de *B. subtilis* 168 producto de la ingeniería de vías metabólicas, cuya cepa parental tiene deletados los genes *ptsGHI* que codifican para el sistema de transporte PTS, principal mecanismo de introducción de glucosa a la célula y que posteriormente fue sometida a un proceso de evolución adaptativa [Tesis de Doctorado Cabrera-Valladares] para recuperar el crecimiento en glucosa; durante este proceso adquirieron la capacidad de consumir xilosa.

La caracterización de las cepas se basa en el desempeño cinético y productivo de la proteína GFP en medio LB glucosa y xilosa (por separado) transformadas con el plásmido pSSBm85, que al ser inducible por xilosa no nos permitiría evaluar la diferencia en producción de proteína entre las fuentes de carbono, por ello se desarrolló un sistema constitutivo (donde la transcripción del gen *egfp* no se encuentra regulada negativamente) denominado pSSBm85/XylR.

En este trabajo se observa que las cepas evolucionadas CV842, CV863 y CV879 presentan una reducción en la velocidad de consumo de glucosa en 55% con una velocidad de crecimiento igual que la silvestre o menor hasta en un 30% que no se refleja en biomasa, ya que todas llegan a la misma biomasa, pero con una menor producción de ácido acético y nulas de acetofina y butanodiol,

lo cual se traduce en mayores rendimientos tanto de biomasa/sustrato (50% más) como proteína/sustrato (en 5 veces mayores) sobre la cepa silvestre Bs 168.

El rendimiento biomasa/sustrato se mantiene para la cepa CV863, pero incrementan en un 58 y 22% para las cepas CV842 y CV879 respectivamente y en un 66% para la cepa silvestre en medio LB xilosa; la velocidad de crecimiento así como la biomasa alcanzada al final de la fase exponencial se reduce de un 20 hasta un 50% en las cepas evolucionadas sin embargo esto no afecta ni los rendimientos de proteína GFP/ sustrato ni las productividades específicas y volumétricas que en todas las cepas evolucionadas fueron mayores (desde 1.5 hasta 4 veces) que la silvestre.

Dentro de las evolucionadas, la cepa CV879 fue la que mayor productividad (de proteína verde recombinante) presentó siendo superior en 2 veces sobre la cepa silvestre en medio LB glucosa y 4 veces en xilosa. La productividad volumétrica de CV879 en glucosa es similar a la obtenida en *B. megaterium* (para la cual fue diseñada el plásmido pSSBm85) y la supera en un 47% cuando el medio es xilosa. Por lo anterior, podemos concluir que en *B. subtilis* los rendimientos tanto de biomasa como de producto se ven afectados por el incremento en la producción de ácido acético, fenómeno que se ha descrito como sobreflujo metabólico y que mediante estrategias como la ingeniería de vías metabólicas es posible incrementar los productos deseables en la biotecnología.

II. INTRODUCCIÓN

II.1 Biotecnología

Los microorganismos han sido utilizados para el beneficio del hombre incluso antes de que la ciencia entendiera los procesos que se llevan a cabo. Actualmente no sólo el cultivo de los microorganismos que existen en la naturaleza han sido empleados por sus productos, también versiones modificadas de estos que permiten obtener mejoras en la calidad de los productos, menor impacto ambiental y ahorro de costos para los diversos sectores productivos: agropecuario, alimentos, textil, salud, celulosa y papel, medio ambiente entre otros.

De acuerdo a la DECHEMA, la industria biotecnológica genera ganancias de 55 billones de Euros por año [Beller, *et al.* 2010]. En 2004, sus ventas representaron el 5 % de toda la industria química [Riese y Bahmann, 2004].

Representantes de compañías químicas líderes, analistas así como políticos están convencidos que la industria biotecnológica impactará los procesos de producción industrial [Stammen, 2010]. Lo anterior se ve reflejado en la industria farmacéutica, la cual genera 600 billones de dólares anuales, de los cuales 61 billones corresponden a la producción de proteínas recombinantes (ver Tabla II. a y b).

Tabla II. a Mercados de biotecnología farmacéutica 2004 [Rader, 2010].

Ventas	Billones USD
Proteínas recombinantes	50,000
Proteínas de plasma humano	8,400
Vacunas no recombinantes	6,800
Sangre y plasma humano	5,200
Derivados de animales	1,000
Enzimas no recombinantes	500
Proteínas de plasma animal	500
Anticuerpos monoclonales no recombinante	100
Células y tejidos cultivados	100

Tabla II. b Productos aprobados por la FDA 2004 [Rader, 2010].

FDA Biopharmaceutical Approvals in 2010		
Product	Company	Indication
Urate oxidase, rDNA, PEG	Sanofi Pasteur	Chronic refractory gout
Botulinum Toxin A/Merz	Merz Pharmaceuticals	Cervical dystonia; blepharospasm
Antitrypsin, alpha-1/ Kamada	Kamada Ltd.	Alpha 1-antitrypsin deficiency
RANKL Mab, Rdna	Amgen Inc.	Osteoporosis
Glucosidase, rDNA/ Lumizyme	Genzyme Corp.	Pompe disease
Prostate Cancer Cellular Vaccine (rDNA)	Dendreon Corp.	Metastatic prostate cancer

II.2 Producción de proteína recombinante

Las proteínas son catalizadoras de reacciones metabólicas, componentes estructurales, responsables de interacciones inter e intracelulares y de eventos de señalización esenciales para la vida. La deficiencia en la producción de específicos polipéptidos o la presencia de versiones no funcionales biológicamente derivan en patologías, en el campo de la salud, retrasos en la productividad en el campo de la alimentación, limpieza, etc. [Manning, *et al.* 1989]

La dificultad de obtener las proteínas de las fuentes “naturales” ha generado tecnologías tales como el DNA recombinante (rDNA) desde los años 70’s, la cual ofrece una plataforma muy potente para la producción controlada y escalable de polipéptidos de interés, mediante procedimientos que no requieren tanta inversión [FDA, 1982].

La fase inicial: “upstream” de producción de proteína recombinante consiste en el diseño del sistema de expresión que implica la elaboración del vector de clonación del gen que codifica la proteína de interés en la célula hospedera adecuada. La segunda fase: “downstream” se enfoca al proceso de purificación, evaluación del control de calidad y validación de dicho producto. El diseño del vector y la elección de la célula hospedera determinan en gran parte, las características de la proteína recombinante, las estrategias de su purificación, rendimiento y el costo de su producción [Drago y Sainz, 2006].

La versatilidad y las posibilidades de escalamiento de la producción de proteínas recombinantes abrieron nuevas oportunidades comerciales para las compañías farmacéuticas. Desde que se aprobó la insulina recombinante en 1982 (Figura II. a), se han generado cepas específicas de diversos microorganismos adaptados a la producción de proteínas e incluso se han incorporado sistemas de expresión en levaduras y otros eucariontes. De las 151 proteínas recombinantes aprobadas en 2009 por la FDA y EMEA, 45 se obtuvieron de *Escherichia coli*, 28 de *Saccharomyces cerevisiae*, 17 en células híbridoma, una en animales transgénicos, otra en células de insectos y 59 en células de mamífero (Figura II. b).

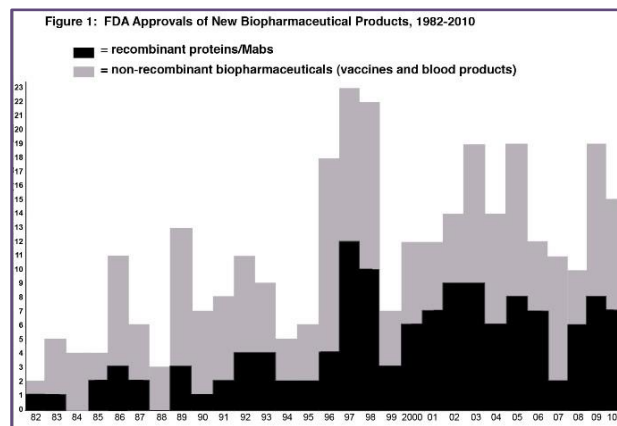


Figura II. a Productos biofarmacéuticos aprobados por año desde 1982 [Rader, 2010].

Productos aprobados por la FDA desde 1982 hasta 2010. En negro proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales, en gris productos biofarmacéuticos no recombinantes

La incorporación de las células de mamíferos como productoras farmacéuticas de rDNA no excluye a los microorganismos como hospederos, y tampoco tiene un efecto decreciente en la tasa de productos aprobados de este origen. De hecho los microorganismos cubren un espectro de productos en ámbitos específicos que no necesariamente son aquellos que cubren las células de mamíferos como lo muestran las figuras a continuación (Figuras II. b y II. c) [Ferrer-Miralles, *et al*, 2009].

En los últimos años se muestra una estabilización en cuanto a la tasa de productos aprobados independientemente del sistema de producción (Figura II. c). Sin embargo se debe ver como un evento transitorio que pudiera indicar que los sistemas de producción actuales estén llegando al límite de sus capacidades en cuanto a la producción de proteínas [Ferrer-Miralles, *et al*. 2009].

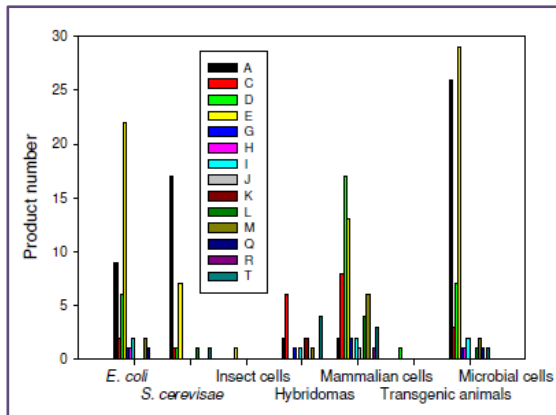


Figura II. b Biofarmacéuticos recombinantes agrupados por indicaciones terapéuticas en diferentes sistemas de producción. (Clasificación WHO. Ver anexo XII.1)

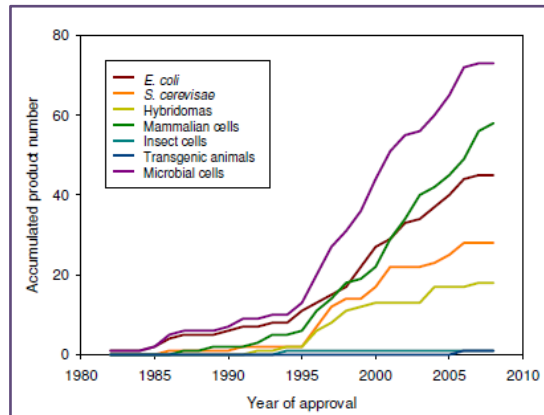


Figura II. c Número acumulado de productos biofarmacéuticos recombinantes aprobados en EU y UE. [Ferrer-Miralles, *et al.* 2009]

Afortunadamente en la actualidad se tiene más conocimiento sobre los sistemas biológicos, de expresión, secreción de proteínas, respuesta a estrés, etc. que pueden ampliar las posibilidades de la ingeniería mediante nuevas herramientas (genéticas, metabólicas a nivel sistema) que favorezcan la alta producción y calidad de proteínas recombinantes [Gasser, *et al.* 2008].

Además de la incorporación de células de mamíferos, animales y plantas transgénicas, las células microbianas siguen siendo un modelo robusto y práctico de las cuales se pueden aprender aspectos biológicos que ayuden a mejorar los rendimientos, más allá de las aparentes limitaciones actuales. En este sentido no sólo las bacterias y levaduras de uso común, sino cepas prometedoras no convencionales, se pueden incorporar a los procesos productivos para cumplir con la creciente demanda de la industria [Ferrer-Miralles, *et al.* 2009].

II.3 *Bacillus subtilis* 168

Dentro de la familia *Bacillaceae* (bacterias aerobias gram positivas formadoras de esporas) se encuentra el género *Bacillus*, cuya biología está determinada principalmente por el estadio de endospora que contiene ácido dipicolínico. El proceso de formación de la spora ofrece un sistema modelo para la diferenciación molecular, el cual está asociado a la producción de toxinas contra insectos y antibióticos de importancia biotecnológica [Sonenshein, 1993].

Bacillus subtilis es una de las 40 especies de este género, tradicionalmente su identificación se basaba en la formación de esporas termo-resistentes, catalasa y Voges-Proskauer positivo, crecimiento anaeróbico en agar nutritivo negativo e hidrólisis de almidón positivo [Slepecky y Hemphill, 1992]. Actualmente la clasificación del género *Bacillus* y géneros relacionados deriva principalmente de la comparación de secuencias del 16S rRNA. En ésta clasificación *Bacillus subtilis* se encuentra como especie representativa del grupo II en el que se encuentran bacterias que producen ácidos a partir de una variedad de azúcares; de metabolismo generalmente aerobio, se les considera un estado intermedio entre las verdaderas anaerobias facultativas del grupo 1 y aerobias estrictas de los grupos 3 y 4 (Figura II. d) ya que puede crecer en condiciones estrictamente anaerobias si se les proporciona glucosa y nitrato como aceptor terminal de electrones [Sonenshein, 1993].

Las cepas de *Bacillus subtilis* son ampliamente utilizadas debido a su habilidad de tomar DNA exógeno del medio e integrarlo en su genoma. Esta competencia natural puede ser regulada e inducida en el laboratorio por limitación de nutrientes [Team: Newcastle University, 2008]. *Bacillus subtilis* 168 (Bs168) es una cepa mutada en el operon *trp*, por lo que usualmente se agrega L-triptófano o indol en medios de cultivo mínimos, ya que es incapaz de sintetizar este aminoácido esencial [Ferrari, *et al.* 1993].

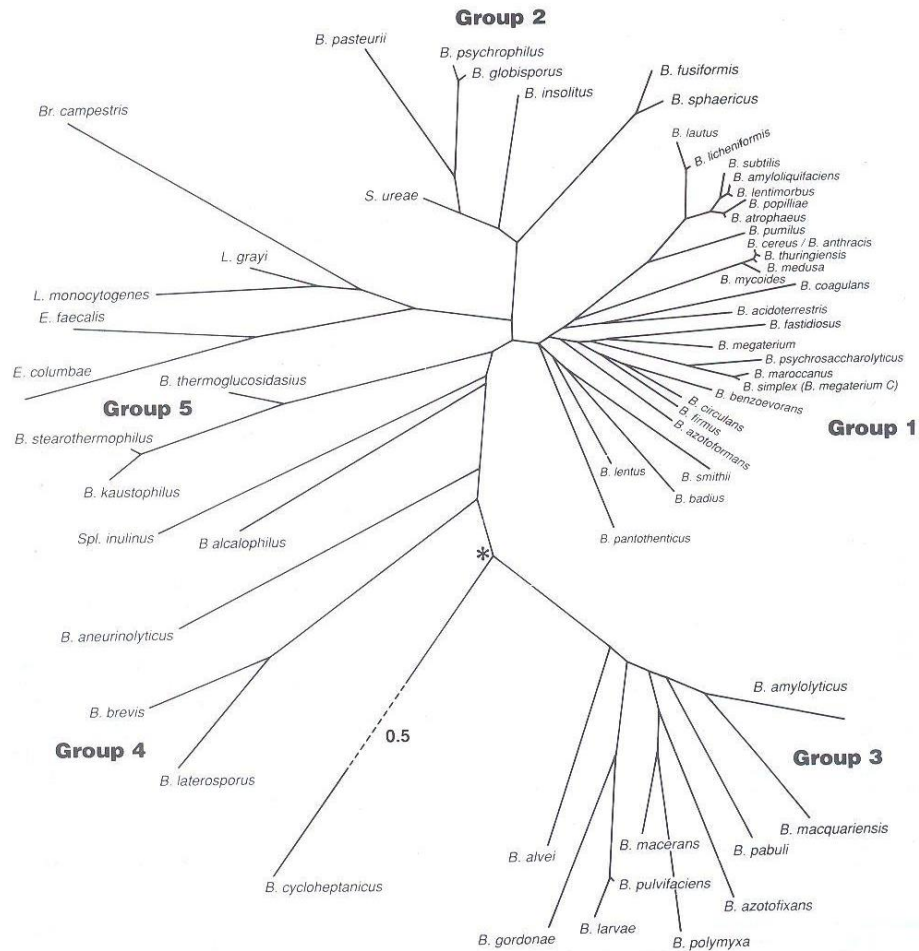


Figura II. d Árbol de distancia evolutiva que muestra la heterogeneidad filogenética del género *Bacillus* [Ash, et al. 1991].

II.4 Metabolismo de carbohidratos

Al ser *B. subtilis* una bacteria de vida libre, ésta encuentra en su ambiente natural una mezcla diversa de fuentes de carbono que puede utilizar; se han reportado hasta 19 diferentes mono y disacáridos, los cuales transporta al interior de la célula (ver tabla II. c) a través de una gran diversidad de sistemas multiproteícos tales como transportadores ABC, sistema de fosfotransferasa PTS, así como por difusión facilitada o transportadores secundarios [Steinmetz, 1993].

Tabla II. c Azúcares utilizados por *Bacillus subtilis* [modificada de Pariente 2007]

Azúcar	Operón ₁	Transportador ₂	Ruta metabólica ₃	Regulación
Glucosa	PtsGHI	P:PtsG	Glucólisis	AT:GlcT
Sacarosa	SacPA	P:SacP		AT:SacT
β-Glucósidos	BglPH	P:BglP		AT:lic
Maltosa	malA, yfiA, malP	P:MalP		¿?
N-acetil-glucosamina	nagP, nahAB, yvoA	P:NagP		R:YvoA
Trealosa	TreaPAR	P:TreP		R:TreR
Oligo β-glucósido	LicBCAH	P:Lic, LicC, Lic A		A:LicR
Oligo β-manósida	YdhMNOPQRST	P:YdhM, YdhN, YdhO		R:YdhQ
Fructosa	LevDEFG, sacC, fruRBA	P: LevD, LevE, LevF, LevG P: FruA		A:LevR R:FruR
Manitol	Molad	O:MtlD		A:MtlR
Manosa	manPA, ydjF	P:ManO		A:ManR
Celobiosa	NR	P:¿?		¿?
Glucitol	gutB, ydjE	S:YdjD		A:GutR
Glicerol	GlpFKD	F:GlpF		AT:GLP
Inositol	IolABCDEFGHJ	IolF¿?	Especial	R:IolR
Gluconato	GntRKPZ	ABC:AraN, AraP, AraQ	Pentosas fosfatos	R:GntR
Arabinosa	AraABDLMNOPQ-abfA	A:AraE		R:AraR
Ribosa	RbsRKDACB	ABC:RbscC, RASD, RbsA		R:RbsR
Xilosa	XylAB	¿?		R: XylR

1: Operón, NR (no reportado), 2: Mecanismo de transporte; P: Sistema de fosfotransferasa,

S: simporte, F: Facilitador ABCATP, ¿?no ha sido reportado, 3: Regulación; AT: anti-terminador, R: represor, A: activador

En *B. subtilis* como en muchas bacterias se han seleccionado mecanismos que permiten la toma selectiva de algunas fuentes de carbono, aquellas que favorecen el crecimiento y les ayudan a competir de mejor manera contra otras bacterias y hongos.

Para muchas bacterias heterotróficas, la glucosa es la fuente de carbono preferida ya que en presencia de ésta, los genes requeridos para la utilización de fuentes secundarias no se expresan e incluso se inactivan enzimas preexistentes para evitar el gasto energético y de recursos [Singh, *et al.*, 2008].

La represión catabólica por carbono (RCC) ha sido definida como la inhibición de la expresión de genes requeridos para la utilización de fuentes de carbono secundarias, causada por sustratos carbonados que son degradados rápidamente; la cual involucra el transporte y metabolismo de la fuente de carbono represora [Saier y Reizer, 1992].

El complejo regulatorio responsable de la RCC provee a las bacterias dos facultades importantes: 1) utilizar una fuente de carbono de manera preferencial en una mezcla presente en el medio de cultivo y 2) incorporar el carbohidrato secundario y utilizarlo de acuerdo a sus capacidades metabólicas [Brückner y Titgemeyer, 2002].

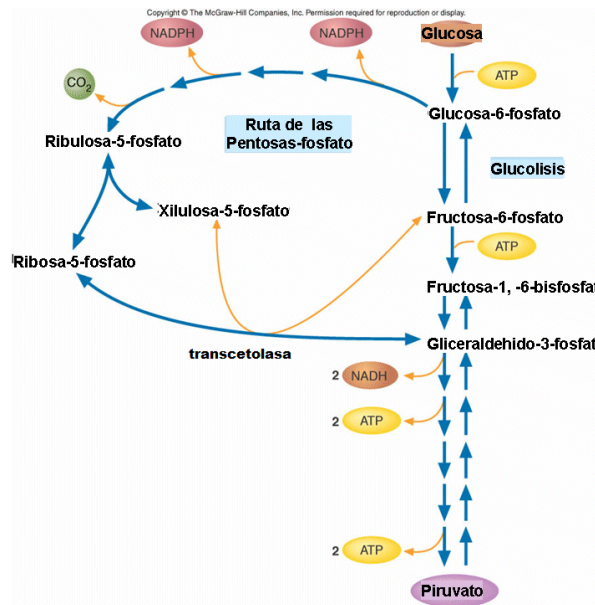


Figura II. e Relación entre la ruta de las pentosas fosfato y glucólisis [modificada de Tejedor, 2008]

En el caso específico de este trabajo se destaca la glucosa como fuente de carbono preferida por *B. subtilis*, la cual es transportada mediante el sistema PTS (que se detalla a continuación) y la xilosa que hasta ahora no se ha reportado un transportador específico para la internalización de este azúcar; sin embargo se sabe que dentro del metabolismo de xilosa ésta debe ser internalizada e isomerizada en xilulosa y posteriormente fosforilada en xilulosa- 5 fosfato [Dahl, *et al.* 1994]. De esta manera es capaz de entrar a la vía de pentosas fosfato y a la parte final de la glucólisis vía transcetolasa a gliceraldehído-3-fosfato o fructosa 6-fosfato (Figura II. e)

II.5 Sistema de fosfotransferasa

Existen diversos sistemas de control que se encuentran relacionados con la regulación por fuente de carbono. Dentro de ellos, uno de los mejor conocidos es el sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) el cual cataliza el transporte y fosforilación de diversos carbohidratos (carbohidratos PTS) utilizando al fosfoenolpiruvato (PEP) como donador de fosfato, resultando en la acumulación intracelular de su correspondiente versión fosforilada (translocación de grupo) [Postma y Lengeler, 1985; Deutscher, *et al.* 2006]. Este sistema fue descubierto en extractos celulares de *Escherichia coli* hace aproximadamente 50 años [Kundig *et al.* 1964]. Posterior a su descubrimiento se realizaron una serie de mutantes en *Staphylococcus aureus* que eran incapaces de crecer en una variedad de carbohidratos [Postma y Lengeler, 1985].

Además del transporte y fosforilación de azúcares, el sistema PTS lleva a cabo varias funciones de regulación metabólica y transcripcional en diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, entre las cuales se encuentran la activación de proteínas inductoras de operones catabólicos, el metabolismo del nitrógeno, la quimiotaxis, la respuesta a estrés y patogenicidad [Stulke y Hillen, 1998; Nothaft, *et al.*, 2003].

En *B. subtilis* al menos 5 carbohidratos (glucosa, manosa, fructosa, sacarosa y manitol) son trasladados vía PTS [Tréboul, *et al.* 1991].

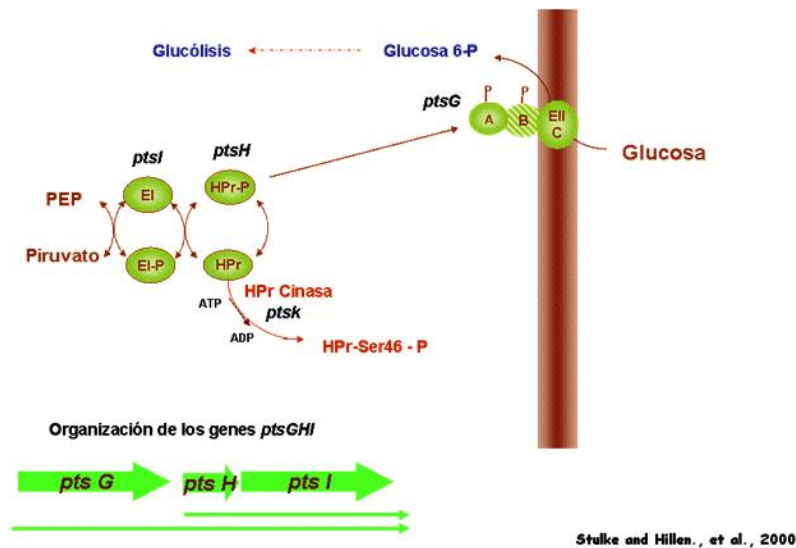


Figura II. f Sistema de fosfotransferasa en *B. subtilis*. [Stulke y Hillen, 2000]

El sistema PTS (ver Figura II. f) consta de dos enzimas generales (no específicas), la enzima EI y la proteína estable al calor HP. Además de una cantidad de permeasas específicas para cada carbohidrato llamadas EII. Las enzimas EII poseen tres o cuatro dominios de los cuales dos se encuentran involucrados en la transferencia de fosfato (EIIA y EIIB) y el tercero (EIIC) actúa como permeasa de membrana [Stülke y Hillen, 1999].

EIIA es citoplásmico y soluble, EIIB es un dominio periférico de membrana que se liga al lado citoplásmico a través de EIIC, que es una proteína integral de membrana que une al azúcar específico para liberarlo en el interior de la célula.

La cascada de fosforilación inicia con la enzima EI, la cual se autofosforila utilizando fosfoenolpiruvato (PEP) y transfiere el grupo fosfato de alta energía en presencia de Mg^{2+} a la proteína HPr (proteína pequeña, termoestable y rica en histidina). La síntesis de estas proteínas es constitutiva, sin embargo las enzimas EIIABC se inducen por el sustrato correspondiente.

Una vez que HPr es fosforilada (HPr-P) ésta transfiere el fosfato a la enzima EIIA, que en presencia de Mg^{2+} transfiere el fosfato a la enzima específica EIIB, que a su vez fosforila el azúcar. En este

momento la EIIC pierde su afinidad por el azúcar modificado, de esta manera el componente entra al citoplasma y queda como sustrato para las reacciones de catabolismo [Forero y Sánchez, 2008]

En las bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC, el mecanismo de RCC está íntimamente ligado a proteínas del sistema PTS. En específico, en *B. subtilis* y *B. megaterium*, la mayoría de las señales de la RCC son dependientes de la enzimas HPr-cinasa/fosfatasa (HPr-K/P) y la proteína de control catabólico A (CcpA), las cuales son las encargadas de censar el estado fisiológico de la célula y regular el consumo de carbono [Stülke y Hillen, 1999].

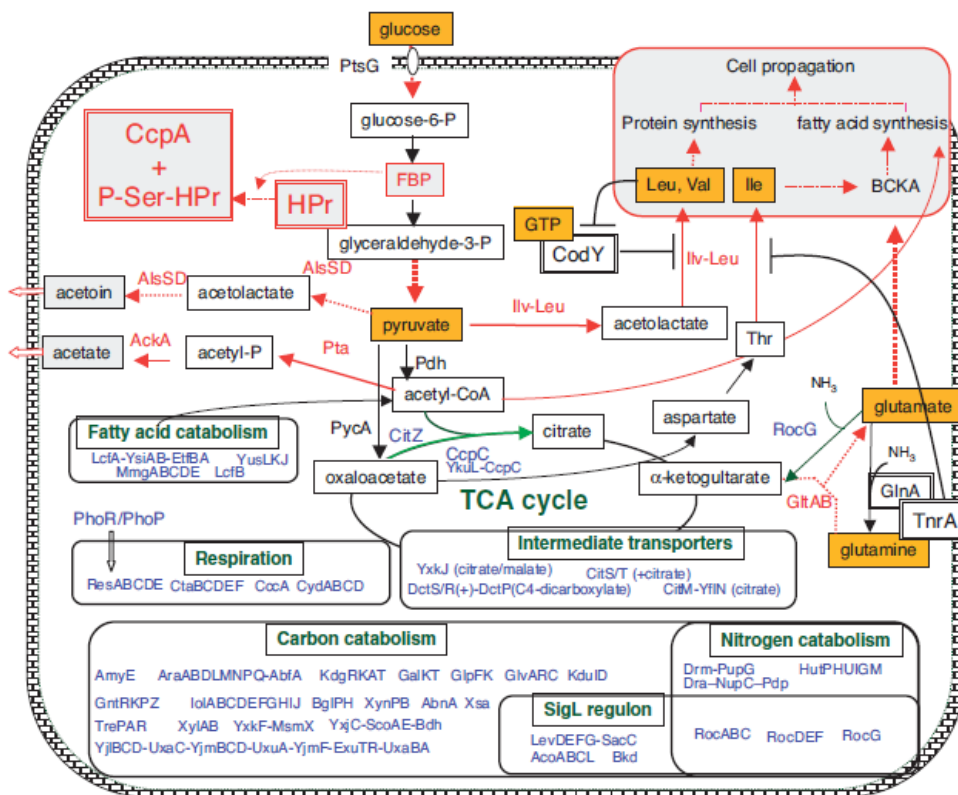


Figura II. g Redes mediadas por CcpA en *B. subtilis*. El complejo CcpA activa los genes *ackA* y *pta* así como el operón *ilv*- de manera directa y al operón *alsSD* indirectamente [Fujita, 2009].

El control catabólico de carbono ocurre cuando una fuente de carbono preferente, por ejemplo la glucosa genera intermediarios metabólicos como la fructosa 1,6-bifosfato (FBF). Este metabolito activa la enzima HPr-K/P que fosforila a HPr en la serina 46. La unión del complejo CcpA (catabolite control protein A) y P-Ser-HPr (seryl-phosphorylated form of HPr) permite que CcpA

se una a los elementos de respuesta catabólicos (cre) localizados en los operones blanco en los que inhiben el inicio de la transcripción [Forero y Sánchez, 2008]. Paralelamente este complejo desencadena la expresión de varios genes involucrados en la formación de acetato y acetoína (Figura II. g), productos secretados cuando *B. subtilis* es crecido en glucosa [Fujita, 2009].

II.6 Sistema de expresión génica inducible por xilosa

El promotor inducible por xilosa P_{xyIA} actúa coordinado con la proteína XylR, la cual en ausencia de xilosa se une a la secuencia del operador localizada en el promotor, limitando la transcripción del operón *xyl*. En presencia de xilosa, ésta se une a la proteína represora, induciendo un cambio conformacional en la proteína que lleva a la liberación de XylR del promotor. Por lo tanto la RNA polimerasa reconoce eficientemente al promotor.

En su contexto natural, el promotor P_{xyIA} se localiza “río arriba” del operón que codifica XylA (xilosa isomerasa), XylB (xilulocinasa) y XylT (xilosa permeasa). El gen represor de P_{xyIA} (*xyIR*) está localizado “río arriba” del operón *xyl* en dirección opuesta. La proteína XylR se produce en una conformación activa y se une a una secuencia palindrómica del operador directamente “río abajo” de P_{xyIA} .

Basado en este promotor Rygus y Hillen en 1991 desarrollaron en *B. megaterium* un plásmido para la producción de proteína recombinante “multihospedero” (*B. megaterium* y *E. coli*), reemplazando los genes *xyIA*, *xyIB* y *xyIT* por un sitio múltiple de clonación (Figura II. i).

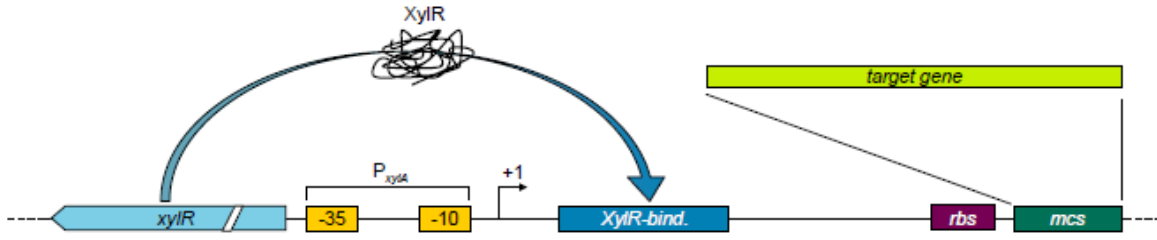


Figura II. i Características principales del sistema de expresión génica inducible por xilosa para *Bacillus megaterium* [Stammen, 2010]

Los elementos para la regulación génica en *B. megaterium* son el promotor inducible por xilosa P_{xylA} , el gen represor de xilosa (*xyIR*) y la región palindrómica de unión al DNA (*XylR-bind.*). La unión de xilosa genera un cambio conformacional de XylR liberándose así del DNA y permitiendo el inicio de la transcripción en el sitio +1. El sitio de clonación múltiple (*mcs*) para introducir los genes de interés se localiza río abajo del sitio de unión al ribosoma (*rbs*)

El plásmido fue diseñado para realizar las manipulaciones genéticas y amplificarlo en *E. coli* para trasladarlo finalmente en *B. megaterium*. Para ello se insertaron orígenes de replicación (*ori*) para *E. coli* y para *Bacillus*, así como cassettes de resistencia a antibióticos (*amp*, *tet*) [Biendendieck, *et al.*, 2007, Malten, *et al.* 2005 y 2006].

II.7 Secreción proteica en *Bacillus*

Bacillus subtilis es un organismo atractivo para la producción de proteína heteróloga por diversas razones; 1) es un organismo GRAS (Generally Regarded As Safe), 2) no patogénico, 3) existe gran información referente a procesos regulatorios, así como herramientas para su manipulación genética y datos de fermentación a gran escala, 4) es capaz de secretar eficientemente proteínas extracelulares funcionales al medio de manera natural, es por ello que ha sido utilizada para la producción de numerosas enzimas como la interleucina humana (hIL)-1 [Wong, 1995].

Las proteínas en *B. subtilis* pueden localizarse en 5 diferentes lugares; 1. citoplasma, 2. membrana citoplasmática, 3. espacio periplásmico (entre la membrana y la pared celular), 4. pared celular y 5. exterior [Yamane, *et al.* 2004].

El destino final de cada proteína lo dicta una secuencia de aminoácidos que actúa como código postal. Una de las más conocidas es el péptido señal secretor localizado en el extremo N-terminal, el cual transloca las proteínas a través de la membrana [Emanuelsson, *et al.* 2007].

Aunque se conocen cinco diferentes vías de secreción en *Bacillus* (las cuales difieren en características específicas del péptido señal) [Tjalsma, *et al.*, 2004], la mayor parte de las proteínas secretadas en *B. subtilis* son translocadas de manera Sec-dependiente (ver Figura II. h) [Tjalsma, *et al.*, 2000].

Durante la traducción del mRNA al pre-polipéptido los componentes del sistema Sec (Fth, HBSu y RNAs pequeños citoplásmicos) forman la partícula de reconocimiento señal (SRP), la cual reconoce el N-terminal donde se encuentra el péptido señal. Con ayuda de FtsY la pre-proteína (no plegada) se adhiere a la membrana celular.

La maquinaria de translocación localizada en la membrana consiste de al menos cuatro proteínas Sec (SecA, SecE, SecG y SecY), el transporte es muy parecido a aquel que ocurre en *E. coli*. La proteína SecA, el motor de translocación, transporta la pre-proteína a través del canal SecYEG por hidrólisis de ATP [Tjalsma *et al.*, 2004]. Del lado trans, la peptidasa señal anclada a la membrana tipo I, reconoce el sitio de corte consenso de las posiciones -3 a -1 y es así como separa el residuo del péptido señal N-terminal.

La proteína madura se pliega, ayudada de cationes o proteínas que asisten el plegamiento como PrsA, en caso de que no esté bien plegada existen proteasas como WprA asociadas a la pared celular que degradan instantáneamente. Este tipo de enzimas actúan como un control de calidad celular sin embargo se sugiere que puede representar uno de los mayores cuellos de botella en la secreción de proteína heteróloga [Tjalsma, *et al.*, 2004 y Stammen 2010].

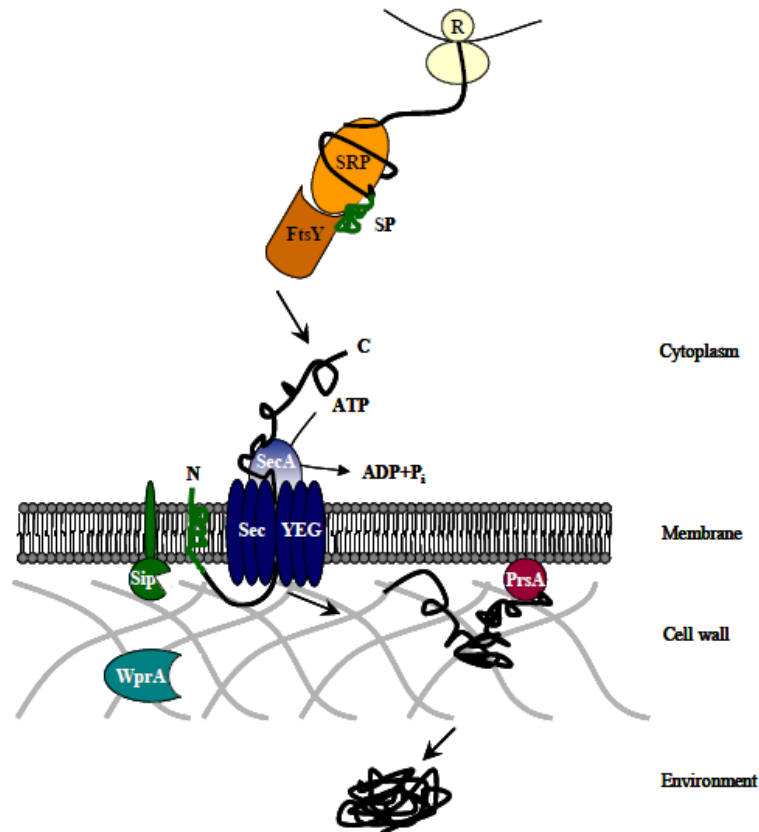


Figura II. i Transporte de proteína Sec-dependiente en *Bacillus subtilis* [Stammen 2010]

Las proteínas secretadas (línea negra) son sintetizadas como moléculas precursoras con péptidos señal N-terminal (SPs) en el ribosoma (R). Chaperonas citosólicas como SRP-FtsY se unen a ellas manteniendo su conformación hasta que son reconocidas por el motor de translocación SecA y las proteínas de membrana SecYEG. Durante o después de la translocación, el péptido señal es cortado por peptidasas del tipo I (Sip). Chaperonas extracelulares como PrsA ayudan al plegamiento autocatalítico. Proteasas asociadas a pared celular como WprA están asociadas al control de calidad de las proteínas exportadas.

II.8 Proteínas modelo para el estudio de producción

Los productos proteícos de genes reporteros han sido utilizados usualmente para monitorear la producción en vivo de poblaciones bacterianas, lo cual es reflejo de la fuerza del promotor, estabilidad del RNA y la eficiencia de traducción, así como la viabilidad del organismo de estudio [Stammen, 2010]. Uno de los sistemas más utilizados es el que utiliza la β -galactosidasa, sin embargo una de las mayores limitantes de este sistema es que requiere la permeabilización de las células, la cual puede variar, observándose diferencias en la actividad de β -galactosidasa donde no

es posible discriminar entre captación del sustrato o niveles de expresión génica [Nwoguh *et al.* 1995]. En la actualidad se utilizan sistemas reporteros que emiten fluorescencia para experimentos que requieren de mediciones en tiempo real, los cuales también poseen gran sensibilidad [Hautefort y Hinton, 2000].

II.8.1 Proteína verde fluorescente (GFP)

La proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* (Figura II. j) naturalmente emite fluorescencia verde (504 nm) después de ser excitada con luz azul (entre 395-397 nm) y posee una masa molecular de 27 KDa [Prasher *et al.* 1992, Tsien, 1998]. La GFP no requiere la adición de ninguna sustancia o cofactor, y permite la visualización de la expresión génica además de que su nivel puede ser cuantificable.

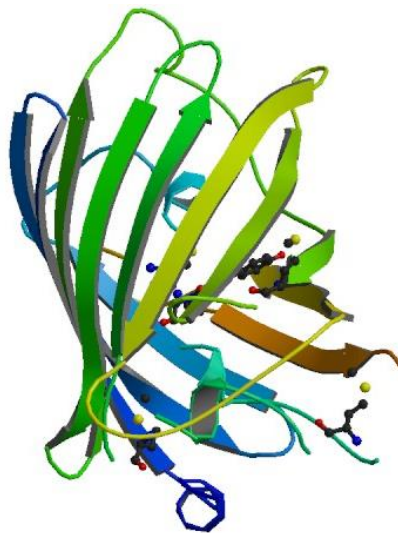


Figura II. j Representación de la estructura tridimensional de la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* (Thr65).

La proteína GFP consiste en un barril beta de 11 cadenas con una hélice coaxial, el cromóforo forma una hélice central. La fluorescencia resulta de la ciclización espontánea y oxidación de la secuencia-Ser65(o Thr65)-Tyr66-Gly67. La estructura Tr65 GFP ha sido resuelta a una resolución de 1.9 angmstrom.

Inicialmente la intensidad de la fluorescencia de esta proteína era muy débil. Sin embargo se han generado mutantes resultando en una fluorescencia 30 veces más intensa, comparada con la silvestre, el rango de excitación cambió de 395 a 488nm, además la fluorescencia es detectable a los 8 minutos comprada con 1-2 h para la versión silvestre [Cormack, *et al.* 1996, Crameri, *et al.* 1996; Miksch, *et al.*2006]. Una de las mutantes de GFP es la llamada GFPmut o eGFP (enhanced GFP), la cual tiene una doble sustitución F64L y S65T [Cormack, *et al.* 1996], y ha resultado ser un excelente reportero [Heim, *et al.*, 1994]. En este estudio se utilizó GFPmut1 que por simplicidad será referida simplemente como GFP.

III. ANTECEDENTES

III.1 Ingeniería de Vías Metabólicas

El concepto de manipulación metabólica de cepas que tengan las características deseadas, es antiguo. Existen algunos ejemplos para la síntesis de aminoácidos, antibióticos, solventes y vitaminas en los que mediante mutagénesis al azar se obtienen mayores productividades. Sin embargo estas mutantes son producto de un proceso aleatorio en donde la ciencia se complementa con elementos artísticos [Stephanopoulos, *et al.* 1998].

A través del desarrollo de la tecnología de DNA recombinante, la cual permite la modificación precisa de las reacciones bioquímicas, se han acuñado varios términos relacionados directamente con la modificación de vías metabólicas, tales como: ingeniería celular, evolución in vitro, crianza molecular, e ingeniería de vías metabólicas.

La Ingeniería de Vías Metabólicas se define como el mejoramiento de la formación de productos o de las propiedades celulares a través de la modificación de reacciones bioquímicas específicas o la introducción de una nueva mediante el uso de la tecnología de DNA recombinante [Stephanopoulos y Vallino, 1991; Stephanopoulos, *et al.* 1998]. Asimismo, la Ingeniería de Vías Metabólicas debe involucrar un diseño con cierto grado de predicción [Bailey, 1991].

III.2 Producción de GFP en *Escherichia coli* PTS-

Escherichia coli es uno de los organismos más utilizados para la expresión de proteína recombinante en la industria, sin embargo en estos cultivos, que alcanzan altas densidades celulares, se ha encontrado producción y acumulación de acetato en el medio, lo cual reduce el rendimiento de la proteína expresada además de que concentraciones de 1.5 g/L resulta inhibitorio para el crecimiento celular [Bauer, *et al.* 1990].

El acetato en *E. coli* es producido bajo condiciones de limitación de oxígeno o durante el crecimiento aeróbico con altas concentraciones de glucosa en el medio, principalmente por la vía de fosfotransetilasa-acetato cinasa (Pta-AckA) a partir de acetil coenzima A (AcCoA) [Farmer y Liao, 1997]. El piruvato es el precursor directo de AcCoA, el cual en condiciones aerobias es generado por dos reacciones en *E. coli*; la primera por piruvato cinasas (PykA y PykF) y la segunda, por el sistema de fosfotransferasa (PTS).

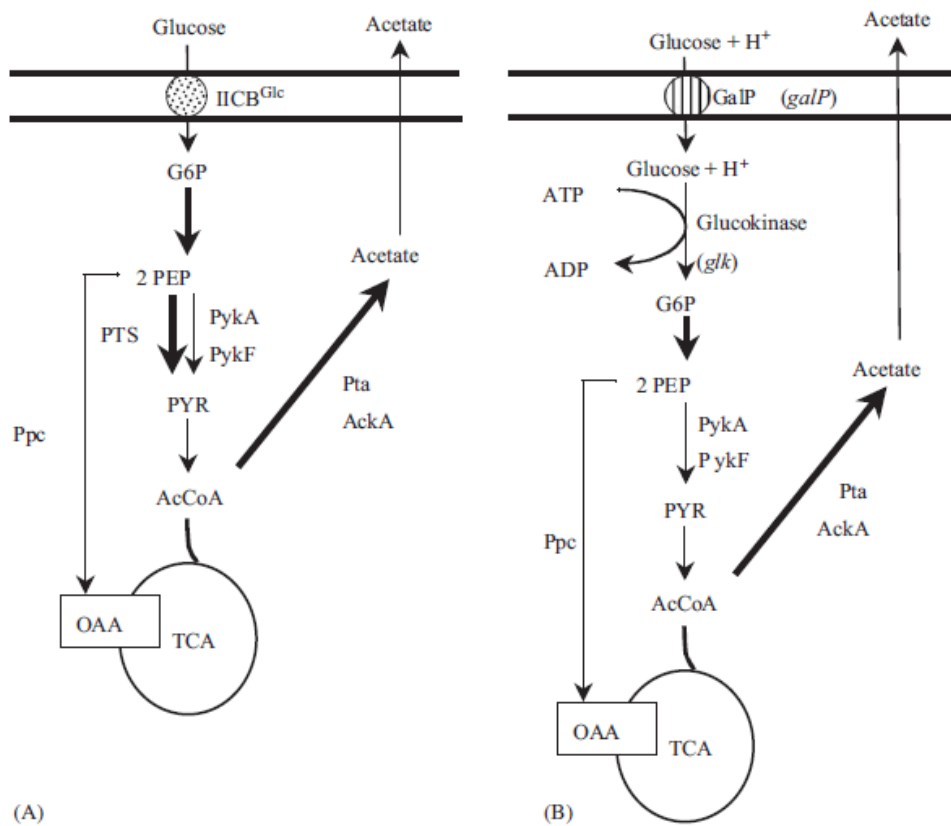


Figura III. a Vías de producción de acetato a partir de glucosa en *E. coli*. [De Anda, *et al.* 2006]

A) Reacciones que involucran al sistema PTS.

B) Estrategia que permite incorporar glucosa independientemente del sistema PTS en la cepa VH32GalP⁺.

En 2006, De Anda y colaboradores establecieron un sistema de producción de proteína recombinante basado en la ingeniería de vías metabólicas, en la cepa W3110 de *E. coli* en el cual se inactiva el sistema PTS (resultando VH32, derivada de W3110) con el fin de reducir el flujo de carbono a la vía de producción de acetato, pero con la capacidad de transporte de glucosa

recuperada por acción de la permeasa de galactosa (GalP) y fosforilación por la glucoquinasa (Ver Figura III. a) [Flores, *et al.* 1996, De Anda, *et al.* 2006].

En la cepa VH32 se sustituyó el promotor *galP* por el de *trc* (promotor híbrido fuerte) para incrementar la capacidad de transporte de glucosa; a pesar de mostrar una tasa de consumo (q_s) 42% menos que la cepa silvestre, ésta tuvo la misma velocidad específica de crecimiento (μ), la misma biomasa y significativamente menor producción de acetato, alcanzando 0.39 g/L comparado de 2.83 g/L en la cepa W3110. Esto se vio reflejado en una fluorescencia superior de la proteína verde fluorescente (GFP) hasta en 4 veces en la cepa VH32GalP⁺ (3322UF/ g h vs 1246 UF/ g h) [De Anda, *et al.* 2006].

III.3 Producción de GFP en *Bacillus megaterium*

B. megaterium como *B. subtilis* posee una gran capacidad secretora, pero a diferencia de ésta, no posee proteasas alcalinas y es conocida por mantener la estabilidad en la replicación de los plásmidos. Por esta razón es que ha tenido gran auge en la producción de proteína recombinante [Vary, 1994; Wong, 1995].

En 2005 se tomó como vector de inicio el plásmido pWH1520 para la producción y secreción de proteínas heterólogas utilizando *B. megaterium* MS941 (DSM319 Δ nprM), el cual utiliza el promotor inducible por xilosa (P_{xyIA}) en conjunto con la proteína represora XylR, elementos de selección a antibióticos en *E. coli* y *B. megaterium* [Rygus y Hillen, 1991], además de péptidos señal (secuencia líder N-terminal de exoproteínas) que facilitan la translocación de pre-proteínas no plegadas a través del canal SecYEG ubicado en la membrana citoplásmica [Malten, *et al.* 2005].

Este plásmido fue modificado en 2006 a partir del cual se construyeron una serie de vectores con una variante de GFP (GFPmut1 o EGFP) que se utilizó para caracterizar la producción de proteína. En este estudio se analizó la proteína GFP por SDS-PAGE, por luminiscencia (excitación a 475nm y emisión a 512nm) y por citometría de flujo, en matraces de 250 mL con 50mL de medio LB se

produjeron 9.3 mg GFP/g_{CDW} intracelulares, en la cepa WH323 (30°C) con el plásmido pRBBm53 después de las 6h de inducción; luego de este punto la producción de GFP decreció.

Éste mismo proceso se escaló en un bioreactor de 1L (medio semi-definido A5 y 33g/L glucosa) y luego de 11.2 h de cultivo se indujo la producción (con 5 g/L de xilosa) de GFP y se alimentó con una solución de glucosa una vez que ésta fuente se agotó (aproximadamente a las 13.3h). Con el cultivo alimentado se alcanzaron 274 mg/L (biomasa) a las 25 hrs, con 20 g_{CDW}/L, con una producción específica máxima de 3.5mg GFP/g CDW. Por último, con la técnica de citometría de flujo, se demostró que alrededor del 75% de las células producían activamente GFP durante 4 horas [Biendendieck, *et al.* 2007].

En 2010 el sistema de producción de proteína antes descrito fue sistemáticamente optimizado (cambios en la región -10 y -35 del promotor) resultando en un incremento de 18 veces comparado con el sistema anterior. La producción de GFP en matraces llegó a 82.3 mg/ g_{CDW} ó 124 mg L⁻¹, y en cultivo alimentado el rendimiento aumentó en 10 veces lo que corresponde a 1.26 g L⁻¹, o 36.8mg/g_{CDW}, aún bajo comparado con los 73.7mg g_{CDW} obtenidos en *E. coli* utilizando el mismo sistema de expresión dependiente de la RNA polimerasa T7 [Durr Schmid, *et al.* 2008].

Adicionalmente se analizaron diversas señales péptidicas para la secreción de la hidrolasa de *Thermobifida fusca* como modelo, donde la señal YocH fue con la que se lograron los mejores resultados, sin embargo, se observaron limitaciones en el exporte, posiblemente relacionado con componentes del sistema de transporte dependiente de Sec [Stammen, *et al.* 2010].

III.4 Evolución adaptativa de *Bacillus subtilis* 168 CVPTSGHI

La cepa CVPTSGHISp (*ptsGHI::loxPsp*) de *Bacillus subtilis* 168 tiene deletado el operón *ptsGHI*, por lo que es deficiente en el transporte de glucosa. Esta cepa se sometió a evolución adaptativa en medio mineral con 8 g/L de glucosa con la finalidad de obtener cepas capaces de internalizar la glucosa de manera más rápida y mejorar así su velocidad de crecimiento. El proceso de evolución adaptativa realizado por Cabrera-Valladares y colaboradores consistió en una serie de 11 pases secuenciales de cultivos en fase exponencial, de los cuales seleccionaron 10 colonias al azar de los pases 3-8; en ellas encontraron un incremento en la velocidad específica de crecimiento (μ) de casi tres veces de la colonia evolucionada CV846 con respecto a la cepa CVPTSGHISp y de la mitad con respecto a la silvestre 168 (CVPTSGHISp: 0.09 (h^{-1}), CV846: 0.28 (h^{-1}) y *B.subtilis* 168 (wt) 0.52 (h^{-1})) (ver Figura III. b).

Adicionalmente, durante la caracterización de la cepa evolucionada CV846 en medio mínimo con xilosa y arabinosa, se descubrió que la cepa CV846 adquirió la capacidad de utilizar xilosa como única fuente de carbono, además de co-utilizar xilosa y arabinosa [Cabrera-Valladares, *et al.* 2009].

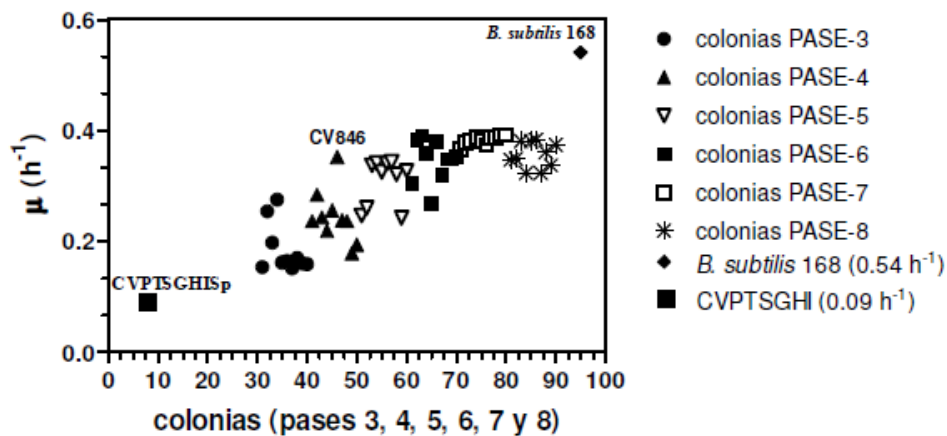


Figura III. b Dinámica del proceso de evolución de la cepa CVPTSGHISp (tomada de Cabrera-Valladares, *et al.* 2009)].

Las 10 colonias seleccionadas de cada pase se comparan en términos de velocidad de crecimiento (μ) con la cepa CVPTSGHISp (sin el operón *pts*) y la cepa silvestre *Bacillus subtilis* 168 en medio mínimo con glucosa (8 g/L)

De la diversa población generada por la evolución adaptativa de *B. subtilis* 168 PTS se seleccionaron cuatro cepas en diversas etapas de la evolución CV842, CV846, CV863 y CV879 las cuales están nominadas de acuerdo al pase del que fueron tomadas e.g: CV846 es la cepa 6 del cuarto pase, CV863 es la cepa 3 del sexto pase (todas comienzan con CV8), las cuales fueron caracterizadas (en este trabajo) en términos de crecimiento y producción de proteína recombinante en medio LB enriquecido con glucosa y xilosa por separado.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias son los hospederos más utilizados a la fecha para la producción de proteínas recombinantes que no requieren modificaciones postraduccionales.

B. subtilis posee la capacidad de secretar proteínas al medio extracelular con facilidad, puede utilizar una variedad de fuentes de carbono y a diferencia de *E. coli*, ésta no posee las endotoxinas (LPS) asociadas a la capa externa de las bacterias Gram negativas que en ocasiones se encuentran en el medio, lo cual facilitaría el tren de purificación proteica.

Las cepas evolucionadas de *B. subtilis* 168 (CV842, CV846, CV863, CV879), han sido modificadas en el sistema PTS con la finalidad de que el flujo de carbono que proporcionen la glucosa o la xilosa se dirija preferencialmente al crecimiento y producción de proteínas y no a subproductos (acetato, acetoína, butanodiol) que puedan limitar el crecimiento, rendimiento y productividad.

V. HIPÓTESIS

Las cepas evolucionadas de *B. subtilis* 168 que carecen del sistema PTS mostrarán una mayor producción de proteína recombinante con respecto a la silvestre.

VI. OBJETIVOS

VI.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto de inactivar PTS en cepas evolucionadas de *B. subtilis* sobre la producción de la proteína heteróloga GFP

VI.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar las cepas evolucionadas de *B. subtilis* transformadas con pSSBm85.
2. Generar una versión constitutiva del gen *egfp*, mediante la inactivación del gen *xylR* (pSSBm85xylR-) en pSSBm85.
3. Caracterizar las cepas evolucionadas de *B. subtilis* transformadas con pSSBm85xylR-.
4. Comparar la producción de proteína GFP obtenida en ambos sistemas (inducible y constitutivo).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 Instrumentos, químicos y kits

VII.1.1 Instrumentos

Tabla VII. a Instrumentos y dispositivos técnicos utilizados en este trabajo

Instrumento	Especificación del producto	Fabricante
Autoclave	modelo HA-300MU	Hirayama
Celda (cuvette)	Fluorimeter, Dual Path 52/Q/1	Uvonic
Centrífuga	5301	Eppendorf
	Refrigerada Mach 1.6R	Sorvall-legend
	MiniSpin	Eppendorf
Citómetro de flujo	FACS Canto	Becton Dickinson
Concentrador	5301	Eppendorf
Electroforesis capilar	Hoirz Mini gel Model MGU 200	CBS. Scientific co.
Electroporador	2510	Eppendorf
Espectrofotómetro	DU-70	Beckman
Fluorímetro		Perkin Elmer
Fotodocumentador	Gel Doc XR+	Bio-Rad
HPLC		Waters
Incubadora	Shaker Series 25	New Bruswick
	C24KC Refrigerated	Scientific co. INC
Nanodrop		Eppendorf
Sistema de agua ultrapuro		MilliQ
Sonicador	Soniprep 150	MSE
Transiluminador	Foto/Prep II	Fotodyne
Vórtex	Genie 2	Daigger

VII.1.2 Químicos y reactivos

Tabla VII. b Químicos y reactivos utilizados en este trabajo.

Producto	Especificación del producto	Fabricante
Enzimas para aplicaciones de biología molecular	XbaI	New England Biolabs
Estándar de tamaño DNA	GeneRuler DNA ladder mix 1Kb	Fermentas
Estándar de tamaño para proteínas	Page Ruler	Fermentas
Ligasa	T4 DNA	New England Biolabs
Kit Purificación DNA	High Pure PCR Product	Roche

VII.2 Cepas bacterianas y plásmidos

Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo. Tabla VII. c y Tabla VII. D

Tabla VII. c Características de las cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Fenotipo	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>			
168 (wt)	<i>trpC2</i>	Auxótrofa de triptófano	Shapiro, 2000.
CV842	Evolucionada <i>trpC2Δ(ptsGHI)</i>	PTS ⁻ glu ⁺ , xil ⁺	Cabrera-Valladares. Tesis de Doctorado
CV846	Evolucionada <i>trpC2Δ(ptsGHI)</i>	PTS ⁻ glu ⁺ , xil ⁺	
CV863	Evolucionada <i>trpC2Δ(ptsGHI)</i>	PTS ⁻ glu ⁺ , xil ⁺	
CV879	Evolucionada <i>trpC2Δ(ptsGHI)</i>	PTS ⁻ glu ⁺ , xil ⁺	
<i>Escherichia coli</i>			
XL1-Blue Stratagene	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	Resistente a ácido nalidíxico y a tetraciclina (plásmido F).	Aligent technologies

DH5- α	fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	Crecimiento lento, aspecto blanco-azul (lacZ). Elimina endonucleasa de restricción (hsdR17)	Grant, <i>et al.</i> 1990
JM110	rpsL (Str) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (lac-proAB) [F' traD36proABlacI _q Z Δ M15]	Deficiente de dos metilasas (Dam y DCm)	Aligent technologies

Tabla VII. d Características de los plásmidos utilizados

Plásmido	Descripción	Referencia
pSSBm85	Derivado de pSSBm78 Σ sitio NheI: P _{xylA} ⁻ (-35+rbs ⁺)-gfp (-NheI)	Stammen, <i>et al</i> 2010
pSSBm85XylR-	Derivado de pSSBm85 Σ sitio XbaI: P _{xylA} ⁻ (-35+rbs ⁺)-gfp (-NheI-XbaI)	Este trabajo

El plásmido pSSBm85XylR⁻ es una modificación (versión donde el gen *egfp* no se encuentra regulado negativamente por la proteína represora XylR) del plásmido pSSBm85 (donado por el Dr. Dieter Jahn), el cual como ya se ha mencionado se encuentra regulado por el promotor del operón *xyl*, y posee la región reguladora de unión a proteína represora XylR. Adicionalmente contiene origen de replicación tanto para *E. coli* como *Bacillus*, y cassettes de resistencia para ampicilina en *E. coli* y de tetraciclina para *Bacillus*, además del gen para la proteína recombinante GFP.

La estrategia experimental para obtener el plásmido pSSBm85XylR⁻, se muestra en la Figura VII. a, la cual consiste únicamente en cortar la región de unión a XylR con la enzima XbaI, para obtener una versión que no se encuentre favorecida en términos de represión bajo el crecimiento en glucosa y en xilosa (por separado). A esta versión se le denomina constitutiva a lo largo del texto.

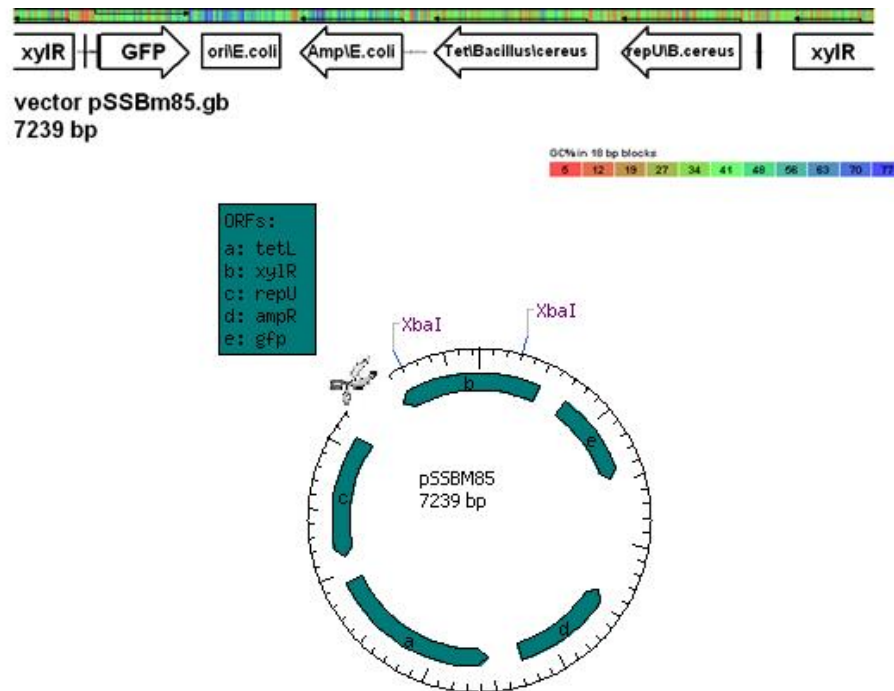


Figura VII. a Estrategia experimental para generar el plásmido pSSBm85/XylR

En la parte superior, el vector linealizado, ubicando los genes que contiene así como el porcentaje de GC% (obtenido en pDRAW32). En la parte inferior se muestran los ORFs que corresponden; a: *tetL* (gen de resistencia a tetraciclina), b: *xyIR* (gen que codifica para la proteína represora del operón *xyl*: XylR), c: *repU* (origen de replicación para *Bacillus*), d: *ampR* (gen de resistencia a ampicilina), e: *gfp* (gen que codifica para la proteína GFP). También se muestran los sitios de corte para la enzima de restricción XbaI, con la que se busca eliminar la regulación ejercida por la proteína XylR (obtenido en NEBcutter: New England Biolabs <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

VII.3 Medio de cultivo y adicionales

VII.3.1 Medios de cultivo

Como medio de crecimiento estándar para todas las cepas bacterianas, medio Luria Bertani (LB) [Sambrook y Russell 2001]; para medio sólido se agregó 1.5% (w/v) agar-agar antes de esterilizarse.

Medio Luria Bertani (LB)

Triptona	1.0 % (w/v)
Extracto de levadura	0.5% (w/v)
NaCl	0.5% /w/v)

Todos los experimentos realizados para la producción de proteína recombinante fueron hechos en medio LB

El medio YENB se utilizó para la preparación de células competentes de *E. coli*, y el medio Skim-Milk para la prueba de proteasas.

Medio YENB

Bactoyeast extract	0.75% w/v)
Bactonutrient broth	0.8% (w/v)

Medio de transformación para Bacillus

Sales Bacillus 1X	2.5mL
Glucosa	0.5% (w/v)
MgSO ₄	5mM
Casaminoácidos	0.01-0.02%
Triptófano	5-50µg mL ⁻¹

Medio LB- Skim Milk

A) Agarosa	12g L ⁻¹
LB	500ml
	Autoclave
B) Caseína (Skim Milk)	15g L ⁻¹
dH ₂ O	400mL
	pH 6.5 w/10% HCl
dH ₂ O	500mL, ajustar pH, hervir 1 min
Enfríar A y B ~75°C, Añadir A a B	Autoclave

VII.3.2 Adicionales

Se prepararon soluciones stock para los antibióticos así como para el resto de los adicionales, esterilizados por filtración (tamaño de poro 0.2 μ m) y añadidos al medio estéril. Éstos se encuentran en la Tabla VII. e

Tabla VII. e Soluciones adicionales

Aditivo	Solución stock	Concentración final
Ampicilina	100.0 mg mL ⁻¹ en dH ₂ O	100 μ g mL ⁻¹
Tetraciclina	30.0 mg mL ⁻¹ en dH ₂ O	5 μ g mL ⁻¹
Glucosa	20% (w/v) en dH ₂ O	8g L ⁻¹
Xilosa	20% (w/v) en dH ₂ O	8g L ⁻¹

VII.4 Técnicas microbiológicas

VII.4.1 Esterilización

Todos los medios fueron esterilizados por vapor a 120°C y 15 libras de presión durante 20 min. Otras sustancias, medios y soluciones fueron esterilizados de la misma forma, únicamente en el caso de los azúcares (Glu y Xil) y otras sustancias termosensibles como los antibióticos se esterilizaron por filtración (poro de 2 μ m).

VII.4.2 Cultivo en placa

Las bacterias inoculadas fueron tomadas de un cultivo líquido (sección VII.4.3) de 5mL, directamente tomados con pipeta o con diluciones en el mismo medio en los casos necesarios. Adicionados con antibióticos, azúcares u otro aditivo según fuera necesario. Las placas de agar fueron incubadas O/N a 37°C.

VII.4.3 Cultivo líquido

Los cultivos líquidos se realizaron como se muestra en la Tabla VII. f , en medio LB, agitación a 250rpm en tubos de 8x8mm o matraces bafleados a 37°C y 300rpm adicionadas con el azúcar (glucosa o xilosa 8g/L) y el antibiótico correspondiente. El tiempo de incubación varía dependiendo de la densidad óptica deseada.

Tabla VII. f Cultivos líquidos

Volumen	Recipiente	Procedencia	Volumen tomado
5 mL	Tubo 8x8 mm	Stock de glicerol	Azada
25 mL	Matraz de 125 mL	Cultivo de 5 mL	0.1 D.O. _{600nm}
50 mL	Matraz de 250 mL	Cultivo de 25 mL	0.1D.O. _{600nm}

VII.4.4 Densidad celular

La densidad celular de los cultivos líquidos se determinó midiendo densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600nm. Para los cultivos con una $DO_{600nm} > 0.8$, se realizaron las diluciones apropiadas en el medio de cultivo preparado. Una DO_{600nm} de 1.0 u.a. corresponde aproximadamente a 1×10^9 células por mililitro y a 0.35 g CDW [Biedendieck et al. 2007 y datos del laboratorio].

VII.4.5 Almacenamiento de bacterias

Las cepas se almacenaron en una mezcla 50-50 de cultivo celular líquido en medio LB y glicerol al 80% en crioviales. Estos cultivos se incubaron aproximadamente 14 h a 250rpm y 37°C en tubos de 8x8 en medio LB. Se tomó un volumen de cultivo de 600µL se mezcló con 600µL de glicerol 80%(w/v), se congelaron y almacenaron inmediatamente a -70°C.

VII.5 Técnicas de biología molecular

VII.5.1 Extracción de DNA plasmídico en cepas de *E. coli*

Se realizó un cultivo O/N de la cepa de *E. coli* DH5 α y JM110 transformadas con el plásmido, y posteriormente fueron cosechadas por centrifugación (15,000*g* durante 2 minutos). El DNA plasmídico de *E. coli* destinado a la transformación (JM110) de *B. subtilis*, se extrajo utilizando el kit de Roche: High Pure PCR Product de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después de los lavados que indica el proveedor y que el etanol se habría evaporado, el DNA se resuspendió en 50 μ L dH₂O.

VII.5.2 Digestión enzimática de DNA

La digestión enzimática de DNA de doble cadena sitio dirigida se realizó utilizando endonucleasas de restricción (New England BioLabs, Fermentas). Los buffers de reacción, la concentración de las enzimas, de DNA, así como la temperatura y tiempo de incubación se escogieron de acuerdo a las instrucciones del productor. Algunas restricciones se hicieron por más de 30 min (O/N) a 37°C.

Subsecuentemente, los fragmentos resultantes se separaron por electroforesis en gel (Sección VII.5.6). Para el análisis de los fragmentos de restricción el gel fue teñido como se indica con bromuro de etidio, y para propósitos de clonación el fragmento de interés fue cortado y purificado utilizando el kit de extracción de Roche de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

VII.5.3 Ligación de DNA

Durante las reacciones de ligación se utilizaron de 25 a 200 ng (nanogramos) de DNA plasmídico, junto con ligasa DNA T4 (New England Biolabs) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Todas las reacciones se incubaron al menos por 30 minutos a 25°C.

VII.5.4 Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de DNA en las muestras se determinó mediante el uso del espectrofotómetro Nanodrop, donde se midió la absorbancia a 260nm. Las impurezas que pudieran estar presentes en forma de proteína se deducen de un ratio de absorbancias de 260nm y 280nm. Las muestras cuyo ratio fue de 1.8-2.0 se consideraron puras. Para una muestra pura de ácidos nucleicos una densidad óptica a 260nm de 1.0 u.a. corresponde a una concentración de DNA de doble cadena de 50µg.

VII.5.5 Preparación y transformación de células electro-competentes de *E. coli*

Se creció un cultivo de 5 mL de células *E. coli* DH5α directo de glicerol O/N, a 37°C y 300rpm en medio YENB, el cual se utilizó para inocular un matraz con 100mL del mismo medio, las células se cosecharon entre 0.5-0.9 DO_{600nm}, y se pusieron en hielo durante 5 minutos, luego se centrifugaron a 4000g durante 10 minutos a 4°C en tubos Falcon de 50 mL, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en la gota restante, posteriormente se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL para realizar los 2 lavados con 2 mL dH₂O fría (1 mL en cada tubo), y uno con 2 mL (1 mL en cada tubo) de glicerol al 10% (w/v), al final se resuspendió en un volumen final de 200-300µL y se alicuotó en tubos eppendorf (40µL en cada uno) que se congelaron a -70°C si no se utilizaron en el momento.

La transformación por electroporación se realizó de acuerdo a los procedimientos estándar mediante un pulso de 2500 V. (Ver Anexo XII.2.1)

VII.5.6 Preparación y transformación de células competentes de *B. subtilis*

Se creció un cultivo de *B. subtilis* O/N a 37°C y 300rpm, para inocular un medio de transformación *Bacillus* I (Ver Anexo XII.2.2), se incubó a la misma temperatura y agitación por 4 o 5 horas hasta alcanzar la turbidez. Una vez conseguido esto se realiza un segundo pase en el medio de transformación de *Bacillus* II (1:10), y se separa el cultivo en dos tubos con 0.5 mL, uno de ellos se transforma con 1-2µg de DNA plasmídico y el otro queda como control, posteriormente se incuban

a 37°C y 300rpm por 5 horas y se plaquean en cajas con antibiótico selectivo para el DNA transformante.

VII.5.7 Separación electroforética de DNA

Para el análisis de los fragmentos de DNA, se prepararon geles de agarosa (0.6-1.5% (w/v)) en buffer TAE) con bromuro de etidio 0.5%. Las muestras de DNA se mezclaron con un buffer de carga para facilitar la carga y para que indicara el progreso en la migración de DNA. Se utilizaron marcadores estándar (gene ruler) de acuerdo a las instrucciones del productor. Para la separación electroforética se aplicó un voltaje de 80V, posteriormente, el DNA fue visualizado por la fluorescencia del bromuro de etidio bajo luz UV (λ 312nm).

Buffer TAE	
TRIS-acetato (pH 8.0.)	40.0mM
EDTA	1.0mM

Buffer de carga	
Azul de bromofenol	350.0 μ M
Glicerol	50% (w/v)

VII.5.8 Secuenciación del plásmido pSSBm85XylR

La modificación exitosa del plásmido pSSBm85 en pSSBm85XylR, se confirmó mediante la secuenciación de la respectiva región de DNA, (Unidad de Secuenciación, IBt, UNAM) así mismo para verificar la secuencia del plásmido pSSBm85, se diseñaron varios oligonucleótidos para cada fragmento de éste. Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se enlistan a continuación:

Tabla VII. g Primers-Oligonucleótidos

Primers	Aplicación	Secuencia 5'->3'
7-62 7-66	Región 1-790	CCA ACA CTT CAA CGC ACC TT AAA ATT CAC AAT GGG GAT AT
923Bs 1710Bs	Región 923-1710	TGG CCA ACA CTT GTC ACT AC CCT CTG ACT TGA GCG TCG AT
1506Bs 2556Bs	Región 1506-2556	AAC GGA TTC ACC GGT CCA AG GTC TCG CGG TAT CAT TGC AG
4040Bs 4463Bs	Región 4040-4463	TCG GCA GTA CTT AGC TGG TG AAG GAG TCG GTC CAG CGA TT
5217Bs 6238Bs	Región 5217-6238	TCG CCT TCT TCT GTG TCA TC AGG TGC GTT GAA GTG TTG GT
433ps 1464ps	Región 433-1464 (MOD)	GGC ACC TAT CTC AGC GAT CT GGC CTC GTG ATA CGC CTA TT
1395ps 2452ps	Región 1395-2452 (MOD)	TGC CAC CTG ACG TCT AAG AA CCA GCG ATT GGT GGA ATG AT
xyba-F xyba-R	Corte con la enzima XbaI	TTA AGC CGT CTG TAC GTT CC CAA TCT AGA GGC GGC AGA AG
xylR-F xylR-R	gen xylR	GCG CAA CTA CAA CCA TTA CG CAA CTG GAG GAG AGC AAT GA

VII.6 Técnicas bioquímicas

VII.6.1 Expresión de genes recombinantes en *B. subtilis*

Las cepas de *B. subtilis* (168 y evolucionadas; CV842, CV846, CV863, CV879 transformadas con pSSBm85 y pSSBm85XylR⁻), se crecieron en 5 mL de medio LB con 5µg mL⁻¹de Tet durante 12 horas(Pre-inóculo); este cultivo se utilizó como inóculo para el volumen de 25mL de LB (Inóculo) con la misma concentración de antibiótico 0/N y finalmente se realizó la fase de cultivo en 50mL de LB con Glu y Xil 8g L⁻¹, por separado a 37°C en matraces bafleados de 250mL, 250rpm durante

24 h. La expresión del gen recombinante (*gfp*) en el sistema original es inducida por xilosa, pero no en la versión constitutiva (pSSBm85/XylR⁻).

VII.6.2 Análisis de auto-fluorescencia en *B. subtilis*

Se realizó un cultivo de 50 mL en medio LB, a 37°C y 300rpm en matraces bafleados (250 mL) de *B. subtilis* 168 (wt) sin transformar, del cual se midió la fluorescencia a 512nm después de 8 horas de cultivo (ver VII.6.5)

VII.6.3 Preparación de la fracción intracelular proteica

Durante los tiempos de muestreo (3h-24h) se tomó el volumen correspondiente a 0.3DO_{600nm} de los cultivos de *B. subtilis*, el cual se centrifugó (13,000 *g*; 10 min). El sobrenadante fue removido completamente y las células se resuspendieron en 25µL de sample buffer mod. Después se congelaron hasta el momento en que serían analizadas por electroforesis en gel (Sección VII.6.4), en ese momento se sonicaron durante 10 segundos a 10 micrones (Soniprep 150).

Sample buffer mod. 2X (10mL)	
TRIS-HCl	1.0 mL
Azul de bromofenol	800µL
Glicerol 20% (w/v)	2.0mL
B-mercapto-etanol	1.0mL
dH ₂ O	5.2mL

VII.6.4 Separación electroforética de proteínas

Las proteínas se analizaron por el método de electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE [Laemmli, 1970]. En el protocolo original las muestras se desnaturalizaban a 95°C por 5 minutos en una solución de SDS, en este caso como el objetivo es identificar la proteína verde fluorescente, necesitamos un gel no desnaturalizante (nativo) para identificarla, por lo que evitamos este paso

de desnaturalización así como la adición de SDS en los geles de poliacrilamida. Las muestras fueron cargadas en el gel durante aproximadamente 1 hr a 45mA.

Durante la electroforesis las proteínas se encuentran en el gel concentrador y posteriormente migran por el gel separador donde se localizan de acuerdo a su masa molecular en el gel de corrimiento. El estándar de peso utilizado (Page Ruler) se encuentra preteñido, el cual se tomó como indicativo del frente de corrida y de la separación de las bandas deseadas. Los geles fueron teñidos por al menos 18 h y subsecuentemente desteñidos hasta que las bandas de proteína fueran claramente visibles.

Gel concentrador (6%(v/v))	
dH ₂ O	5.5 mL
Tris-HCl (500mM, pH 6.8)	2.5 mL
Solución stock de acrilamida 30%	2.0 mL
TEMED	10.0 µL
Solución de peroxidisulfato de amonio	100.0 µL

Gel de corrida (12% (v/v))	
dH ₂ O	7.0 mL
Tris-HCl (1.5M, pH 8.8.)	5.0 mL
Solución stock de acrilamida (30%)	8.0 mL
TEMED	20.0 µL
Solución de peroxidisulfato de amonio	200.0 µL

(10% (w/v))	
-------------	--

Buffer electrophoresis	
TRIS-HCl (pH 8.8)	50.0 mM
Glicina	385.0 mM

Solución de teñido	
Etanol	30.0% (v/v)
Ácido acético	10.0% (v/v)
Azul de Coomassie	0.3% (w/v)
β-mercaptoetanol	1.0mL

Solución de desteñido	
Etanol	30.0% (v/v)
Ácido acético	10.0 % (v/v)

VII.6.5 Medición de fluorescencia de la proteína verde

VII.6.5.1 Fluorímetro

La proteína GFP fue cuantificada vía espectrómetro de fluorescencia (fluorímetro) utilizando una celda de cuarzo (1x1cm). Las muestras fueron normalizadas a una densidad óptica de 1.0_{600nm}, lo cual en *B. subtilis* 168 corresponde a 0.35g/L (datos de laboratorio) y centrifugadas (10,000 rpm/10 min). El pellet resultante fue resuspendido en buffer PBS. Las muestras fueron excitadas a 480 nm y la emisión de fluorescencia recuperada a 512nm. En caso de que se necesitaran diluciones (unidades de fluorescencia mayores a 300) se realizaban en el mismo PBS.

Buffer de fosfato salino (PBS)	
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2.0 mM

La fluorescencia relativa de las diferentes muestras se dedujo mediante una correlación lineal: GFP [mg/mL]= máxima emisión relativa x 3.42 x 10⁻⁶ x factor de dilución [Biendendieck, *et al.*

2006]. Dado que conocemos la relación entre densidad óptica y peso seco podemos expresar el resultado en mg/g_{CDW}.

VII.6.5.2 Citometría de flujo

El análisis de citometría de flujo para cuantificar la fluorescencia de GFP, se realizó con el equipo FACSCanto que utiliza como fase móvil FACS Flow (Becton Dickinson) y analizado con el software FACSDiva (Becton Dickinson) en función del número de eventos programados, en este caso fueron 10,000 células por muestra que se encontraban en PBS.

Los parámetros Side (SSC) y Frontal Scatter (FSC), fueron ajustados para mostrar a toda la población. Los datos de la proteína verde GFP se colectaron en el canal FL1 (520±20 nm) y PI en el canal FL3 (>610nm) de los diferentes tiempos de los cultivos de *B. subtilis* (168, CV842, 46, 63 y 79), los cuales se conservaron en PBS hasta su medición, se determinó que la población GFP-positiva se encuentra a partir de 10³ UF (Unidades de Fluorescencia), en base a un cultivo de *B. subtilis* 168 (wt).

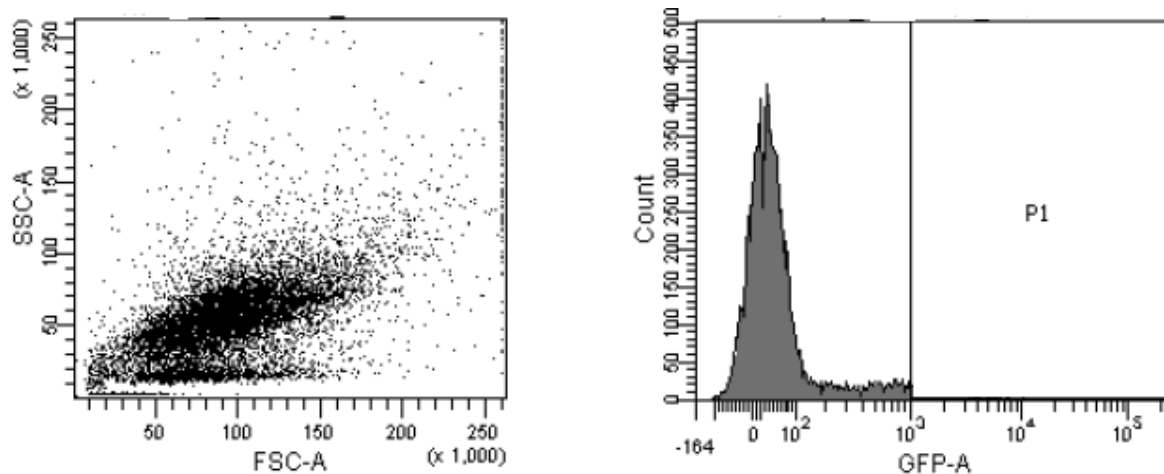


Figura VII. b Población de *B. subtilis* 168 GFP-negativa

Se ilustra la población de un cultivo de *B. subtilis* 168 si transformar del lado izquierdo, el tamaño y complejidad de cada célula y del lado derecho la distribución de éstas en unidades de fluorescencia.

VII.6.6 Análisis de proteasas

Se realizaron cultivos en placa en medio Skim Milk provenientes de un cultivo líquido en medio LB de las cepas *B. subtilis* 168 (wt), CV842, CV846, CV863, CV879 con el plásmido pSSBm85 y pSSBm85 XylR-, para observar la presencia y las diferencias existentes de proteasas en específico de caseinasas, con un protocolo modificado del laboratorio de Biología III de la Universidad de Zürich (Anexo XII.2.4).

VII.6.7 Concentración de azúcares y productos del cultivo

Las muestras obtenidas se centrifugaron 13,000 rpm/10 min [Eppendorf 5301] y posteriormente se filtró el sobrenadante con membranas de poro 0.45 μm para medir la concentración de glucosa o xilosa y los metabolitos formados (acetato, acetoína y butanodiol) durante el cultivo utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC Waters Milford, MA) en una columna de Ácidos Aminex HPX-87H, H_2SO_4 5 mM como fase móvil a 50°C, flujo de 0.5 mL/min y un volumen de inyección de muestra de 20 μL . La detección se realizó mediante un arreglo de diodos Waters 996 y un detector de refracción Waters 410.

A continuación se muestran los tiempos de retención promedio para las diferentes concentraciones utilizadas (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 g/L) para generar las curvas patrón (Anexo XII.3) con las que se cuantificaron cada uno de los compuestos en los cultivos de manera cinética, relacionando el área bajo la curva de los cromatogramas obtenidos con la concentración (software Empower 2, Waters Milford, MA).

Compuesto	Tiempo de retención
Glucosa	10.322 (± 0.003)
Xilosa	11.024 (± 0.003)
Ácido acético	17.014 (± 0.013)
Acetoína	20.114 (± 0.003)
Butanodiol	21.614 (± 0.006)

VII.7 Cálculos de parámetros cinéticos y estequiométricos

En la Tabla VII. h se muestran las ecuaciones utilizadas para los cálculos realizados

Tabla VII.h Fórmulas utilizadas para los cálculos cinéticos y estequiométricos

Parámetro	Ecuación	Unidades
Velocidad específica de crecimiento	$\mu = (dX/dt)/X$	h^{-1}
Rendimiento biomasa/sustrato	$Y_{X/S} = \Delta X / \Delta S$	gX/gS
Rendimiento producto/biomasa	$Y_{P/X} = \Delta P / \Delta X$	$gP/gX; mgP/g_{CDW}$
Rendimiento producto/sustrato	$Y_{P/S} = \Delta P / \Delta S$	$gP/gX; mgP/gS$
Velocidad específica de consumo de sustrato	$q_S = \Delta X / \Delta S * \mu$	$gS/gX h$
Productividad específica	$q_P = \Delta P / \Delta X * \mu$	$UF/gX h; mgP/gX h$
Productividad volumétrica	$Q_P = \Delta P / \Delta t$	$mgP/L h$

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1 Caracterización de las cepas evolucionadas de *B. subtilis* transformadas con pSSBm85

Las cepas evolucionadas de *B. subtilis* 168 (CV842, 46, 63 Y 79: *pts⁻*, *glu⁺*) habían sido caracterizadas en términos de crecimiento en medio mínimo [Cabrera-Valladares, Tesis de Doctorado], sin embargo, en éste trabajo el objetivo fue caracterizarlas en términos de producción de proteína recombinante por lo que se escogió un medio rico (LB) al cual se le adicionó glucosa (8g/L) y xilosa (8g/L), para observar las diferencias entre las fuentes de carbono, además de tetraciclina (5µg/mL) para mantener la presión selectiva del plásmido.

En la Figura VIII. a se muestra el crecimiento (A y B), consumo de glucosa (C) o xilosa (D), la formación de ácido acético(E y F); también se midieron los ácidos orgánicos: acetoína y butanodiol; sin embargo los niveles de estos metabolitos son prácticamente nulos por lo que no se muestran y la emisión relativa de fluorescencia (G y H) de las cepas de *B. subtilis*: CV842, CV846, CV863 y CV879 comparadas con la cepa 168 (wt), todas transformadas con el plásmido pSSBm85.

En ella podemos observar un comportamiento similar entre las cepas en cuanto a las curvas de crecimiento, sin fase lag perceptible y con una fase exponencial que va desde las 0-8 hrs en promedio y al menos 12 horas del cultivo permanecen en fase estacionaria.

El crecimiento durante la fase exponencial en glucosa es similar entre las cepas llegando a una biomasa promedio entre 0.83-1.52 g/L (ver Tabla VIII. a), y con una velocidad específica de crecimiento entre 0.8-1.4 h⁻¹, siendo la cepa silvestre la más rápida (1.21 ±0.19 h⁻¹) y la CV879 la más lenta significativamente diferente al resto (0.75 ±0.08), lo cual es congruente con la velocidad de consumo de sustrato (q_s), ya que la cepa CV879 es la que más lento consume la glucosa (0.73 ±0.02 g_{gluc}/g_{biom}*h) entre las cepas evolucionadas (cuyo promedio es de 0.8 g_{gluc}/g_{biom}).

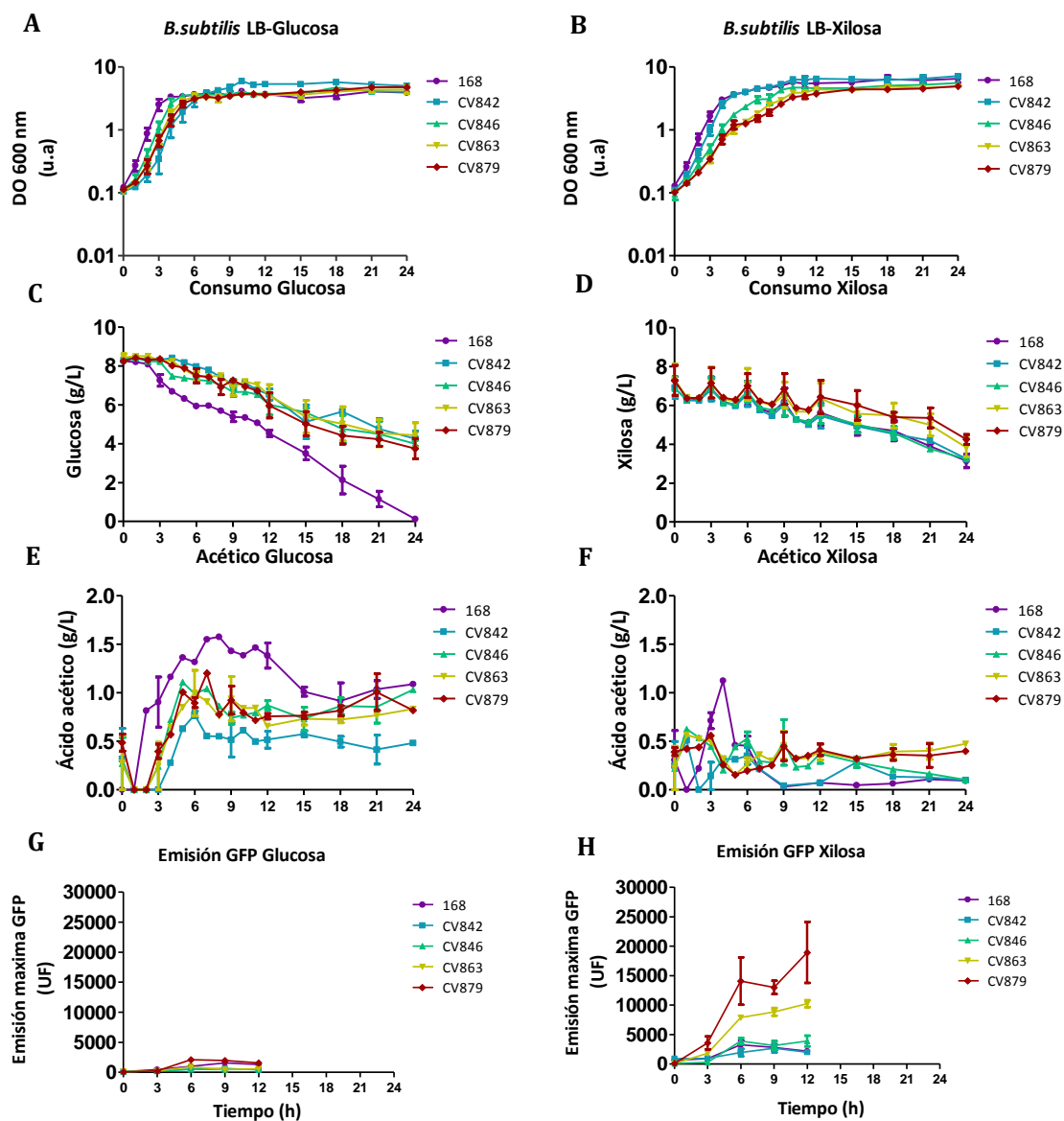


Figura VIII. a Cinéticas de crecimiento celular y de producción en *B. subtilis* 168 y evolucionadas transformadas con el plásmido pSSBm85.

Cultivos en matraces de 250m, con 50mL de medio LB a 37°C y 300 rpm, adicionada con 8g/L de glucosa y 8g/L de xilosa. El crecimiento celular se reporta con base en la densidad óptica medida a 600nm en escala logarítmica tanto para los cultivos con glucosa(A) como xilosa (B). El consumo de glucosa (C) o xilosa (D) así como la producción de ácido acético en el medio LB con glucosa (E) o xilosa (F) están expresados en g/L y la producción de la proteína GFP se expresa en unidades de fluorescencia relativas a 512nm en medio LB glucosa (G) y en LB xilosa (H).

Sin embargo, si se comparan las cepas evolucionadas con la silvestre, éstas tienen una velocidad de consumo de glucosa en promedio 55% menor. En éste sentido podemos decir que recuperaron la velocidad de crecimiento seguramente debido a otros componentes del medio LB y únicamente en un 45% la velocidad de consumo de glucosa. Es importante destacar que la velocidad de crecimiento observada para la cepa silvestre en medio mínimo [Cabrera-Valladares. Tesis de Doctorado] fue de 0.52 h^{-1} y en medio LB fue 2.3 veces mayor (1.21 h^{-1} ver Tabla VIII. a).

Cuando *B. subtilis* es crecida en medios que contienen glucosa actúa el complejo CcpA activando genes como *ackA*, para la producción de ácido acético de manera directa [Fujita, 2009] es por ello que no es raro encontrar que entre más rápida sea la velocidad de consumo de glucosa también lo será de producción de ácido acético. Este fenómeno se presenta en la cepa silvestre (Bs 168), la cual muestra la mayor velocidad de consumo de glucosa y es la cepa que produce más rápido el ácido acético ($1.06 \pm 0.32 \text{ g}_{\text{prod}}/\text{g}_{\text{biom}}*\text{h}$), seguida en ambos parámetros de la cepa CV846, CV863, CV879 y finalmente CV842 (ver Figura VIII. b).

Además de activar genes como *ackA*, el complejo CcpA es capaz de activar genes como *alsSD* para la producción de acetoína de manera indirecta [Fujita, 2009]; es por ello que se analizaron la producción de acetoína y adicionalmente butanodiol durante el cultivo. Estos metabolitos se encontraron únicamente en la cepa silvestre (Bs 168) y no en las cepas evolucionadas carentes del sistema PTS (ver Tabla VIII. a). Esto nos indica que el flujo de carbono, al menos no se está “fugando” a esas vías y que está siendo utilizado para la producción de biomasa y componentes celulares como lo muestran los rendimientos biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), los cuales se encuentran por encima de $1.0 \text{ g}_{\text{biom}}/\text{g}_{\text{glu}}$ para todas las cepas evolucionadas y de $0.69 \text{ g}_{\text{biom}}/\text{g}_{\text{glu}}$ para la cepa silvestre (el que exista un rendimiento superior a $1.0 \text{ g}_{\text{biom}}/\text{g}_{\text{glu}}$ indica que se están utilizando componentes del medio para la generación de biomasa que no pueden ser cuantificados debido a que el medio LB es un medio complejo, y el cálculo está basado en la glucosa añadida y la biomasa generada).

Tabla VIII. a Parámetros cinéticos de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85 en medio LB-glucosa en fase exponencial

Cepa	Biomasa (gx/L)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (gx/gs)	ΔGlucosa (gs)	Q_sGlucosa (gs/gx h ⁻¹)	ΔAcetato (gp)	Q_pAcetato (gp/gx h ⁻¹)	$Y_{pAcetato/s}$ (gp/gs)	ΔButanodiol (gp)	ΔAcetoína (gp)
168	1.05 (± 0.06)	1.21 (± 0.19)	0.69 (± 0.05)	1.51 (± 0.17)	1.73 (± 0.11)	0.91 (± 0.24)	1.06 (± 0.32)	0.61 (± 0.19)	0.21 (± 0.18)	0.06 (± 0.03)
CV842	1.31 (± 0.21)	0.88 (± 0.09)	1.18 (± 0.17)	1.11 (± 0.14)	0.75 (± 0.05)	0.38 (± 0.10)	0.26 (± 0.07)	0.34 (± 0.07)	0	0
CV846	1.18 (± 0.01)	1.07 (± 0.13)	1.26 (± 0.37)	0.98 (± 0.26)	0.87 (± 0.01)	0.99 (± 0.10)	0.90 (± 0.14)	0.85 (± 0.09)	0	0
CV863	1.03 (± 0.20)	1.04 (± 0.12)	1.40 (± 0.32)	0.75 (± 0.16)	0.78 (± 0.02)	0.88 (± 0.46)	0.84 (± 0.34)	1.13 (± 0.48)	0	0
CV879	1.02 (± 0.06)	0.75 (± 0.08)	1.04 (± 0.16)	0.99 (± 0.11)	0.73 (± 0.22)	0.75 (± 0.09)	0.54 (± 0.10)	0.75 (± 0.09)	0	0

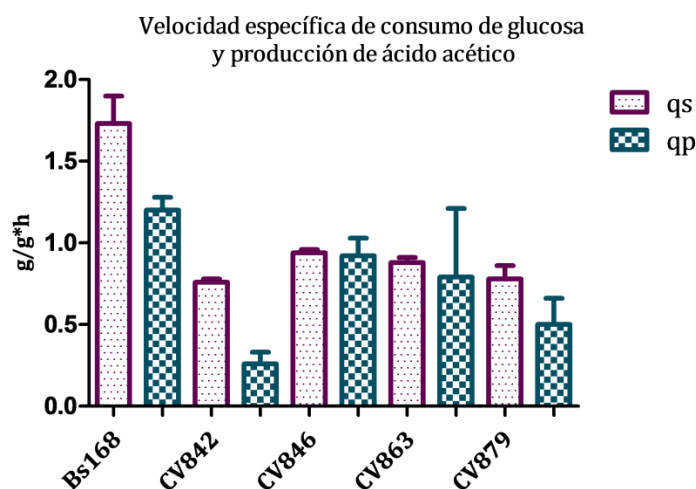


Figura VIII. b Velocidad específica de consumo de glucosa (q_s) y producción de ácido acético (q_p) en las cepas de *B. subtilis* 168 y evolucionadas transformadas con pSSBm85

Durante la fase estacionaria de los cultivos en medio LB con glucosa resalta que las cepas evolucionadas CV863 y CV879 mostraron una velocidad de crecimiento de siete y nueve veces (0.07 y 0.09 h^{-1} respectivamente) superior a la cepa silvestre (Bs 168), lo cual se ve reflejado en la biomasa generada (0.55 y 0.52 g/L respectivamente comparadas con 0.35 g/L de la silvestre) en esta fase, ambas consumieron alrededor de 3.0 g de glucosa y sólo la CV879 generó ácido acético, sin embargo el rendimiento $Y_{x/s}$ no se vio afectado significativamente en contraste con la cepa silvestre la cual a pesar de consumir más de 4.0 g de glucosa, esta cepa tiene un rendimiento biomasa/sustrato de aproximadamente la mitad de las cepas evolucionadas CV842, CV863 y CV879 (0.09 vs 0.15 , 0.21 y $0.17 \text{ g/g}\cdot\text{h}$ respectivamente; ver tabla VIII. b) . Cabe destacar que buena parte de la glucosa consumida en esta etapa por la cepa silvestre fue transformada en acetoína y en butanodiol como se muestra en la Tabla VIII b.

De manera interesante resulta investigar hacia dónde se dirigió el carbono en la cepa CV846 ya que únicamente el 6.56% del consumo de la fuente de carbono fue destinado a la generación de biomasa y no hay productos como butanodiol o acetoína.

Tabla VIII. b Parámetros cinéticos de las cepas 168, CV842, 46, 63 y 79 de *Bacillus subtilis* transformadas con pSSBm85 en medio LB-glucosa en fase estacionaria

Cepa	Biomasa (gx/L)	μ (h-1)	$Y_{x/s}$ (gx/gs)	Δ Glucosa (gs)	Q_s Glucosa (gs/gx h ⁻¹)	Δ Acetato (gp)	Q_p Acetato (gp/gx h ⁻¹)	$Y_{pAcetato/s}$ (gp/gs)	Δ Butanodiol (gp)	Δ Acetoina (gp)
168	0.35 (±0.31)	0.01 (±0.01)	0.09 (±0.05)	4.24 (±1.83)	0.16 (±0.10)	0.29 (±0.06)	0.01 (±0.002)	0.08 (±0.04)	0.21 (±0.18)	0.66 (±0.59)
CV842	0.34 (±0.15)	0.012 (±0.002)	0.15 (±0.08)	2.35 (±0.33)	0.10 (±0.07)	0.08 (±0.07)	0.03 (±0.01)	0.03 (±0.01)	0.08 (±0.01)	0.02 (±0.01)
CV846	0.17 (±0.08)	0.03 (±0.02)	0.06 (±0.03)	2.59 (±0.28)	0.47 (±0.16)	0.22 (±0.12)	0.04 (±0.03)	0.08 (±0.04)	0	0
CV863	0.55 (±0.04)	0.07 (±0.02)	0.21 (±0.02)	2.64 (±0.17)	0.34 (±0.15)	0.07 (±0.01)	0.01 (±0.003)	0.02 (±0.007)	0	0
CV879	0.52 (±0.11)	0.09 (±0.03)	0.17 (±0.02)	3.01 (±0.28)	0.52 (±0.11)	0.43 (±0.23)	0.07 (±0.03)	0.14 (±0.08)	0	0

Se sabe que *B. subtilis* 168 carece de un transportador específico para xilosa, por ello debe ser transformada a xilulosa [Dahl, *et al.* 1994]. Este dato fue corroborado en 2011, donde Bs 168 no mostró crecimiento en medio mínimo con xilosa como fuente de carbono, pero sí en las cepas evolucionadas [Cabrera-Valladares. Tesis de Doctorado].

Sin embargo durante los cultivos realizados en medio LB adicionados con xilosa, la cepa silvestre (Bs 168) fue una de las cepas que mayor velocidad de consumo de sustrato ($0.51 \text{ g}_{\text{sust}}/\text{g}_{\text{biom}} \cdot \text{h}$) y biomasa presentó, incluso igual que la obtenida con glucosa ($1.18 \pm 0.13 \text{ g/L}$ en glucosa y $1.05 \pm 0.06 \text{ g/L}$ en xilosa). Por el contrario, se pensaba que las cepas evolucionadas mostrarían una mayor velocidad de consumo de xilosa (la cual fue similar en todas las cepas excepto para CV846, ver Tabla VIII. c) y mayor biomasa que la cepa silvestre y no fue así, únicamente las cepas CV842 y CV846 alcanzan una biomasa en promedio superior a 1.0 g/L como Bs 168 (ver Figura VIII. c) en medio LB con xilosa.

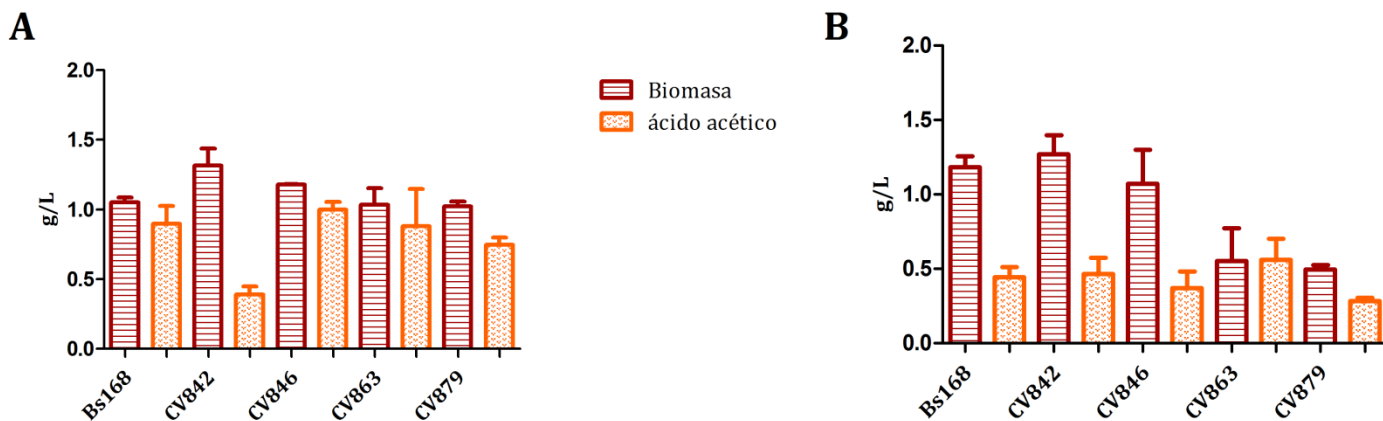


Figura VIII. c Biomasa y ácido acético producidos por las cepas de *B. subtilis*: 168, CV842, CV846 y CV863 transformadas con el plásmido pSSBm85 durante la fase de crecimiento exponencial en medio LB glucosa y xilosa.

Se muestra la biomasa y ácido acético producido en medio LB con glucosa 8g/L (A) y con xilosa 8g/L (B), durante la fase de crecimiento exponencial.

Lo anterior puede ser atribuido principalmente al medio LB (ya que en esta fase no es donde se consume la mayor parte de azúcar adicionada) y no así para las cepas CV863 y CV879 en xilosa (donde se obtiene la mitad de biomasa 0.55 g/L y 0.49g/L respectivamente). En este punto cabe destacar que la evolución de estas cepas fue realizada en medio mínimo adaptadas a crecer en glucosa y no en xilosa [Cabrera-Valladares, Tesis de Doctorado].

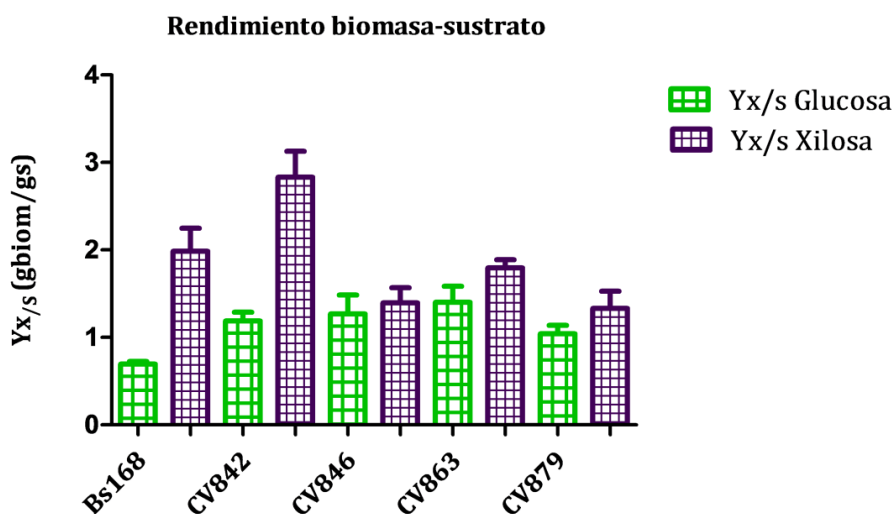


Figura VIII. d Rendimiento biomasa-sustrato durante la fase exponencial de los cultivos de *B. subtilis*: 168, CV842, CV846, CV863 y CV879 transformados con pSSBm85, en medio LB con glucosa/xilosa.

La xilosa consumida para el caso de las cepas silvestre y CV842 fue transformada de un 56-93% en ácido acético (es decir que por cada gramo de xilosa consumida, se registran 0.56-0.93 g de ácido acético en la fase) respectivamente y de manera similar para el resto de las cepas, aún con ello la producción de ácido acético es significativamente menor a la obtenida en glucosa (ver Figura VIII. c) para la mayoría de las cepas excepto para CV842, lo cual se ve reflejado en los rendimientos biomasa/sustrato, que en medio LB con xilosa fueron mayores para la cepa silvestre (Bs 168), CV842, y CV879 (en 2.8, 2.3 y 1.27 veces respectivamente) y prácticamente

iguales para las cepas CV846 y CV863 en fase exponencial que las obtenidas en LB con glucosa (ver tablas VIII a y c; y Figura VIII. d).

Otra característica importante a destacar de los cultivos realizados en medio LB con xilosa es que ninguno de ellos produjo acetoína, ni butanodiol (ver Tabla VIII. c).

Durante la fase estacionaria el consumo de la fuente de carbono así como la velocidad (q_s) en la que es consumida la xilosa es muy parecida entre las cinco cepas (ver Tabla VIII. d) , sin embargo la biomasa en las cepas evolucionadas es ligeramente mayor que en la silvestre probablemente porque observamos un mayor consumo de ácido acético producido durante la fase exponencial en las cepas CV846, CV863 y CV879, lo cual pudiera representar un aporte extra de fuente de carbono para estas cepas, sin embargo no es que exista una limitación de fuente de carbono para la cepa silvestre o alguna otra cepa, ya que a las 24 h de cultivo ninguna de ellas agotó la xilosa (8g/L) suplementada al medio (ver Figura VIII. a).

A propósito del consumo de ácido acético, se sabe que el genoma de *B. subtilis* no codifica para el shunt de glioxilato [Veith, *et. al* 2004], el cual es una variación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que permite utilizar el acetilCoA mediante las enzimas isocitrato liasa y malato sintasa y de esta manera recuperar el carbono que en ocasiones es transformado en ácido acético, 2-3 butanodiol y acetoína por sobreflujo metabólico [Komborg y Krebs 1957]. Sin embargo se ha reportado un bajo consumo de ácido acético (alrededor de 15mM vs 40mM) por parte de la cepa silvestre de *B. subtilis* 6051 HGW durante las primeras 12h de cultivo comparado con una cepa a la que se le introdujeron los genes *aceB* (isocitrato liasa) y *aceA* (malato sintasa) provenientes de *B. licheniformis* [Kabisch, *et al.* 2013]; por lo que no resulta extraño el consumo de este metabolito, pero sí el que se consuma antes de que la fuente de carbono se agote como ya ha sido reportado [Speck y Freese, 1973], lo cual resulta interesante desde el punto de vista de los bioprocesos [Dauner, *et al.* 2001], ya que podría explorarse la capacidad de consumo de ácido acético como sustrato, en estas cepas.

Tabla VIII. c Parámetros cinéticos de las cepas 168, CV842, 46, 63 y 79 de *Bacillus subtilis* transformadas con pSSBm85 en medio LB-xilosa en fase exponencial

Cepa	Biomasa (gx/L)	μ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (gx/gs)	Δ_{Xilosa} (gs)	$Q_{sXilosa}$ (gs/gx h ⁻¹)	$\Delta_{Acetato}$ (g)	$Q_{pAcetato}$ (gp/gx h ⁻¹)	$Y_{pAcetato/s}$ (gp/gs)	$\Delta_{Butanodiol}$ (gp)	$\Delta_{Acetoina}$ (gp)
168	1.18 (±0.13)	0.97 (±0.01)	1.98 (±0.45)	0.62 (±0.20)	0.51 (±0.12)	0.44 (±0.12)	0.35 (±0.06)	0.72 (±0.16)	0	0
CV842	1.27 (±0.22)	1.04 (±0.21)	2.83 (±0.51)	0.45 (±0.07)	0.38 (±0.12)	0.46 (±0.18)	0.42 (±0.26)	1.04 (±0.39)	0	0
CV846	1.07 (±0.39)	0.62 (±0.10)	1.18 (±0.39)	0.89 (±0.04)	0.55 (±0.14)	0.37 (±0.19)	0.22 (±0.13)	0.40 (±0.20)	0	0
CV863	0.55 (±0.38)	0.36 (±0.09)	1.36 (±0.75)	0.46 (±0.23)	0.35 (±0.24)	0.56 (±0.24)	0.41 (±0.17)	1.28 (±0.29)	0	0
CV879	0.49 (±0.05)	0.41 (±0.18)	1.33 (±0.34)	0.39 (±0.15)	0.31 (±0.11)	0.28 (±0.03)	0.10 (±0.09)	0.46 (±0.40)	0	0

Tabla VIII. d Parámetros cinéticos de las cepas 168, CV842, 46, 63 y 79 de *Bacillus subtilis* transformadas con pSSBm85 en medio LB-xilosa en fase estacionaria

Cepa	Biomasa (gx/L)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (gx/gs)	ΔXilosa (gs)	$Q_{sXilosa}$ (gs/gx h ⁻¹)	ΔAcetato (g)	$Q_{pAcetato}$ (gp/gx h ⁻¹)	$Y_{pAcetato/s}$ (g/g)	ΔButanodiol (g)	ΔAcetoina (g)
168	0.91 (±0.48)	0.12 (±0.08)	0.35 (±0.04)	2.55 (±1.42)	0.33 (±0.23)	0.14 (±0.08)	0.015 (±0.007)	0.08 (±0.07)	0	0.02 (±0.01)
CV842	0.95 (±0.27)	0.10 (±0.06)	0.51 (±0.13)	2.03 (±1.16)	0.23 (±0.21)	0.05 (±0.05)	0.006 (±0.006)	0.02 (±0.03)	0	0
CV846	1.36 (±0.68)	0.09 (±0.07)	0.61 (±0.39)	2.35 (±0.79)	0.21 (±0.16)	-0.16 (±0.18)	-0.018 (±0.021)	-0.05 (±0.05)	0	0
CV863	1.26 (±0.11)	0.12 (±0.06)	0.87 (±0.25)	1.51 (±0.38)	0.14 (±0.06)	-0.026 (±0.09)	-0.004 (±0.012)	-0.02 (±0.07)	0	0
CV879	1.01 (±0.33)	0.15 (±0.06)	0.51 (±0.17)	2.18 (±1.28)	0.34 (±0.23)	-0.079 (±0.20)	-0.013 (±0.03)	-0.008 (±0.07)	0	0

VIII.2 Versión constitutiva del plásmido pSSBm85

La caracterización de las cepas evolucionadas de *B. subtilis* 168 : CV842, CV846, CV863 y CV879, en este trabajo tiene que ver con su capacidad de producir proteína recombinante utilizando el plásmido pSSBm85, el cual contiene el gen de la proteína verde fluorescente (*egfp*) bajo el promotor del operón *xyl*, que como ya se mencionó anteriormente es inducible por xilosa.

Con la finalidad de evitar que los cultivos con xilosa se vean favorecidos (con respecto a los cultivos con glucosa) debido al sistema de inducción en cuanto a la producción de proteína, se planeó tener una versión constitutiva del plásmido; es decir, que independientemente de si el cultivo tiene o no xilosa, éste se encuentre expresando el gen *egfp*.

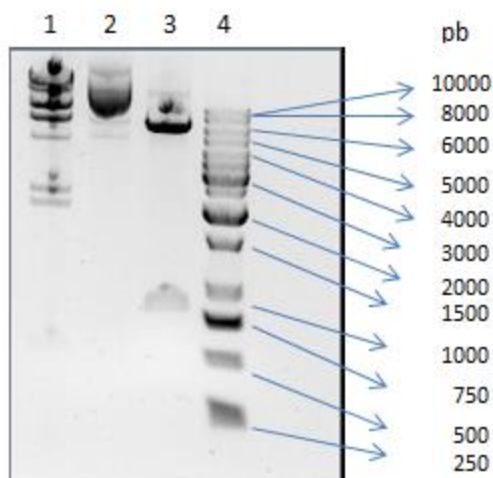


Figura VIII. e Digestión del plásmido pSSBm85 con la enzima XbaI

Gel de agarosa 1.5% p/v, TBE. 2) pSSBm85 sin digerir (7239pb), 3) plásmido pSSBm85 digerido con XbaI (6399+840pb), 4) Gene Ruler 1Kb.

La versión denominada constitutiva carece del 90% del gen *xylR*, la cual se generó mediante la digestión del plásmido pSSBm85 con la enzima XbaI. Originalmente el plásmido se encontraba en la cepa DH5- α de *E. coli* la cual contiene genes *dam*. Estos genes codifican para proteínas que transfieren un grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) a la posición N6 de los residuos de adenina en las

secuencias GATC, haciendo que algunas enzimas de restricción no puedan realizar cortes si el sitio de reconocimiento es precedido por GA o seguido de TC [Marinus y Morris, 1973]. Este es el caso de la enzima XbaI cuyo sitio de restricción es 5'... T[^]CTAGA...3' y que en la secuencia del plásmido se encuentra precedido por "GA" lo cual lo hace susceptible a metilación. Por ello se extrajo el DNA plasmídico de la cepa DH5- α y se transformó en la cepa JM110 de *E. coli* la cual es *dam*⁻, y permite realizar la digestión con XbaI (ver Figura VIII. e)

Una vez realizada la digestión se purificó el plásmido denominado pSSBm85/XylR⁻ y antes de continuar con la transformación en las cepas de *B. subtilis* se generaron oligonucleótidos (primers) que permitieran secuenciar por partes (fragmentos entre 1017-1150pb) el plásmido resultante y de ésta manera verificar que el fragmento de *xylR* que debía cortar la enzima XbaI ya no estuviera presente.

En la Figura VIII. d se muestra el alineamiento múltiple (Clone Manager Professional Suite©-Align Plus versión 4.00. Scientific & Educational Software) de la secuencia del plásmido pSSBm85 (renglón 1:~out), el fragmento correspondiente al gen *xylR* (renglón 2: NoName), el plásmido pSSBm85 con el corte (hipotético) realizado por la enzima XbaI (renglón 3: pSSBm85), el fragmento secuenciado correspondiente a la zona del gen *xylR* cortado con XbaI en el plásmido pSSBm85/XylR⁻ (renglón 4:1272) y el resto de las secuencias obtenidas por los diferentes oligos en el plásmido pSSBm85/XylR⁻ (renglón 5-15).

Este resultado permitió corroborar que efectivamente el plásmido pSSBm85/XylR⁻ carecía del 90% del gen *xylR* (renglón 4:1272, Figura VIII. f) y que el resto del plásmido se mantuvo intacto durante la digestión y ligación. Con el plásmido ya secuenciado se transformaron las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, CV846, CV863 y CV879 mediante el método de transformación de *Bacillus* (Anexo XII.2.2), utilizando cajas con medio LB y tetraciclina (5 μ g/mL) como sistema de selección.

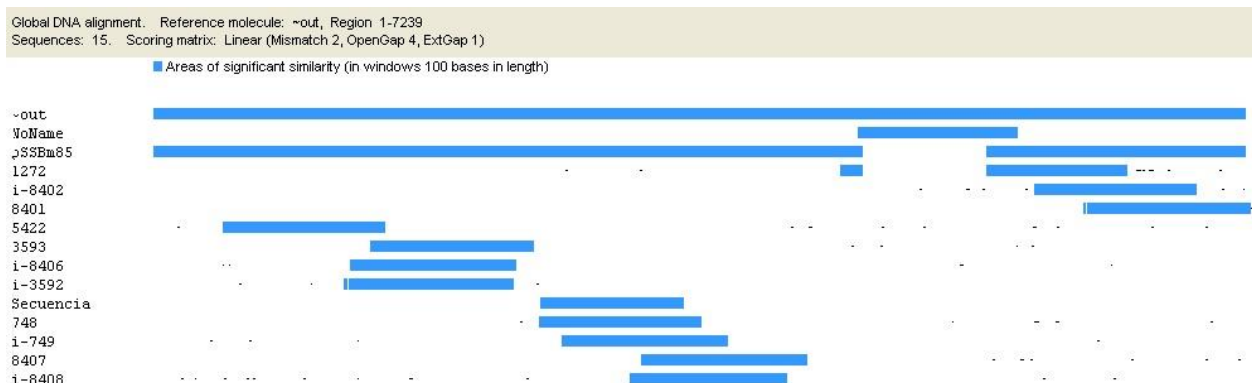


Figura VIII. f Alineamiento de las secuencias de pSSBm85 y pSSBm85/XylR-

Los primeros tres renglones corresponden a secuencias obtenidas de la base de datos obsequiada por el Dr. Dieter Jahn y el resto corresponden a datos experimentales obtenidos con los oligos generados para corroborar la secuencia y el corte en pSSBm85/XylR-.

VIII.3 Caracterización de las cepas evolucionadas de *B. subtilis* transformadas con pSSBm85/XylR-

Los cultivos de *B. subtilis* (168, CV842, 46, 63 y 79) transformados con el plásmido pSSBm85/XylR-, denominado constitutivo en este trabajo, se realizaron de la misma manera que los anteriores (con medio LB, suplementado con glucosa y xilosa (8g/L) y tetraciclina (5µg/mL) para mantener la presión selectiva del plásmido). Las cinéticas de crecimiento tanto en glucosa (A) como en xilosa (B), consumo de la fuente de carbono (glucosa (C), o xilosa (D)), así como la formación de ácido acético (E y F respectivamente) y la emisión relativa de fluorescencia (G y H) se muestran en la Figura VIII. g.

El crecimiento de las cepas de *B. subtilis* (168, CV842, CV846, CV863 y CV879) en medio LB con glucosa transformadas con pSSBm85/XylR-, muestran un comportamiento similar al de las transformadas con pSSBm85, en todos los casos llegando a una biomasa entre 0.94-1.63 g/L (ver Tabla VIII. e), y una velocidad de crecimiento específica de 0.85-1.02 h⁻¹, excepto para CV879 que en esta versión

presentó una disminución del 40% en este parámetro (0.75 h^{-1} en pSSBm85 y 0.46 h^{-1} en pSSBm85/XylR⁻¹) y una fase lag de 4h al inicio del cultivo (ver Figura VIII. e), sin embargo, esto no afectó en la biomasa final de la fase.

La evolución adaptativa realizada por Cabrera-Valladares [Tesis de Doctorado] ya había demostrado que el consumo de glucosa se recupera en medio mínimo, lo cual se mantiene en un medio complejo como el LB, ya que se observa que el consumo de glucosa aumenta conforme a los pases, es decir el pase 6 presenta un mayor consumo de glucosa que el pase 4 y el 8 que el pase 6 ($0.78_{\text{pase 4}} < 0.80_{\text{pase 6}} < 0.87_{\text{pase 8}}$ g), pero siguen superadas en el doble (1.77 g) por la cepa silvestre (Bs168).

Esto, al igual que en los cultivos inducibles (transformadas con pSSBm85), se ve traducido en una mayor producción de ácido acético y un menor rendimiento en biomasa- sustrato ($Y_{x/s}$) como se muestra en la Figura VIII. h, fenómeno que presenta claramente la cepa silvestre de *B. subtilis* 168 y ha sido ya descrito como un posible sobreflujo metabólico, el cual se origina por el desbalance entre el consumo de glucosa y su transformación en biomasa [Dauner, *et al.* 2001, Kabisch, *et al.* 2013], que en el caso específico de *B. subtilis*, se han identificado ya la activación del complejo CcpA en medios adicionados con glucosa, como ya se describió anteriormente [Fujita, 2009].

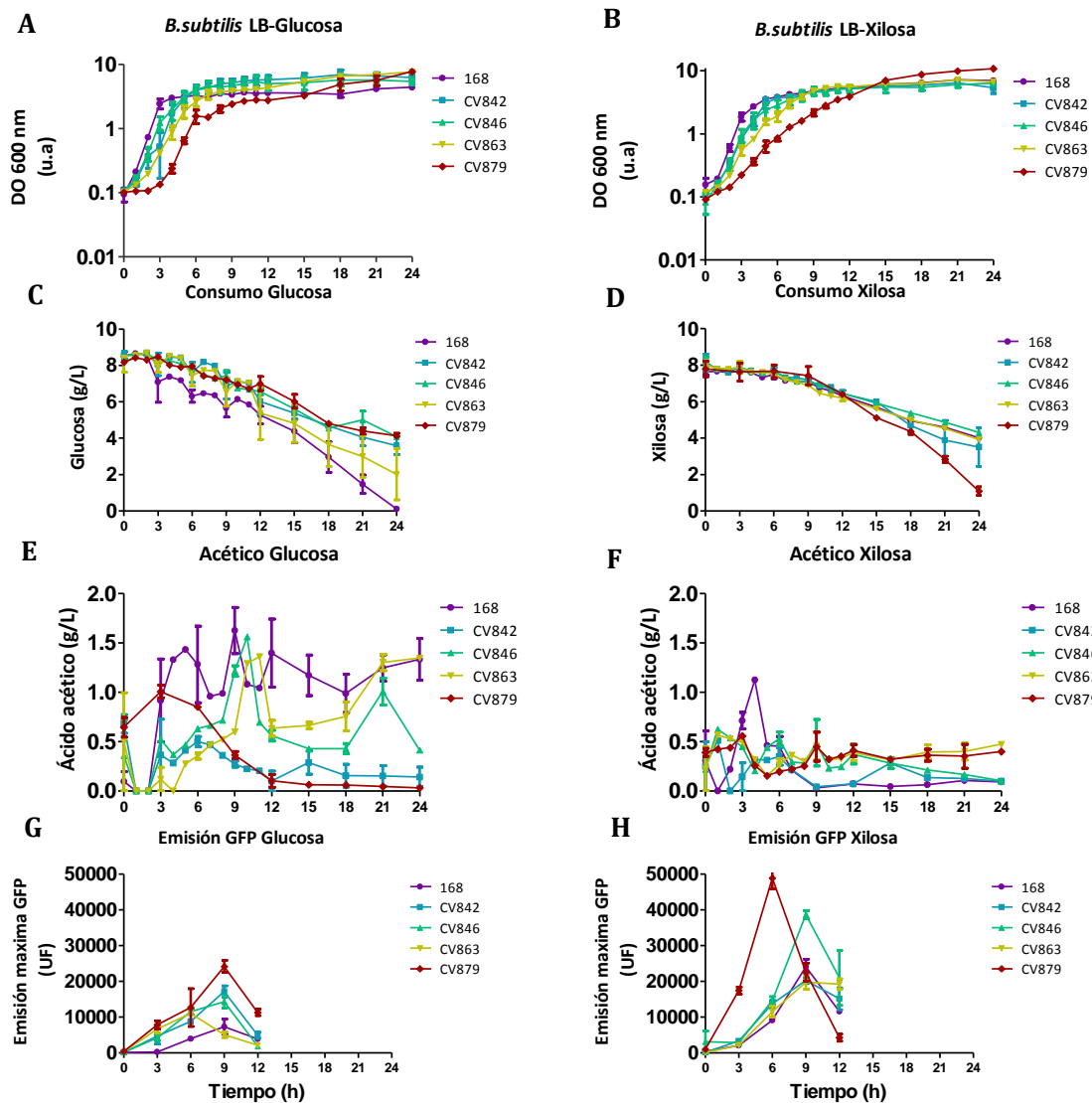


Figura VIII. g Cinéticas de crecimiento celular y de producción en *B. subtilis* 168 y evolucionadas transformadas con el plásmido pSSBm85/XylR-

Cultivos se realizaron en matraces de 250m, con 50mL de medio LB a 37°C y 300 rpm, adicionada con 8g/L de glucosa y 8g/L de xilosa. El crecimiento celular se reporta con base en la densidad óptica medida a 600nm en escala logarítmica tanto para los cultivos con glucosa(A) como xilosa (B). El consumo de glucosa (C) o xilosa (D) así como la producción de ácido acético en el medio LB con glucosa (E) o xilosa (F) fueron cuantificados mediante HPLC y están expresados en g/L y la producción de la proteína GFP se expresa en unidades de fluorescencia relativas a 512nm en medio LB glucosa (G) y en LB xilosa (H).

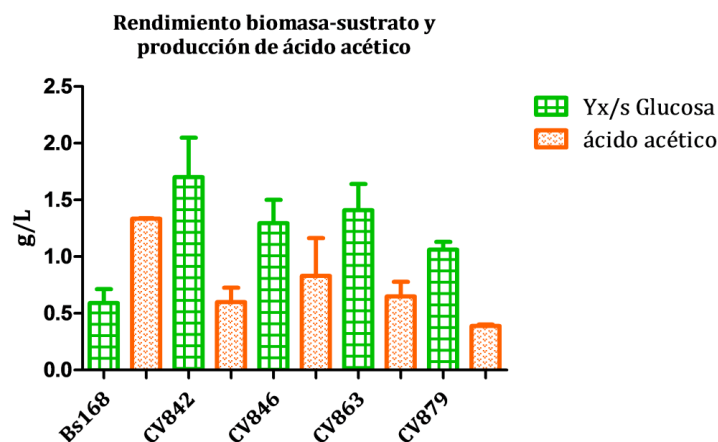
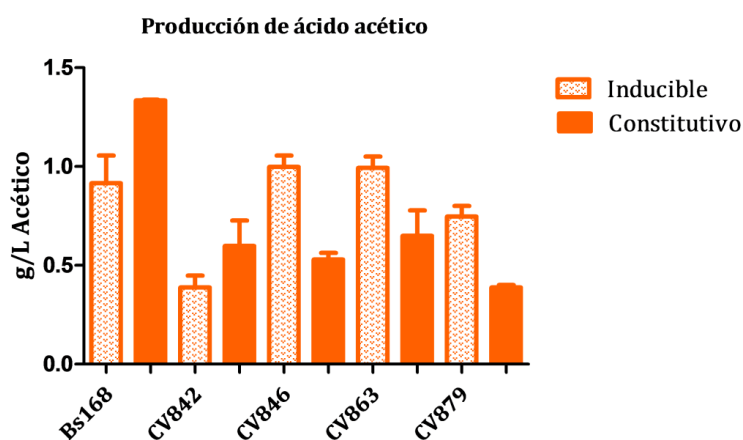


Figura VIII. h Rendimiento biomasa-sustrato y producción de ácido acético durante la fase exponencial de los cultivos de *B. subtilis*: 168, CV842, CV846, CV863 y CV879 transformados con pSSBm85/XylR, en medio LB con glucosa.

El rendimiento biomasa-sustrato se ve afectado por el incremento en la producción de ácido acético, fenómeno que ha sido descrito como un posible sobreflujo metabólico.

La producción de ácido acético durante la fase exponencial en los cultivos con glucosa fue mayor en 32% para las cepas silvestre (Bs168, 1.33 g vs 0.91g) y en 36% para CV842 (0.60 g y 0.38 g) en la versión constitutiva del plásmido (pSSBm85/XylR)



comparadas con la versión inducible (pSSBm85) pero no así para el resto de las evolucionadas CV846, 63 y 79 que en todos los casos resultaron significativamente menores (ver Tabla VIII. a, Tabla VIII. e y Figura VIII. i)

Figura VIII. i Producción de ácido acético durante la fase exponencial de los cultivos de *B. subtilis*: 168, CV842, CV846, CV863 y CV879 transformados con pSSBm85 (inducible) y pSSBm85/XylR (constitutivo) en medio LB glucosa.

Tabla VIII. e Parámetros cinéticos de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85/XylR⁻ en medio LB-glucosa en fase exponencial

Cepa	Biomasa (gx/L)	μ (h ⁻¹)	Y_{x/s} (gx/gs)	ΔGlucosa (gs)	Q_sGlucosa (gs/gx h ⁻¹)	ΔAcetato (gp)	Q_pAcetato (gp/gx h ⁻¹)	Y_pAcetato/s (gp/gs)	ΔButanodiol (gp)	ΔAcetoina (gp)
168	0.98 (±0.07)	1.02 (±0.12)	0.59 (±0.17)	1.77 (±0.69)	1.91 (±0.78)	1.33 (±0.01)	1.42 (±0.03)	0.81 (±0.31)	0	0
CV842	1.63 (±0.59)	1.01 (±0.12)	1.70 (±0.49)	0.78 (±0.07)	0.62 (±0.28)	0.60 (±0.18)	0.49 (±0.14)	0.75 (±0.15)	0	0
CV846	0.96 (±0.31)	0.95 (±0.36)	1.29 (±0.29)	0.63 (±0.12)	0.62 (±0.18)	0.83 (±0.17)	0.83 (±0.17)	1.25 (±0.50)	0	0
CV863	1.19 (±0.16)	0.85 (±0.13)	1.41 (±0.32)	0.80 (±0.05)	0.58 (±0.01)	0.65 (±0.18)	0.47 (±0.14)	0.81 (±0.27)	0	0
CV879	0.94 (±0.10)	0.46 (±0.10)	1.07 (±0.11)	0.87 (±0.01)	0.37 (±0.01)	0.40 (±0.02)	0.17 (±0.01)	0.45 (±0.01)	0	0

Los cultivos transformados con la versión constitutiva del plásmido (pSSBm85/XylR) mostraron un mayor consumo de glucosa (2-3 g en promedio) en la fase estacionaria comparadas con la versión inducible (pSSBm85), lo cual se refleja en la biomasa generada para las cepas CV846, CV863 y CV879 en 2.9, 2.5 y 3.6 veces respectivamente, pero no sucede para las cepas silvestre Bs 168, CV842 cuya biomasa es parecida (aprox. 0.4 g/L, ver Tabla VIII. b y Tabla VIII. f), lo cual resulta interesante ya que ambas en el balance de materia presentan una pérdida de 2.6-2.9 g de carbono que en el caso de la silvestre se podría pensar en otros ácidos orgánicos debido a que presenta las mayores concentraciones de ácido acético (1.49 g), butanodiol (0.57 g) y acetoina (1.48 g) en los experimentos realizados.

De la misma manera que en los cultivos inducibles (pSSBm85) las cepas evolucionadas CV863 y CV879 en la versión constitutiva del plásmido presentan una velocidad de crecimiento superior al resto durante la fase estacionaria (medio LB glucosa), en esta ocasión la diferencia es de 4.5 veces mayor en promedio a diferencia de siete y nueve veces en la versión inducible (ver Tabla VIII. b y Tabla VIII. f)

Tabla VIII. f Parámetros cinéticos de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85/XylR^r en medio LB-glucosa en fase estacionaria

Cepa	Biomasa (gx/L)	μ (h ⁻¹)	Y_{x/s} (gx/gs)	ΔGlucosa (gs)	Q_sGlucosa (gs/gx h ⁻¹)	ΔAcetato (gp)	Q_pAcetato (gp/gx h ⁻¹)	Y_pAcetato/s (gp/gs)	ΔButanodiol (gp)	ΔAcetoina (gp)
168	0.46 (±0.10)	0.05 (±0.01)	0.08 (±0.001)	7.18 (±0.17)	0.78 (±0.32)	1.49 (±0.52)	0.11 (±0.03)	0.20 (±0.06)	0.57 (±0.28)	1.48 (±0.01)
CV842	0.40 (±0.14)	0.08 (±0.02)	0.10 (±0.03)	3.28 (±0.34)	0.78 (±0.01)	0.28 (±0.02)	0.04 (±0.01)	0.08 (±0.01)	0	0
CV846	0.50 (±0.11)	0.06 (±0.01)	0.15 (±0.005)	3.69 (±0.03)	0.43 (±0.12)	1.13 (±0.18)	0.09 (±0.01)	0.31 (±0.04)	0	0
CV863	1.38 (±0.30)	0.27 (±0.05)	0.27 (±0.01)	4.52 (±0.89)	0.88 (±0.14)	1.79 (±0.60)	0.23 (±0.10)	0.38 (±0.05)	0	0
CV879	1.90 (±0.31)	0.37 (±0.12)	0.37 (±0.08)	4.98 (±0.15)	1.19 (±0.12)	0.046 (±0.001)	0.007 (±0.001)	0.009 (±0.001)	0	0

Observamos que la cepa silvestre, Bs. 168 consume cerca de 0.43 g de xilosa pero la producción de ácido acético es superior a este consumo (0.57g), lo mismo ocurre para la cepa CV842 donde la producción de ácido acético es mayor al consumo de xilosa (0.44 vs 0.19 g), para la cepa CV846 la cantidad de ácido acético es igual a la de consumo de xilosa (0.52-0.59 g). Sin embargo para las cepas CV863 y CV879 ocurre lo contrario, donde la producción de ácido acético es menor que el consumo de xilosa, en el primer caso ésta representa el 52.10% del consumo y la cepa CV879 a pesar de consumir 6 veces más xilosa no produce ácido acético (ver Figura VIII. j).

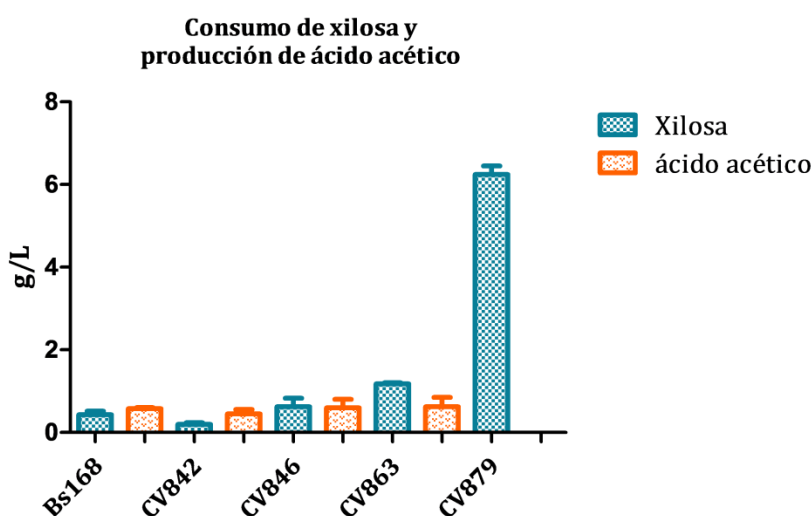


Figura VIII. j Consumo de xilosa y producción de acético durante la fase exponencial de los cultivos de *B. subtilis*: 168, CV842, CV846, CV863 y CV879 transformados con pSSBm85/XylR-

Los rendimientos biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$) en este caso resultan engañosos, ya que pareciera que *B. subtilis* 168 es más productiva que la cepa CV879, ya que la primera presenta un rendimiento $Y_{x/s}$ de $3.14 \text{ g}_{\text{biom}}/\text{g}_{\text{sust}}$ y la segunda de $0.58 \text{ g}_{\text{biom}}/\text{g}_{\text{sust}}$, pero es en realidad que la cepa silvestre obtiene prácticamente toda la biomasa del medio LB y no precisamente a la fuente de carbono suministrada, como sí lo es para la cepa CV879, la cual a pesar de generar 3 veces más biomasa que la silvestre y no producir los ácidos orgánicos: ácido acético, butanodiol y acetoína resulta ser la que menor rendimiento presenta.

Sin embargo si se observan las tablas correspondientes al crecimiento en medio LB con xilosa tanto en la versión constitutiva como en la inducible (Tabla VIII. g y Tabla VIII. c respectivamente) podemos observar que las cepas evolucionadas efectivamente consumen xilosa y esta es utilizada para la generación de biomasa (Ver Figura VIII. k). En la mayoría de los casos (excepto CV879) la xilosa consumida no rebasa la biomasa generada.

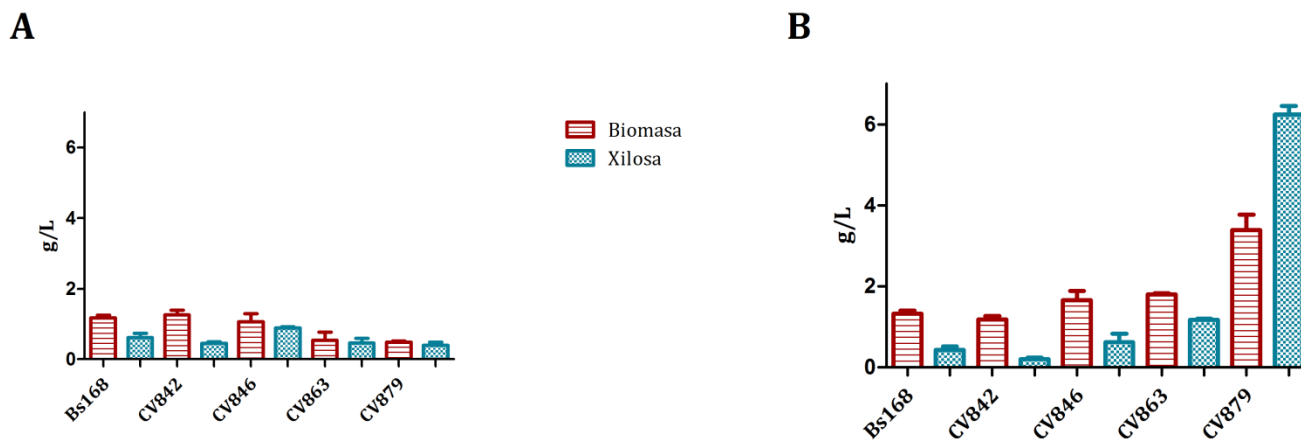


Figura VIII. k Biomasa producida y consumo de xilosa de las cepas de *B. subtilis*: 168, CV842, CV846 y CV863 transformadas con el plásmido inducible y constitutivo durante la fase de crecimiento exponencial en medio LB xilosa.

Se muestra la biomasa y el consumo de xilosa (8g/L) en medio LB durante la fase exponencial de las cepas estudiadas transformadas con pSSBm85 (A) (versión inducible) y pSSBm85/XylR (B) (versión constitutiva).

Los cultivos realizados con xilosa en su versión constitutiva a diferencia de lo ocurrido en la versión inducible muestran una menor producción de biomasa durante la fase estacionaria.

A pesar de consumir la misma cantidad de xilosa (caso de CV879 y CV846) o inclusive más (Bs 168, CV842 y CV863), ésta no se ve reflejada en mayor producción de biomasa disminuyendo de un 8% (CV842) hasta un 62% (CV863) en las cepas evolucionadas (ver Tabla VIII. d y Tabla VIII. h), y manteniéndose en la cepa silvestre, lo cual nos indica que el flujo de carbono se está dirigiendo a la producción de otros metabolitos.

Tabla VIII. g Parámetros cinéticos de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85/XylR⁻ en medio LB-xilosa en fase exponencial

Cepa	Biomasa (g/L)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	ΔXilosa (g)	Q_sXilosa	ΔAcetato (g)	Q_pAcetato	$Y_{pAcetato/s}$ (g/g)	ΔButanodiol (g)	ΔAcetoina (g)
168	1.32 (± 0.13)	0.79 (± 0.05)	3.14 (± 0.46)	0.43 (± 0.12)	0.24 (± 0.02)	0.57 (± 0.03)	0.33 (± 0.04)	1.38 (± 0.30)	0	0
CV842	1.18 (± 0.14)	1.06 (± 0.24)	5.99 (± 0.23)	0.19 (± 0.05)	0.16 (± 0.02)	0.44 (± 0.15)	0.37 (± 0.07)	2.24 (± 0.11)	0	0
CV846	1.33 (± 0.15)	0.55 (± 0.22)	2.39 (± 0.22)	0.52 (± 0.43)	0.24 (± 0.10)	0.59 (± 0.28)	0.29 (± 0.001)	1.39 (± 0.60)	0	0
CV863	1.47 (± 0.25)	0.67 (± 0.09)	1.24 (± 0.34)	1.19 (± 0.18)	0.54 (± 0.22)	0.62 (± 0.31)	0.30 (± 0.03)	0.59 (± 0.18)	0	0
CV879	3.39 (± 0.66)	0.68 (± 0.04)	0.58 (± 0.04)	6.45 (± 0.29)	1.19 (± 0.18)	-0.23 (± 0.07)	0	-0.06 (± 0.01)	0	0

Tabla VIII. h Parámetros cinéticos de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85/XylR⁻ en medio LB-xilosa en fase estacionaria

Cepa	Biomasa (g/L)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Δ_{Xilosa} (g)	$Q_{sXilosa}$	$\Delta_{Acetato}$ (g)	$Q_{pAcetato}$	$Y_{pAcetato/s}$ (g/g)	$\Delta_{Butanodiol}$ (g)	$\Delta_{Acetoina}$ (g)
168	0.98 (±0.07)	0.17 (±0.006)	0.29 (±0.02)	3.18 (±0.14)	0.58 (±0.05)	0.35 (±0.06)	0.06 (±0.01)	0.10 (±0.05)	0	0
CV842	0.87 (±0.27)	0.12 (±0.05)	0.26 (±0.03)	3.74 (±0.40)	0.66 (±0.33)	0.32 (±0.04)	0.05 (±0.001)	0.05 (±0.001)	0	0
CV846	0.70 (±0.41)	0.11 (±0.03)	0.31 (±0.09)	2.58 (±0.75)	0.37 (±0.04)	0.37 (±0.01)	0.05 (±0.01)	0.15 (±0.04)	0	0
CV863	0.48 (±0.18)	0.11 (±0.03)	0.19 (±0.07)	2.68 (±0.16)	0.59 (±0.001)	0.52 (±0.10)	0.12 (±0.03)	0.20 (±0.05)	0	0
CV879	0.31 (±0.07)	0.30 (±0.07)	0.42 (±0.14)	1.80 (±0.12)	2.77 (±0.80)	0	0	0	0	0

VIII.4 Producción de la proteína GFP en *B. subtilis*

El objetivo de este trabajo es relacionar el desempeño cinético (producción de biomasa, consumo de azúcares y producción de ácido acético) de las cepas de *B. subtilis* 168 y evolucionadas (CV842, CV846, CV863, CV879) con la producción de proteína GFP como indicador de proteína recombinante tanto en medio LB añadido con glucosa o xilosa, como con las versiones inducibles y constitutivas. Para ello se utilizaron tanto métodos cualitativos como cuantitativos.

En primer lugar era importante observar fenotípicamente la expresión del gen *egfp* contenido en los plásmidos tanto en la versión inducible como constitutiva. Se realizaron cajas de medio LB con glucosa y xilosa y se puso a crecer una colonia de cada una de las cepas estudiadas (*B. subtilis* 168, CV842, CV846, CV863 y CV879) transformadas con el plásmido pSSBm85 (versión inducible) y con el plásmido pSSBm85/XylR⁻ (versión constitutiva), en la Figura VIII. 1 podemos observar en la placa de LB-glucosa (A) que las cepas inducibles (2) no expresan la proteína verde fluorescente si no tienen la xilosa como inductor, como sucede en la placa B que contiene LB-xilosa; sin embargo la versión constitutiva (1) expresa GFP tanto en el medio que contiene xilosa como en glucosa.

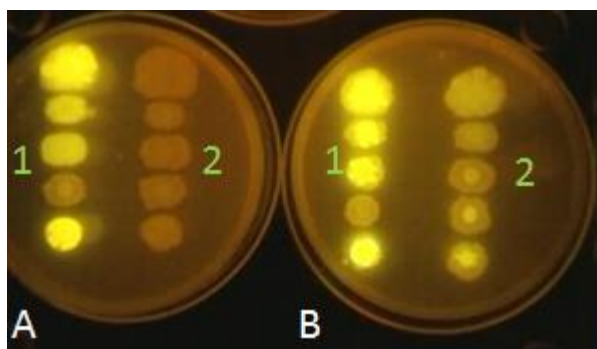


Figura VIII. 1 Fenotipo de las cepas de *B. subtilis* 168 y evolucionadas transformadas con los plásmidos inducibles y constitutivos en medio LB-glucosa y xilosa.

Se muestran las placas de LB-glucosa (A) y LB-xilosa (B) 8g/L, con las cepas transformadas con pSSBm85/XylR:1 y con pSSBm85:2 (versión inducible) en todos los casos de manera descendente en el orden siguiente: *B. subtilis* 168, CV842, CV846, CV863 y CV879.

Otra manera de verificar que la proteína GFP estaba siendo expresada en las cepas silvestre y evolucionadas de *B. subtilis* fue identificando la banda correspondiente en peso a la proteína verde fluorescente la cual es de 27KDa.

En los geles obtenidos para las diferentes cepas y condiciones se observan 2 proteínas principalmente, una de alrededor de 40kDa, la más abundante y otra por encima de los 25 kDa aproximadamente de acuerdo al marcador de peso molecular (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder). Se podría suponer que la proteína GFP correspondería a la banda de menor peso, sin embargo debido a que en el gel no se utilizó un agente desnaturizante (gel nativo), cuando lo dejamos sin luz pudimos observar que la banda de aproximadamente 40 kDa (la más abundante) correspondía a la proteína GFP. Esto se obtuvo para todas las cepas de manera cinética (en los tiempos de cultivo 3-6-9-12-15 y 18 h, ver Figura VIII. m).

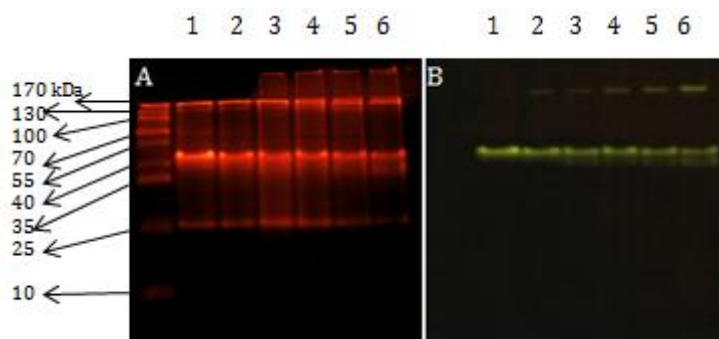


Figura VIII. m Patrones de expresión de proteína en electroforesis no desnaturizante de *B. subtilis* 168 transformada con pSSBm85/XylR

Perfil completo de las proteínas expresadas en la cepa Bs 168 transformada con pSSBm85/XylR en “A” vista a través de luz UV en GelDoc XR+ y “B” en oscuridad de manera cinética durante los tiempos 3 (carril 1), 6 (carril 2), 9 (carril 3), 12 (carril 4), 15 (carril 5) y 18h (carril 6) de cultivo en gel de acrilamida 14% no desnaturizante.

Cabe destacar que estos geles corresponden a la proteína intracelular, que es donde se encontraba la mayor cantidad de proteína recombinante (en promedio 97.8 % para todas las cepas de *B. subtilis* estudiadas, razón por la cual los siguientes experimentos

se realizaron únicamente con esta fracción), en ella se encuentra aún el péptido señal YocH, el cual fue elegido de una lista de péptidos señal predichos por PrediSi software para el transporte de proteínas en *B. megaterium* (y en el plásmido pSSBm85 donado), este péptido se encuentra naturalmente en *B. subtilis*, pero no se encontró en el secretoma de *B. megaterium*, por lo que se diseñó un péptido señal artificial (SP_{Asp}) y resultó de manera positiva para transportar la hidrolasa de *Thermobifida fusca* (Tfh) [Stammen, *et al.* 2010], pero parece no funcionar para GFP en *B. subtilis* 168 en este trabajo ya que prácticamente toda la proteína recombinante producida se quedó dentro de la célula.

Aún con el peso del péptido señal (aprox. 2.8 kDa), la proteína debería migrar en 30 y no en 40 kDa. Analizando el plásmido no se encuentran más elementos que pudieran afectar el peso (p. ej: cola His), una opción es que no se encontrara el codón de paro en el marco de lectura correcto y por ello tuviera aminoácidos extras.

Otra posibilidad que sugiere este peso son dímeros de GFP, en estado nativo GFP es monomérica en soluciones por debajo de los 2mg/mL, sin embargo en soluciones concentradas por encima de 5mg/mL se forman dímeros [Perozzo *et al.*, 1988, Chalfie, 1995], aunque no se tienen evidencias de dímeros *in vivo* [Yang, *et al.* 1996, Rizzo, *et al.* 2009], no se descarta la posibilidad de que se tengan concentraciones >5mg/mL en células que expresan GFP recombinante, incluso en los fotocitos de la medusa *A. victoria*, la concentración intracelular de GFP se estima en 25mg/mL [Cutler y Ward, 1997, Chalfie y Kain, 2006].

Una vez corroborada la expresión de GFP, se realizaron los perfiles de fluorescencia por medio de citometría de flujo de manera cinética en los diferentes cultivos (Anexo XII.4). De los reportes obtenidos se obtuvieron los gráficos (Figura VIII. n) y tablas a continuación.

En la Figura VIII. n se puede observar que la mayor expresión de proteína GFP tanto en los cultivos inducibles como constitutivos ya sea en glucosa o xilosa se presentó en

fase exponencial (ver Tablas XII.5 a, b, c y d en Anexos) , lo cual ya ha sido reportado para otras proteínas recombinantes y se debe a que para este fin se necesita de una elevada actividad celular y energía metabólica [Yuan, et al. 2004], la cual decrece durante fase estacionaria. En el caso del plásmido pRBBm53 en *B. megaterium* la producción de GFP decae luego de 6 horas de haberse inducido [Biedendieck, et al. 2007], lo cual coincide con los cultivos realizados en *B. subtilis* y las evolucionadas en este trabajo transformadas con el plásmido pSSBm85.

El sistema de represión *XylR* mediado por xilosa en el plásmido pSSBm85 presenta una transcripción fuga que se refleja en el porcentaje de la población GFP positiva en aquellos cultivos realizados en medio LB-glucosa, principalmente durante la fase exponencial (Figura VIII. n: A). Sin embargo aunque el rango de la población transcripcionalmente activa entre las evolucionadas de estos cultivos oscila entre el 40-70% éstas solo representan del 3-7% (Tablas XII.5 a y b: Anexos) de la cantidad de GFP emitida por aquellos cultivos que tienen al inductor de manera permanente (LB-xilosa, Figura VIII. n: B). Sin embargo para la cepa silvestre (Bs 168) el 20% de la población GFP positiva tiene un aporte del 21% de la fluorescencia total presentada por su similar en medio con xilosa.

La diferencia en la expresión de GFP de las cepas de *B. subtilis* transformadas con pSSBm85 crecidas en medio LB-glucosa comparadas aquellas que lo hicieron en medio LB-xilosa en promedio fue de 4.6 veces para la silvestre (Bs168), seguida de 13.72, 19.65, 26.97 y 32.40 veces para las cepas CV842, CV879, CV846 y CV863 correspondientemente. Esto no significa que la cepa CV863 fue la que mayor cantidad de GFP produce, lo que nos dice es que el sistema de expresión actúa de manera diferente entre las cepas, sin olvidar que es en xilosa donde el sistema de expresión se encuentra favorecido. Ello se ve reflejado en la productividad volumétrica que para todas las cepas en medio LB-xilosa es al menos un orden de magnitud superior a aquellas que crecieron en medio LB- glucosa (ver Tablas VIII, i y j). Debido al sistema de expresión sólo se pueden comparar las fuentes de carbono teniendo un sistema constitutivo.

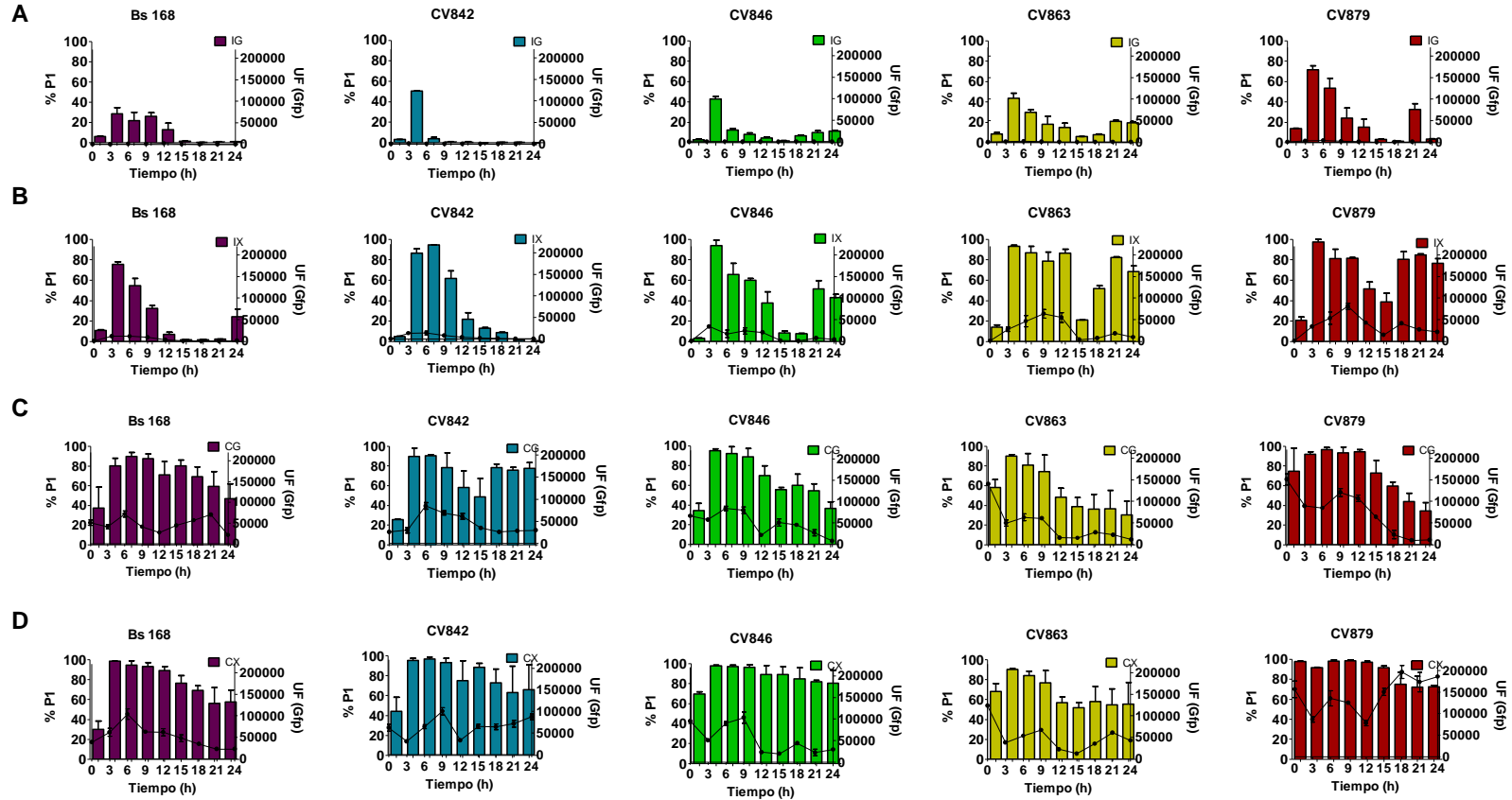


Figura VIII. n Perfiles de fluorescencia de las cepas de *B. subtilis* 168 y evolucionadas en medio LB en glucosa y xilosa transformadas con los plásmidos inducibles y constitutivos

El gráfico de barras (eje x izquierdo) muestra el porcentaje de la población GFP positiva, y la línea muestra la intensidad de fluorescencia de la población total medida en Unidades de Fluorescencia (UF) para los cultivos A: inducible con glucosa (anexo XII.5), B: inducible con xilosa, C: constitutivo con glucosa y D: constitutivo con xilosa de las cepas Bs 168, CV842, CV846, CV863 y CV879.

Dentro de los cultivos realizados con LB-glucosa es posible observar que los rendimientos $Y_{X/S}$ así como $Y_{P \text{ UFC-GFP}/S}$ de la cepa silvestre son los más bajos entre las cepas estudiadas en este experimento (ver Tabla VIII. i). Esto confirma la posibilidad del sobreflujo metabólico en *B. subtilis* al ser crecido en medio suplementado con glucosa [Fujita, 2009, Dauner, *et al.*2001, Kabisch, *et al.* 2013]. Las cepas evolucionadas al ser PTS⁻, disminuyen el flujo de glucosa y por lo tanto aprovechan mejor el sustrato tanto para la producción de biomasa como de proteína GFP, lo cual se ve reflejado en los rendimientos antes mencionados.

La cepa CV842 presenta el mayor rendimiento $Y_{P \text{ UFGFP}/S}$ debido a que durante la fracción del crecimiento exponencial es donde produce la mayor cantidad de GFP, prácticamente no consume glucosa y se encuentra utilizando componentes del medio LB, sin embargo esta etapa es limitada y en cuanto comienza a utilizar la glucosa la productividad se ve disminuida; por otro lado, la cepa CV879 es la que presenta la mayor productividad volumétrica cerca del 50% superior a la cepa CV842, es aquí donde las empresas deciden si prefieren una cepa que produzca una alta producción de proteína por poco tiempo o tener una cepa que siga produciendo en el tiempo con un mayor volumen.

Las cepas CV846 y 63 en esta condición semejan lo ocurrido con la cepa silvestre al tener bajos rendimientos y productividades de proteína GFP, coincidentemente son aquellas que presentan los rendimientos más altos de acetato.

Tabla VIII. i Rendimientos y productividades de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 Y 79 transformadas con pSSBm85 en medio LB glucosa.

Cepa	Y_{X/S} (gx/gS)	Y_P Acetato/S (gp/gS)	Y_P UF-GFP/S (UF/gS)	Q_D UF-GFP (UF/10000cel*h)	Q_P UF-GFP (UF/gx*h)
Bs 168	0.69 (±0.05)	0.61 (±0.19)	645.79 (±105.18)	196.42 (±17.31)	2362.90 (±303.76)
CV842	1.18 (±0.17)	0.34 (±0.07)	6303.53 (±91.54)	274.12 (±6.41)	25132.06 (±17289.32)
CV846	1.26 (±0.37)	0.85 (±0.09)	868.01 (±194.35)	154.78 (±46.26)	925.57 (±509.23)
CV863	1.40 (±0.32)	1.13 (±0.48)	1691.14 (±300.71)	276.38 (±25.99)	1734.31 (±735.65)
CV879	1.04 (±0.16)	0.75 (±0.09)	3106.17 (±267.11)	668.47 (±126.41)	2846.07 (±1157.04)

Tabla VIII. j Rendimientos y productividades de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 Y 79 transformadas con pSSBm85 en medio LB xilosa.

Cepa	Y_{X/S} (gx/gS)	Y_P Acetato/S (gp/gS)	Y_P UF(GFP)/S (UF/10000cel*h)	Q_D UF(GFP) (UF/10000cel*h)	Q_P UF(GFP) (UF/gx*h)
Bs168	1.98 (±0.45)	0.72 (±0.16)	18877.63 (±7841.97)	1970.48 (±206.69)	8700.71 (±929.22)
CV842	2.83 (±0.51)	1.04 (±0.39)	33893.20 (±19474.89)	2781.06 (±774.25)	14491.32 (±6251.99)
CV846	1.18 (±0.39)	0.40 (±0.20)	31536.51 (±2691.08)	3181.01 (±787.40)	13223.09 (±5253.16)
CV863	1.36 (±0.75)	1.28 (±0.29)	94031.86 (±28910.88)	7766.92 (±1085.85)	26677.14 (±8651.66)
CV879	1.33 (±0.34)	0.46 (±0.40)	125386.21 (±104274.85)	8183.61 (966.53)	48624.49 (±22260.62)

Para los cultivos realizados con xilosa, se observa que la cepa silvestre (Bs168) sigue teniendo el rendimiento producto/sustrato ($Y_{PUF-GFP/S}$) más bajo entre las cepas de este estudio (ver Tabla VIII. j) en al menos el 40% (comparado con CV846) y hasta el 85% (comparado con CV879) así como las productividades tanto volumétricas como específicas desde 1.4 (comparado con CV842) hasta 3.4 veces menor (comparado con CV879).

La cepa CV842 que había tenido el rendimiento producto (Gfp)-sustrato más alto en medio LB-glucosa, en xilosa esto ya no sucedió. Se puede observar que la fuente de carbono fue utilizada principalmente para la generación de biomasa ($Y_{x/s}$) y no para la producción de proteína recombinante (ver Tabla VIII. j). Las cepas CV863 y CV879 fueron las que presentaron el mejor desempeño tanto en rendimientos (desde 2.7 y 3.9 veces para las cepas CV842 y 46 hasta 5 y 6 veces sobre la cepa silvestre Bs168, respectivamente) como productividades de GFP sin importar la cantidad de ácido acético producido.

Posiblemente la producción del ácido acético en la cepa CV863 tenga otros efectos dentro del metabolismo que no fueron analizados en este estudio ya que aunque no rebasa los 1.5 g/L donde resulte inhibitorio [Bauer, *et al.* 1990], seguramente irá en decremento del funcionamiento general de la célula, lo cual se ve reflejado en la productividad específica (q_p), la cual resulta casi en la mitad de la cepa CV879 (ver Tabla VIII. j)

La versión constitutiva del plásmido pSSBm85 (pSSBm85/XylR⁻), en teoría nos permitiría comparar el desempeño de las cepas en función de las fuentes de carbono ya que eliminamos la proteína represora XylR del sistema de expresión del plásmido. Como ya se demostró fenotípicamente la expresión del plásmido pSSBm85/XylR⁻, se expresa sin la necesidad del inductor (ver Figura VIII. l).

La diferencia que existe en los niveles de fluorescencia entre los cultivos realizados en glucosa y xilosa fueron analizados mediante citómetro de flujo. En ellos se observa

que la fluorescencia en las cepas CV846, 63 y 79 en LB-glucosa empiezan en valores por encima de 50000 UF y en algunos casos superiores a los máximos obtenidos en la versión inducible con xilosa, por lo que al realizar el cálculo de los rendimientos de la versión constitutiva, el diferencial en la producción es menor ya que mantienen un nivel de producto alto desde el inóculo.

Es posible observar que el comportamiento de los cultivos en glucosa con la versión constitutiva es muy parecido a aquellos con la versión inducible en el sentido en que la cepa silvestre presenta los menores rendimientos tanto de biomasa como de proteína GFP/sustrato ($Y_{X/S}$, $Y_{P \text{ UFC-GFP/S}}$ respectivamente) en cuanto a biomasa representa alrededor del 50% menor y en rendimiento de UF-GFP desde 1.6 (vs CV846 y 63), 3.3 (CV842) y hasta 5.2 (vs CV879) veces menor a las cepas evolucionadas (ver Tabla VIII. k).

A pesar de que las cepas CV846 y 79 tienen las mismas productividades volumétricas, como específicas, es la cepa CV879 la que presenta el mayor rendimiento proteína GFP/sustrato y el rendimiento de ácido acético más bajo (55% menor con respecto a CV846) de todas las cepas aquí estudiadas (ver Tabla VIII. k).

En los cultivos realizados con pSSBm85/XylR, los rendimientos obtenidos mediante el cálculo correspondiente resultan menores que aquellos obtenidos en la versión inducible debido a que estos cultivos mantienen un nivel alto de producción desde el principio y la diferencia del producto resulta menor a aquellos que tienen un incremento mínimo. Ello se refleja en el rendimiento ($Y_{P \text{ UFC-GFP/S}}$) “aparente” de la cepa Bs 168 en medio LB- xilosa.

Independientemente de lo anterior, hay un aspecto importante a destacar y es que los rendimientos biomasa/sustrato se incrementaron luego de la transformación con el plásmido constitutivo para las cepas Bs 168, CV842, CV846, pero no para CV863 y CV879, en el caso de esta última disminuyen a la mitad.

Tabla VIII. k Rendimientos y productividades de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 Y 79 transformadas con pSSBm85/XylR⁻ en medio LB glucosa.

Cepa	Y_{X/S} (gx/gs)	Y_P Acetato/S (gp/gs)	Y_P UF(GFP)/S (UF/gs)	Q_p UF(GFP) (UF/10000cel*h)	Q_pUF(GFP) (UF/gx*h)
Bs 168	0.59(±0.17)	0.81 (±0.31)	14988.49 (±2055.36)	5448.35 (±440.91)	32106.96 (±9925.61)
CV842	1.70 (±0.49)	0.75 (±0.15)	49808.96 (±6996.92)	10201.715 (±543.83)	60616.38 (±10671.48)
CV846	1.29 (±0.29)	1.25 (±0.50)	25383.58 (±9305.84)	3334.82 (±625.41)	29227.53 (±690.51)
CV863	1.41 (±0.32)	0.81 (±0.27)	22771.68 (±7689.61)	2309.12 (±152.08)	26468.42 (±4966.84)
CV879	1.07 (±0.11)	0.45 (±0.01)	78765.35 (±8868.65)	10536.27 (±7547.93)	66267.56 (±7415.71)

Tabla VIII. l Rendimientos y productividades de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85/XylR⁻ en medio LB xilosa.

Cepa	Y_{X/S} (gx/gs)	Y_P Acetato/S (UF/10000cel*g)	Y_P UF(GFP)/S (UF/10000cel*h)	Q_p UF(GFP) (UF/10000cel*h)	Q_p UF(GFP) (UF/gx*h)
Bs 168	3.14 (±0.46)	1.38 (±0.30)	76237.29 (±10924.32)	11861 (1432.83)	46500.53 (±4500.47)
CV842	5.99 (±0.23)	2.24 (±0.11)	47022.97 (±28778.97)	4274.88 (31.11)	30246.02 (±2195.65)
CV846	2.39 (±0.22)	1.39 (±0.60)	71661.87 (±41460.23)	6632.68 (1155.83)	25304.19 (±16780.02)
CV863	1.24 (±0.34)	0.59 (±0.18)	26331.86 (±5867.39)	3331.67 (120.99)	12780.50 (±1838.65)
CV879	0.58 (±0.04)	-0.06(±0.01)	23424.01 (±2190.49)	12986.65 (216.74)	202354.66 (±49301.64)

En cuanto a la productividad volumétrica y específica en la versión constitutiva se mantiene la cepa CV879 como la mejor productora de proteína GFP recombinante, la cepa CV863 disminuyó su productividad volumétrica en casi 4 veces con respecto a la cepa CV879 cuando en la versión inducible eran iguales (ver Tabla VIII. I).

Cabe destacar que la cepa CV879 que en la versión inducible con xilosa presentaba un rendimiento producto-sustrato de acetato de 0.46 en esta ocasión el rendimiento es negativo debido al consumo de éste durante la fase exponencial, lo cual puede ser un factor por el cual la productividad de otros compuestos se haya incrementado, incluyendo la proteína GFP.

En estudios previos realizados con *E. coli* PTS⁻ [De Anda, *et al.* 2006], la producción y acumulación de acetato se ve reducida en 7.25 veces (2.83g/L vs 0.39g/L) lo cual se ve reflejado en mayor productividad de proteína GFP hasta en 4 veces (3322 UF/ g h vs 1246 UF/ g h). En este estudio podemos mencionar que la cepa PTS⁻ que mostró el mejor desempeño en cuanto a proteína recombinante se refiere, tanto en la versión inducible como en la constitutiva fue CV879. Comparada con la cepa silvestre Bs 168, se redujo la producción de ácido acético en 3.3 veces en medio LB- glucosa y en medio LB- xilosa el balance fue negativo es decir; hubo consumo en vez de producción de acetato, lo cual se vió reflejado en un incremento de la productividad específica en 2 veces para glucosa (32106 UF/g h vs 66267 UF/g h) y de 4.3 veces para xilosa (46500 UF/g h vs 202354 UF/g h).

La diferencia en la producción de proteína entre glucosa y xilosa depende de la ruta de degradación que sigue cada una, en principio el uso de xilosa reduciría la activación de genes que *ackA* y *pta* que tienen como producto final el acetato, que se activan en medios suplementados con glucosa [Fujita, 2009], por lo que existirían menos subproductos del metabolismo que pudieran disminuir los rendimientos de la proteína recombinante.

Uno de los problemas que no se previeron en este estudio fue la presencia de la proteína represora XylR en el cromosoma de *B. subtilis*; sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, el porcentaje de la población activa es prácticamente la misma en glucosa como en xilosa, por lo que se descarta que la diferencia observada se deba a la represión ejercida por XylR.

En la versión constitutiva se aseguró que al menos el 80% y hasta el 99% de la población en fase exponencial estuviera expresando GFP, así lo demuestran los análisis obtenidos en el citómetro de flujo (ver Figura VIII.n C y D). También podemos saber en qué porcentaje una cepa presenta mayor fluorescencia con respecto a otra, ya que la fluorescencia relativa medida en fluorímetro se correlaciona linealmente mediante la ecuación expresada por Biendendieck [Biendendieck, *et al.* 2006] donde: $GFP [mg/mL] = \text{máxima emisión relativa} \times 3.42 \times 10^{-6} \times \text{factor de dilución (de 1.0 u.a)}$, dado que sabemos la relación entre densidad óptica y peso seco (en *B. subtilis* es de 0.35) es posible expresar este resultado en mg/g_{CDW} unidades que nos permiten comprar la producción de GFP con datos ya reportados.

El plásmido pSSBm85 es producto de una serie de modificaciones dirigidas para incrementar la producción de proteína verde recombinante como reportera. Por ejemplo la modificación de las regiones -35 y -10 del promotor incrementa la unión de la RNA polimerasa y se tiene un mayor inicio de la transcripción, la delección del sitio NheI aumenta la producción de GFP en un 40%, entre otras [Stammen, *et al.* 2010].

En el cultivo de *B. megaterium* transformada con pSSBm85 se obtuvieron 82.5 mg_{GFP}/g_{CDW} , bajo el sistema de inducción por xilosa (7g/L) en matraces, sin embargo esta productividad se vio disminuida en el cultivo alimentado a 36.8 mg de GFP por g_{CDW} [Stammen, *et al.* 2010]. La productividad en matraces es similar a la que se reportó para *E. coli* [Durr Schmid, *et al.* 2008] la cual fue de 73.7 mg/g_{CDW} , lo cual lo hace un sistema de producción competitivo. En este estudio no se menciona la cantidad de ácidos orgánicos generados en el cultivo alimentado, pero en un trabajo previo de este grupo [Biendendieck, *et al.* 2007] se cuantificaron ácidos como succinato,

acetato, isobutirato, piruvato y propionato; los dos primeros llegaron a valores por encima de 8 g/L durante la alimentación y en donde la glucosa se encontraba en exceso, lo cual pudo derivar en sobreflujo metabólico y la evidente acidificación asociada así en *E. coli* como en *B. megaterium* [Hollmann and Deckwer, 2004].

En el trabajo de Biedendieck y colaboradores de 2007 se menciona que se requieren de nuevos protocolos de alimentación en donde se optimice la concentración de xilosa y se reprima la producción de ácidos orgánicos en los cultivos de *B. megaterium* para así aumentar la productividad. Este trabajo pretende atacar el segundo aspecto mencionado, en donde las cepas de *B. subtilis* PTS⁻, reduzcan el flujo metabólico y utilicen de manera más eficiente la fuente de carbono suministrada (glucosa y xilosa).

Las productividades volumétricas máximas a las 9hr de cultivo se encuentran representadas de manera gráfica en la Figura VIII. o, las versiones inducibles como las constitutivas en medio LB-glucosa y xilosa. En ésta se puede observar que la producción de GFP incrementa en el sistema constitutivo en 1.3 (CV879), 3.4 (CV863), 5.8 (CV846), 7.1 (CV842) y 7.8 (Bs168) veces sobre el sistema inducible con xilosa presente, por supuesto en el caso de la glucosa donde el sistema se encuentra reprimido el incremento en la producción del inducible con respecto al constitutivo es de 7-20 veces mayor (ver Tabla VIII. m).

Si comparamos la versión constitutiva tanto en glucosa como en xilosa, resulta que para todas las cepas la productividad en medio LB-xilosa es significativamente mayor. Regresando a la caracterización de las cepas se observa que entre las cepas transformadas con pSSBm85/XylR⁻, el único parámetro en el que se observa una tendencia es en la producción de ácido acético en donde hubo una reducción de 4.6 % para la cepa CV863, de 26% para la CV842, del 57% para la cepa Bs168, del 65% para la cepa CV846 y hasta del 100% para la cepa CV879, en el medio LB suplementado con xilosa a diferencia del medio LB con glucosa. Esto se relaciona en las cepas Bs168, CV842y CV846 donde la tasa específica de consumo de sustrato que se tiene de glucosa es mayor (de 2.5 hasta 8 veces) a la que se tiene en xilosa.

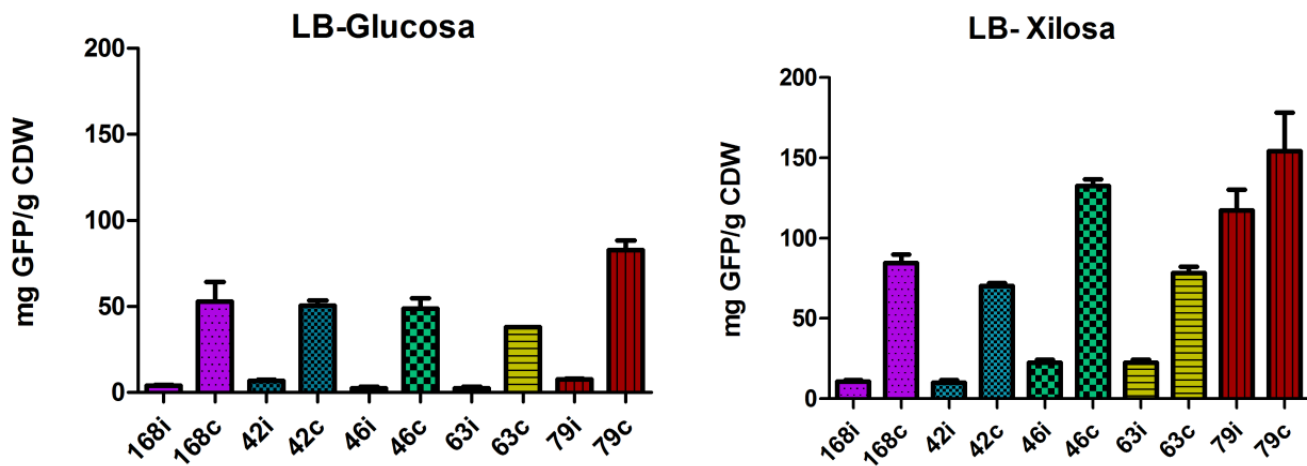


Figura VIII. o Productividad volumétrica de GFP en *B. subtilis* 168 y evolucionadas CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85 y pSSBm85/XylR⁻ en medio LB-glucosa y xilosa.

Inducible: subíndice i, Constitutivo: subíndice c.

Tabla VIII. m Productividad volumétrica máxima a las 9 hr de cultivo de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, CV846, CV863 y CV879 transformadas con pSSBm85 y pSSBm85/XylR⁻ en medio LB-glucosa y xilosa.

mgGFP/gCDW				
	pSSBm85		pSSBm85/XylR ⁻	
	LB-Glucosa	LB-Xilosa	LB-Glucosa	LB-Xilosa
Bs168	3.84 (±0.89)	10.73 (±1.08)	52.8 (±16.12)	84.65 (±7.14)
CV842	6.79 (±0.84)	10.01 (2.11)	50.65 (±4.03)	70.25 (±2.61)
CV846	2.33 (±1.22)	22.59 (±2.55)	48.8 (±8.34)	132.5 (±5.79)
CV863	2.66 (±0.76)	21.90 (±0.84)	37.9 (±0.28)	78.45 (±5.44)
CV879	7.64 (±0.57)	117.17 (±18.49)	82.7 (±8.06)	154.27 (±33.97)

De las cepas evolucionadas sólo CV879 produce mayor cantidad de proteína GFP que la silvestre en el medio LB-glucosa y CV846 junto con CV879 en medio LB-xilosa en la versión constitutiva del plásmido. Al respecto podemos decir que la productividad

volumétrica obtenida en matraces en el medio tradicionalmente usado para la producción de proteína recombinante tanto en *E. coli* como en *Bacillus* que es LB en este caso suplementado con glucosa (8g/L) en la cepa CV879 es de 82.7 mgGFP/gcdw, igual a la obtenida en 2010 en *B. megaterium* (82.5 mgGFP/gCDW) y superior en un 10% a la reportada por Durrschmid en 2008 para *E. coli* (73.7mgGFP/gCDW). Sin embargo en medio LB xilosa la cepa Bs 168 es capaz de producir 84.65 mgGFP/gCDW, la cepa CV863: 132.5mgGFP/gCDW (37% mayor a lo reportado para *B. megaterium*) y la cepa CV879 hasta 154.3 mgGFP/gCDW, (47% más), 1.8 veces más producto que lo obtenido en el modelo de *B. megaterium* para el cual fue diseñado el plásmido.

Una de las ventajas de las cepas evolucionadas, es la capacidad de crecer en medio suplementado con xilosa, lo cual reduce el sobreflujo metabólico que sucede al utilizar glucosa como fuente de carbono. Esto se traduce en una menor producción de ácidos y un mayor rendimiento tanto para la producción de biomasa como en proteínas de interés, así como la posibilidad de establecer lotes alimentados con menor riesgo de llegar a concentraciones de ácidos que resulten inhibitorios para el crecimiento.

Por último para determinar si entre las cepas silvestre y evolucionadas existía una diferencia en cuanto a la cantidad de enzimas proteolíticas que pudieran estar degradando la proteína GFP generada, se realizó una prueba con base en la caseína de leche la cual es positiva para *B. subtilis* debido a las proteasas que secreta. Se crecieron colonias de Bs 168 y las cepas evolucionadas en cajas con medio Skim Milk y se realizó un seguimiento de 96 h a los halos generados por cada una (por triplicado), de ahí se obtuvieron tasas de degradación (ver Figura VIII. p) y se pudo observar que no existían diferencias en la actividad proteolítica.

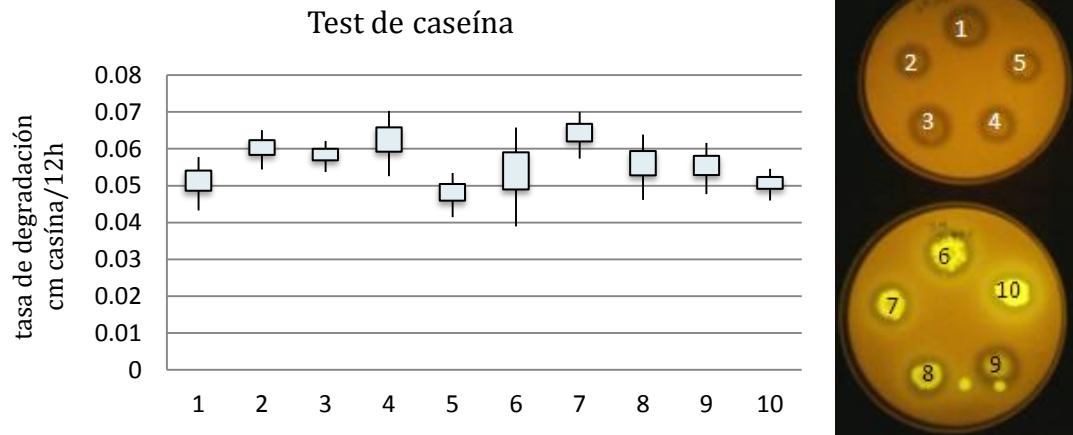


Figura VIII. p Test de caseína de las cepas de *B. subtilis*, 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85 y pSSBm85/XylR.

La tasa de degradación es la pendiente que se obtuvo del halo proteolítico medido cada 12 h durante 96 h. Cepas transformadas con pSSBm85: 1:Bs168, 2:CV842, 3:CV846, 4: CV863, 5: CV879. Cepas transformadas con pSSBm85/XylR: 6:Bs168, 7:CV842, 8:CV846, 9:CV863, 10:CV879

IX. CONCLUSIONES

1. Las cepas evolucionadas PTS⁻ presentan una velocidad de consumo de glucosa 55% menor a la cepa silvestre Bs168, lo cual se traduce en una menor producción de ácido acético (nula de acetoína y butanodiol) y un mayor rendimiento $Y_{x/s}$ (hasta 50% más) así como $Y_{P\text{ UFC-GFP/S}}$ (hasta 5 veces mayor).
2. Las cepas Bs168, CV846, CV863 y CV879 presentan una menor producción de ácido acético (nula de acetoína y butanodiol) en medio LB xilosa al compararse con LB glucosa, que se refleja en mayores rendimientos $Y_{x/s}$ y $Y_{P\text{ UFC-GFP/S}}$
3. El sistema de expresión del plásmido pSSBm85 presenta una transcripción fuga del 3-7% en las cepas evolucionadas y del 20% en la cepa silvestre en medio LB-glucosa
4. En presencia de xilosa (inductor) los cultivos transformados con pSSBm85 presentan un aumento de al menos un orden de magnitud comparados cpm glucosa.
5. La versión pSSBm85/XylR⁻ mantiene un porcentaje de la población entre 88-99% transcripcionalmente activa para GFP en fase exponencial.
6. La cepa evolucionada PTS⁻ CV879, fue la que mejor desempeño productivo presentó con una productividad de GFP específica de 2 veces en medio LB-glucosa y de 4.3 veces en xilosa sobre la cepa silvestre, disminuyendo la producción de ácido acético en 3.3 veces para el medio LB-glucosa y en su totalidad para xilosa.
7. La productividad volumétrica obtenida en la cepa silvestre y CV879 en medio LB-glucosa con la versión constitutiva del plásmido pSSBm85 superó a la obtenida por *E. coli* en un 10% [Durrtschmid, *et al.* 2008] e iguala a la reportada para *B. megaterium* (organismo para cual fue diseñado el plásmido). En medio LB-xilosa las cepas CV846 y CV879 lo superan en un 37% y 47% respectivamente.

X. PERSPECTIVAS

- Explorar la delección de genes como *pta* y/o *ackA* para evitar la formación de acetato en las cepas evolucionadas, esperando incrementar los rendimientos y productividades obtenidas.
- Debido al desempeño mostrado en este trabajo se sugiere diseñar una estrategia de cultivo en lote alimentado para la cepa CV879 en medio LB xilosa.
- Utilizar herramientas de predicción (péptido señal) que permitan la correcta secreción en *B. subtilis* 168 de GFP.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- ◉ Aligent Technologies. Material Safety Data Sheet. Recuperado el 10 de enero de 2013. http://www.genomics.agilent.com/files/MSDS/200228_NAEnglish.pdf
- ◉ Ash, C., J.A.E. Farrow, S. Wallbanks, M.D. Collins. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 13:202-206.
- ◉ Bailey, J.E. (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252: 1668-1672.
- ◉ Bauer, K., Bassat, A.B., Dawson, M., Puente, V.T.D.L., Neway, J.O. (1990). Improved expression of human interleukin-2 in highcell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1296-1302.
- ◉ Beller, M., Böhland, T., Demtröder, D. (2010). Positionspapier: Rohstoffbasis im Wandel. DECHEMA. Frankfurt. <http://www.dechema.de/>
- ◉ Biedendieck, R., Yang, Y., Deckwer, W.D., Malten, M., Jahn, D. (2007) Plasmid system for the intracellular production and purification of affinity-tagged proteins in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol. Bioeng* 96: 525-537.
- ◉ Brooks Robey, R., Haruhiko Osawa, Richard, L., Printz, Granner, D.K. (1996). Preparation of Electro-Competent *E. coli* Using Salt-Free Growth Medium *BioTechn* 20:42-44 January 1996.
- ◉ Brückner, R., Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* 209: 141-148.
- ◉ Cabrera-Valladares, N., Martínez J. A., Bolívar Z. F., Gosset L. G (2009) Evolución adaptativa de la cepa PTSGHI- de *Bacillus subtilis* 168 y la caracterización fisiológica de la cepa evolucionada CV846 en mezclas de glucosa-xilosa-arabinosa. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guerrero, México.
- ◉ Chalfie, M. (1995) Green fluorescent Protein. *Photochem. Photobiol.* Vol. 62(4):651-656.

- Chalfie, M, Kain, S.R. (2006) Properties, Applications, and Protocols, Second edition. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33-38.
- Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate E., Stemmer, W.P.C (1996) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* 14:315-319.
- Cutler, M.W., Ward, W.W. (1997) Spectral analysis and proposed model for GFP dimerization in Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular reporting with photons. Hastings, J.W., Kricka, L.J., Stanley, P.E. eds. Wiley Liss: 596-599.
- Dahl, M.K., Degenkolb, J., Hillen, W. (1994) Transcription of the xyl operon is controlled in *Bacillus subtilis* by tandem overlapping operators spaced by four base pair. *J. Mol. Biol.* 243 (3): 413-424.
- Dauner, M., Storni, T., Saue, U. (2001) *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *J. Bacteriol* 183(24): 7308-7317.
- De Anda, R., Lara, A.R., Hernández, V., Hernández-Montalvo, V., Gosset, G., Bolívar, F., Ramírez, O.T. (2006) Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab. Engin.* 8: 281-290.
- Deutscher, J., C. Francke, and P. W. Postma. (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:939–1031.
- Drago-Serrano, M.E., Sainz-Espuñes, T.R. (2006). Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 37, 1: 38-44.
- Durrschmid, K., H. Reischer, W. Schmidt-Heck, T. Hrebicek, R. Guthke, A. Rizzi, and K. Bayer. 2008. Monitoring of transcriptome and proteome profiles to

- investigate the cellular response of *E. coli* towards recombinant protein expression under defined chemostat conditions. *J. Biotechnol.* 135:34–44.
- ⊙ Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2:953-971.
 - ⊙ Farmer, W.R., Liao, J.C. (1997). Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3205-3210.
 - ⊙ Ferrari, E., Jarnagin, A.S., Schmidt, B.F. (1993) Commercial production of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. Ed. AL Sonenshein Pub. USA.
 - ⊙ Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Cochero JL., Vázquez, E., Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb. Cell Fact.* 8:17.
 - ⊙ FDA, (1982). Human insulin receives FDA approval. *FDA Drug Bull*, 12:18-19.
 - ⊙ Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolívar, F., Valle, F. (1996) Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* 14: 620-623
 - ⊙ Forero, A., Sánchez, S. (2008) Represión catabólica por carbono de bacterias Gram-positivas: Inteligencia alimenticia. *BioTecnología*. Vol.12 No.2: 24-48.
 - ⊙ Fujita, Y. (2009). Carbon Catabolite Control of the Metabolic Network in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73 (2).
 - ⊙ Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodríguez-Carmona E, Baumann K, Giuliani M, Parrilli E, Branduardi P, Lang C, Porro D, Ferrer P, Tutino ML, Mattanovich, D., Villaverde, A. (2008) Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb Cell Fact* 2008, 7:11.
 - ⊙ Gerngross T.U. (2004) Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol*, 22:1409-1414.
 - ⊙ Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R., Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Genet.* 87:4645-4649.

- ◉ Hautefort, I., Hinton, J.C.D. (2000) Measurement of bacterial gene expression in vivo. *Philos Trans R. Soc Lond, B.* 355:601-611.
- ◉ Heim, R., Prasher, D.C., Tsien, R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl Acad Sci USA* 91: 12501-12504.
- ◉ Hollmann, R., Deckwer W.D. (2004). Pyruvate formation and suppression in recombinant *Bacillus megaterium* cultivation. *J. Biotechnol* 111(1):89-96
- ◉ Kabisch, J., Pratzka, I., Meyer, H., Albrecht, D., Lalk, M., Ehrenreich, A., Schweder, T. (2013) Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for growth on overflow metabolites. *Microb Cell Fact* 12:72.
- ◉ Komberg, H.L., Krebs, H.A. (1957) Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature*, 179 (4568):988-991.
- ◉ Kundig, W., Ghosh, S., Roseman, S. (1964). Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52:1067-1074.
- ◉ Kunst, F., Ogasawara, N., Moszar, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G. et al. (1997) The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390: 249-256.
- ◉ Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Natura* 227: 680-685.
- ◉ Malten, M., Hollmann, R., Deckwe, W.D., Jahn, D. (2005) Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase DsrS in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol. Bioeng.* 89:206-218.
- ◉ Malten, M., Biedendieck, R., Gamer, M., Drews, A.C., Stammen, S., Buchholz L., Dijkhuizen, L., Jahn D. (2006) A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one-step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1677-1679.
- ◉ Manning MC, Patel K, Borchardt RT. (1989). Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm Res*, 6:903-918.
- ◉ Marinus, M.G., Morris, NR. (1973). Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 114: 1143-1150.

- ◉ Miksch, G., Bettenworth, F., Friehs, K., Flaschel, E., Saalbach, A., Nattkemper, T.W. (2006). A rapid reporter system using GFP as a reporter protein for identification and screening of synthetic stationary-phase promoters in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 229-236.
- ◉ Nothhaft, H., Dresel, D., Willimek, A., Mahr, K., Niederweis, M., Titgemeyer, F. (2003). The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for N-acetylglucosamine metabolism. *J. Bacteriol.* 185: 7019-7023.
- ◉ Nwoguh, C.E., Harwood, C.R., Barer, M.R. (1995). Detection of induced β -galactosidase activity in individual non-culturable cells of pathogenic bacteria by quantitative cytological assay. *Mol Microbiol* 17:545-554.
- ◉ Pariente, T.O. (2007) Construcción y caracterización de una cepa derivada de *Bacillus subtilis* que pueda utilizar xilosa como única fuente de carbono. Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM.
- ◉ Perozzo, M.A., Ward, K.B., Thompson, R.B., Ward, W.W. (1988) X-ray diffraction and timeresolved fluorescence analyses of *Aequorea* green fluorescent protein crystals. *J. Biol. Chem* 263(16):7713-7716.
- ◉ Postma, P.W., Lengeler, W. (1985). Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase System of Bacteria. *Microbiological Reviews*, Sept. p.232-269.
- ◉ Prasher, D.C., Eckenrode V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J. (1992). Primary structure of *Aequoria victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 11: 229-233.
- ◉ Rader, R.A. Biopharma. Biopharmaceutical Products in the U.S. and European Markets. http://www.biopharma.com/approvals_2010.html
- ◉ Riese, J. & Bahmann, R. (2004). *Industrial Biotechnology: Turning the Potential into Profits*. McKinsey & Company. <http://www.mckinsey.com>
- ◉ Rizzo, M.A., Davidson, M.W., Piston, D.W. (2009) *Fluorescent Protein Tracking and Detection: Fluorescent Protein Structure and Color Variants*. Col Spring Harbor Laboratory Press Vol. 4 Issue 12.
<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2009/12/pdb.top63.full.pdf+html>

- ◉ Rygus, T., Hillen, W. (1991). Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35:594-599.
- ◉ Saier, M.H., Reizer, J. (1992) Proposed uniform nomenclature of the proteins and proteins domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system based on structural, evolutionary and functional considerations. *J. Bacteriol.* 174: 1433-1438.
- ◉ Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- ◉ Shapiro, J.A. (2000) en *Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains, Seventh Edition, Volume 1: Bacillus subtilis* 168.
<http://www.bgsc.org/catalogs/Catpart1.pdf>
- ◉ Singh, K.D., Schmalisch, M.H., Stülke, J. Görke, B. (2008). Carbon Catabolite Repression in *Bacillus subtilis*: Quantitative Analysis of Repression Exerted by Different Carbon Sources. *Journal of Bacteriology*, Nov.2008, p 7275-7284.
- ◉ Slepecky, R.A., Hemphill, H.E. (1992). *The Genus Bacillus- Nonmedical en Prokaryotes* 2nd Ed. Dworkin M., Schleifer KH, Stackebrandt Editors. Springer Verlag. USA.
- ◉ Sonenshein, A. (1993). *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. Eds. Sonenshein, A. L., Hoch, J.A., Losick, R. ASM Press, USA.
- ◉ Speck, E.L., Freese, E. (1973) Control of metabolite secretion in *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol*, 78(2):261-275.
- ◉ Stammen, S. (2010). Genetic tools for high yield protein production with *Bacillus megaterium*. Dissertation Von der Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität CaroloWilhelmina zu Braunschweig.
- ◉ Stammen, S., Müller, B.K., Korneli, C., Biedendieck, R., Gamer, M., Franco-Lara, E. Jahn, D. (2010). High Yield Intra- and Extracellular Protein Production Using *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* June, pp 4037-4046.

- Stülke, J., Hillen, W. (1998) Coupling physiology and gene regulation in bacteria: the phosphotransferase sugar uptake system delivers the signals. *Naturwissenschaften* 85: 583-592.
- Stülke, J., Hillen, W. (2000) Regulation of Carbon Catabolism in *Bacillus* Species. *Ann. Rev. Microbiol.* 54:849-880.
- Steinmetz, M. (1993) Carbohydrate catabolism: pathways, enzymes, genetic regulation and evolution. En *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria. Eds Sonenshein, A. L., Hoch J.A., Losick, R. American Society for Microbiology 11:157-163.
- Stephanopoulos, G., Vallino, J.J. (1991) Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science* 252: 1675-1681
- Stephanopoulos, G., Aristidou, A.A., Nielsen, J. (1998) *Metabolic engineering: Principles and Methodologies*. Academic Press, USA.
- Stülke, J., Hillen, W. (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opinion Microbiol.* 2: 195-201.
- Team:Newcastle University (2008) About *B. subtilis* iGEM. Tomado de la red http://2008.igem.org/Team:Newcastle_University/Bacillus_subtilis.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D., Bron, S., van Dijl, J.M. (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:515-547.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J.D. (2004). Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:207-233.
- Tréboul, G.G., de Waard, J.H., Zagorec, M., Postma, P.W. (1991). The glucose permease of the phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: evidence for II^{Glc} and III^{Glc} domains. *Molecular Microbiology* 5(5), 1241-1249.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev Biochem* 67: 509-544.
- Vary, P.S. (1994). Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiol* 140:1001-1013.

- ◉ Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Heinz Maurer, K., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., Gottschalk, G. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13 an organism with great industrial potential. *J Mol Microbiol Biotechnol* 7:204-211.
- ◉ Wong, S.L. (1995). *Current Opinion in Biotechnology*, 6:517-522.
- ◉ Yamane, K., Bunai, K., Kakeshita, H. (2004) Protein traffic for secretion and related machinery of *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:2007-2023.
- ◉ Yang, F., Moss, L.G., Phillips, G.N Jr. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotech.* Vol. 14 Oct: 1246-1251.
- ◉ Yuan, H., Yang, X, Zi-Chuan, H. (2004) Optimization of expression of an Annexin V-Hirudin chimeric protein in *Escherichia coli*. *Microbiol. Res.* 159:147-156.

XII. ANEXOS

XII.1 Clasificación WHO. Indicaciones terapéuticas

^a WHO indications are as follows

- A Infectious diseases (Protection or treatment)
- C Neoplasms (Imaging or treatment)
- D Diseases of the blood and disorders involving the immune mechanism.
- E Endocrine, nutritional and metabolic diseases
- G Diseases of the nervous system
- H Diseases of the eye and the ear
- I Diseases of the circulatory system
- J Diseases of the respiratory system
- K Diseases of the digestive system
- L Diseases of the skin and subcutaneous tissue
- M Diseases of the musculoskeletal system and connective tissue
- N Diseases of the genitourinary system
- Q Congenital malformations and chromosomal abnormalities
- R Symptoms and signs not elsewhere classified: Pain, cachexia.
- T Injuries and surgical complications: Organ rejection.
- Y External causes of morbidity and mortality
- Z Factors influencing health status and contact with health services

La lista completa se encuentra disponible en:

<http://www.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>

XII.2 Protocolos

XII.2.1 Preparación de *E. coli* electro-competentes utilizando un medio de crecimiento libre de sales. (BioTechniques 1996)

A. Preparación de células electro-competentes

1. Crecer un cultivo ON en medio YENB (Bacto yeast extract (0.75%), Bacto Nutrient Broth (0.8%); Difco Laboratories)
2. Inocular 1L del medio YENB con 5-10mL del cultivo ON, y crecer a 37°C en agitación. Las células pueden ser cosechadas entre 0.5-0.9 OD_{600nm} (si las células han crecido más de esta concentración se diluyen a 0.2 OD_{600nm} y se crecen hasta la OD deseada)
3. Para cosechar, se coloca el matraz en hielo por 5 min. y se centrifugan a 4000x g, durante 10 min. a 4°C. Es importante no centrifugar a un valor g mayor del cual se necesita para tener el pellet a las células, ya que reduce la viabilidad del cultivo, lo cual se traduce en una menor eficiencia de transformación)
4. Remover y descartar el medio. Lavar el pellet dos veces en 100mL de agua fría, centrifugar como en el paso 3, remover y descartar el sobrenadante.
5. Resuspender en 20mL de glicerol 10% frío, Centrifugar como en el paso 3, remover y descartar el sobrenadante.
6. Resuspender las células (provenientes del Litro de cultivo) en un volumen final de 2-3mL de glicerol 10% frío. El número de células en suspensión debe ser de 2-4 10¹⁰ cel/mL. Estas células competentes se pueden utilizar frescas o congeladas (ver abajo).
7. Para congelar las células competentes, tomar alícuotas en tubos eppendorf (40µL/tubo) y colocar en hielo seco hasta que se congelen. Almacenar a -70°C. Estas células pueden servir en un periodo de 1-2 años.

B. Electrotransformación

El siguiente protocolo se utiliza para células electro-competentes que siguieron el procedimiento anterior.

1. A una alícuota de 40 μ L de células competentes se le añaden de 1-5 μ L de DNA en amortiguador de baja fuerza iónica; p.ej., TE (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA). Mezclar y colocar en hielo por aproximadamente 1 min.
2. Transferir la mezcla (células y DNA) a una cubeta de electroporación 0-2cm fría (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y electroporar de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este produce un pulso de 2500 volts constante entre 4-5ms.
3. Remover la cubeta de la cámara e inmediatamente añadir 1mL de LB a la cubeta (Se puede utilizar medio SOC(2% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 10mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20mM glucose)). Resuspender las células y transferir las células en suspensión en un tubo de polipropileno (17x100mm) e incubar con o sin agitación a 37°C durante 1-3 hrs.
4. Plaquear las células en un medio de selección e incubar ON a 37°C

XII.2.2 Método de transformación para *Bacillus*

Procedimiento de células competentes en *Bacillus*:

1. Crecer un cultivo de *Bacillus* O/N en medio LB
2. Inocular el medio de transformación de *Bacillus* I con el cultivo O/N

Medio de transformación de <i>Bacillus</i> I	
Sales <i>Bacillus</i> 1X	2.5mL
Glucosa	0.5%
MsSO ₄	5mM
Casaminoácidos	0.02%
Triptófano	50 μ g mL ⁻¹

Combinar en un tubo estéril de 18 x 150 con tapa.

Sales *Bacillus* 10X (1L)

K ₂ HPO ₄	140g
KH ₂ PO ₄	60g
(NH ₄) ₂ SO ₄	20g
Na ₂ H (C ₃ H ₅ O (COO) ₃	10g

3. Incubar a 37°C, 300 rpm por 4-5 horas hasta alcanzar la turbidez.
4. Realizar una segunda dilución (1:10) en el medio de transformación de *Bacillus* II

Medio de transformación de *Bacillus* II

Sales <i>Bacillus</i> 1X	2.5mL
Glucosa	0.5%
MsSO ₄	5mM
Casaminoacidos	0.01%
Triptófano	5µg mL ⁻¹

5. Después de la dilución se añade 0.5mL del cultivo diluido en dos tubos separados, uno con 1-2µg del DNA transformante y el otro tubo sin DNA como control.
6. Incubar los tubos a 37°C, 300 rpm por 5 horas
7. Preparar las placas de selección y difundir el cultivo para aislar transformantes.

XII.2.3 Test caseinasa modificado

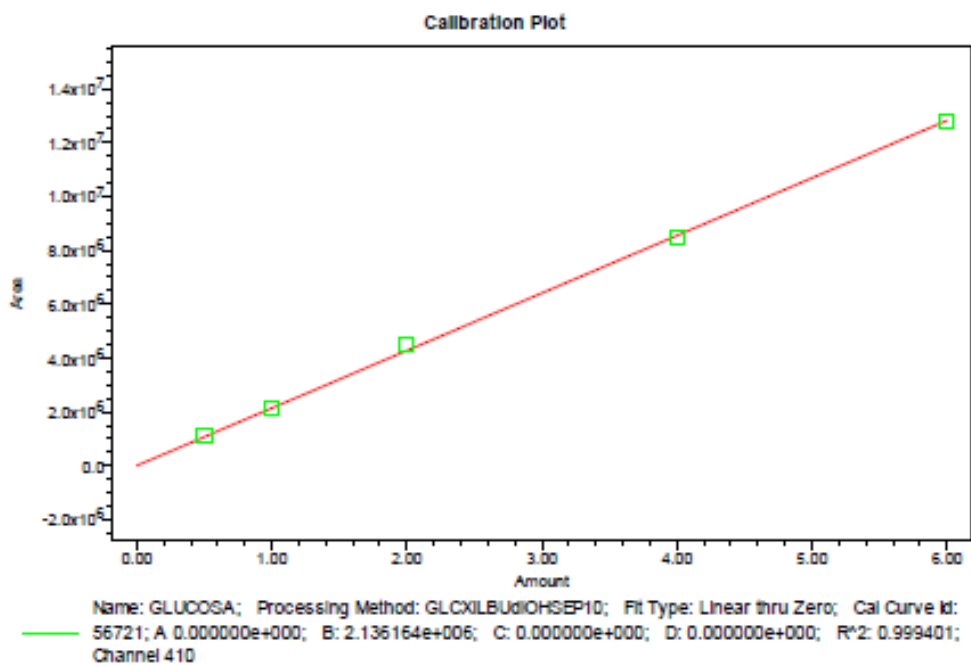
1. Una vez realizado el medio Skim Milk como se menciona en los métodos (protocolo del Laboratorio Bolívar-Gosset) se vacían 15 mL de medio en cajas Petri y se deja solidificar.

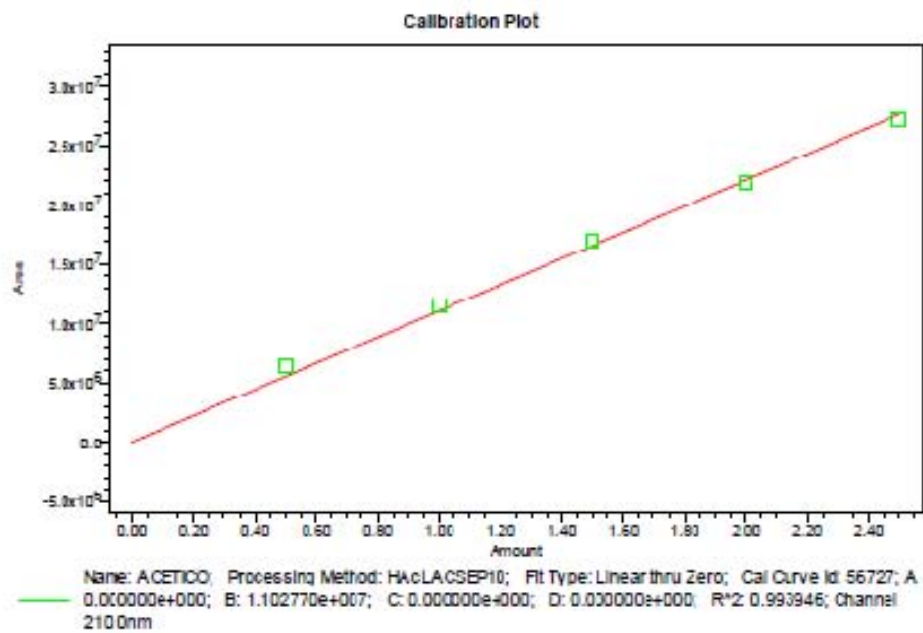
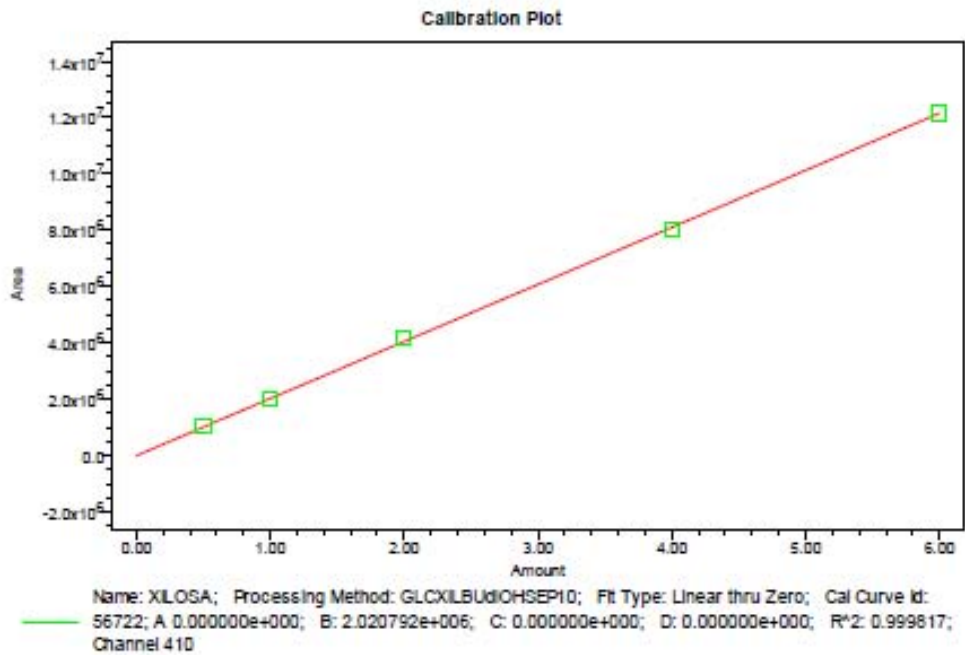
2. Inocular las placas con la dilución proveniente del medio líquido LB
3. Incubar las placas invertidas a 30°C
4. Revisar las placas cuando las colonias sean visibles (aproximadamente 48 hrs) y medir las zonas clareadas por el cultivo en 3 puntos

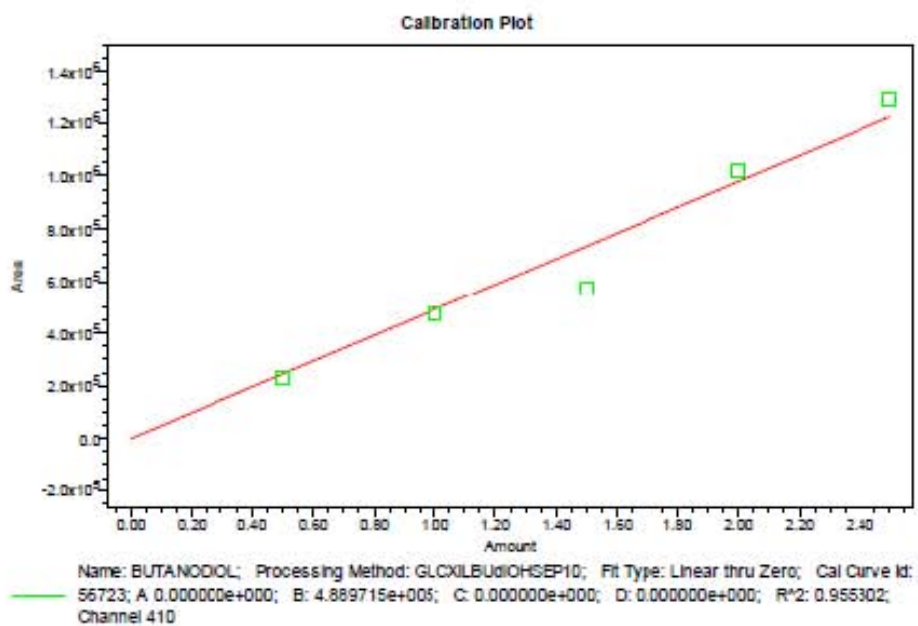
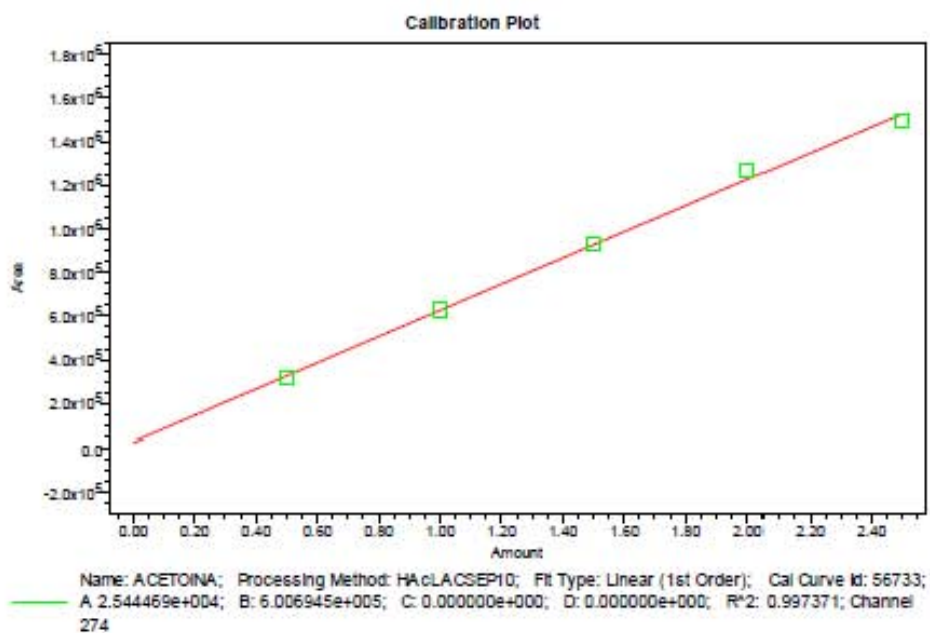
El protocolo original puede ser encontrado en <http://www.microeco.unizh.ch>
Laboratory to Biology III “Diversity of Microorganisms”, Microbial Ecology Group,
University of Zürich.

XII.3 Curvas patrón para la cuantificación de azúcares y ácidos en HPLC

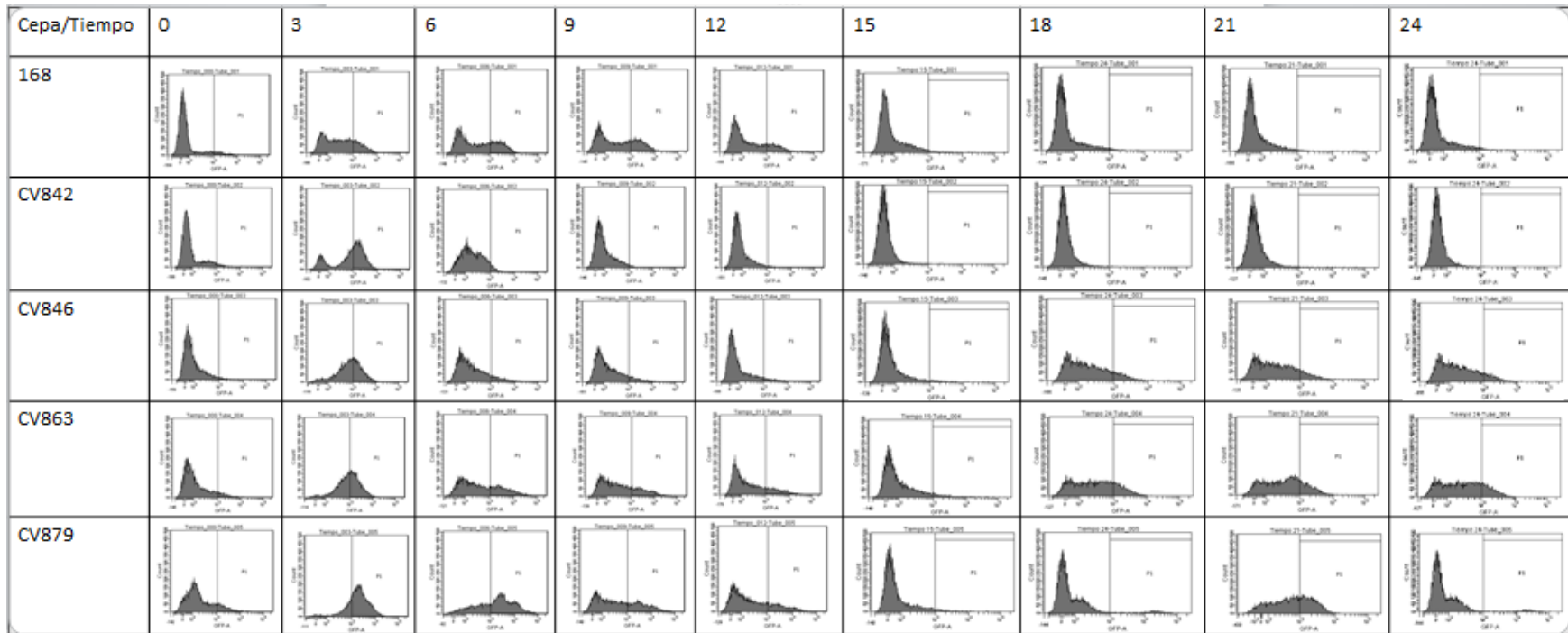
Las curvas presentadas se realizaron a 5 puntos con las concentraciones 0.5, .0. 1.5, 2.0 y 2.5 g/L para cuantificar el sustrato adicionado en el medio como glucosa y xilosa así mismo productos del metabolismo tales como ácido acético, acetofina y butanodiol obtenidos en HPLC con ayuda de la M. en C. Georgina Hernández Chávez.



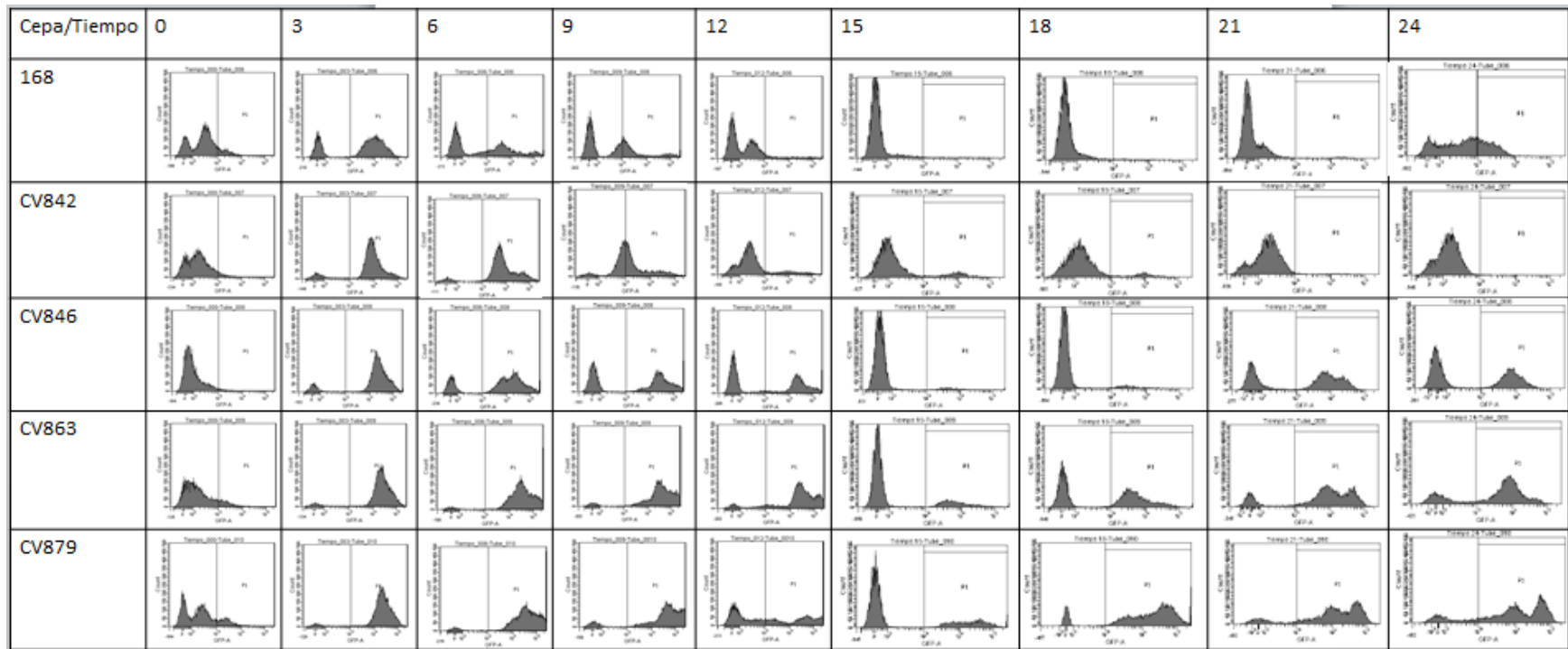




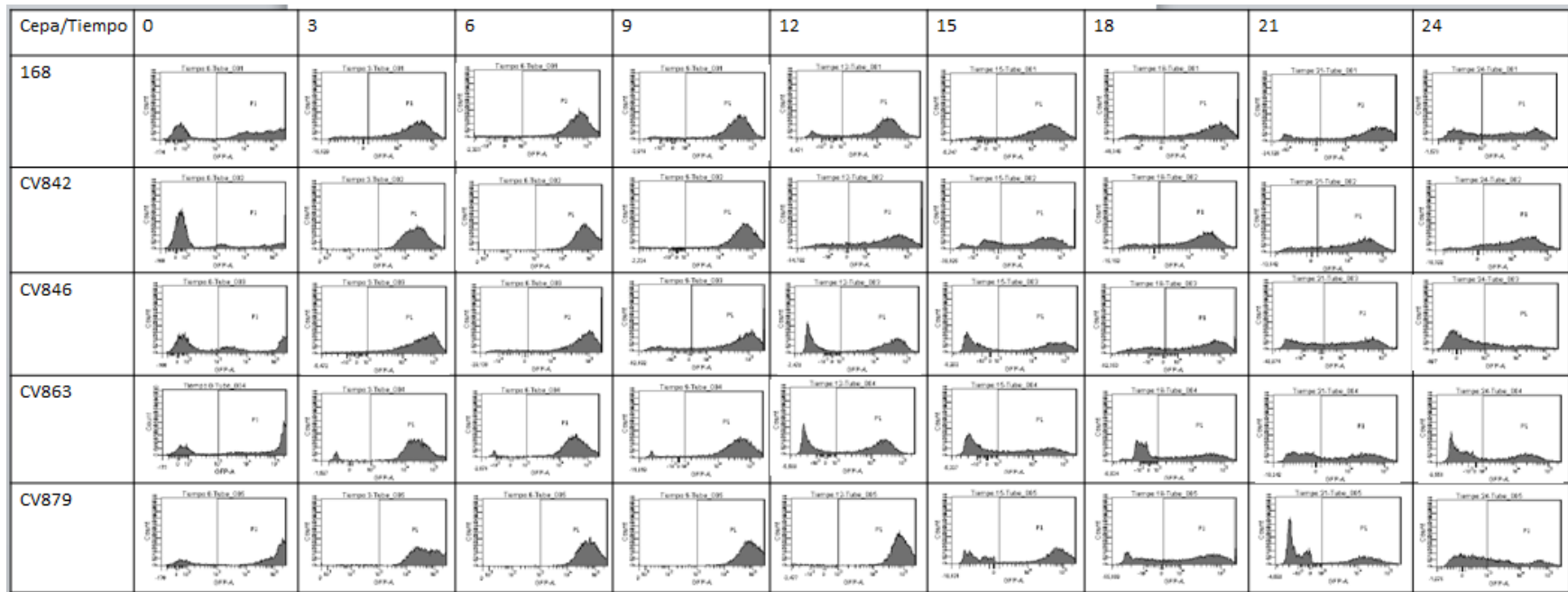
XII.4 Perfiles de fluorescencia en citómetro de flujo



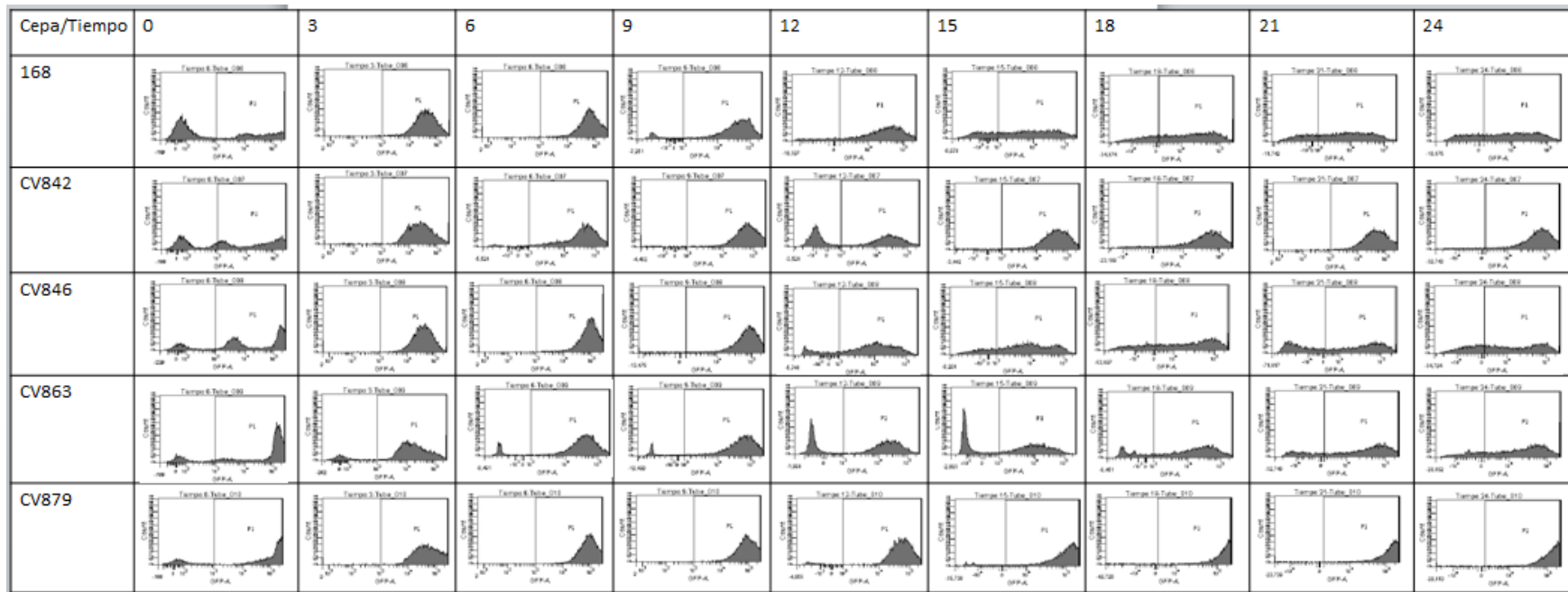
Perfil de fluorescencia de la proteína GFP expresada en las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, CV846, CV863, CV879 transformadas con pSSm85 durante los tiempos 0,3,6,9,12,15,18,21 y 24 en medio LB-Glucosa (8g/L). La población (P1) que se encuentra expresando la proteína GFP, se encuentra del lado derecho de la línea vertical marcada (10^3 UF-GFP).



Perfil de fluorescencia de la proteína GFP expresada en las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, CV846, CV863, CV879 transformadas con pSSBm85 durante los tiempos 0,3,6,9,12,15,18,21 y 24 en medio LB-Xilosa (8g/L). La población (P1) que se encuentra expresando la proteína GFP, se encuentra del lado derecho de la línea vertical marcada (10^3 UF-GFP).

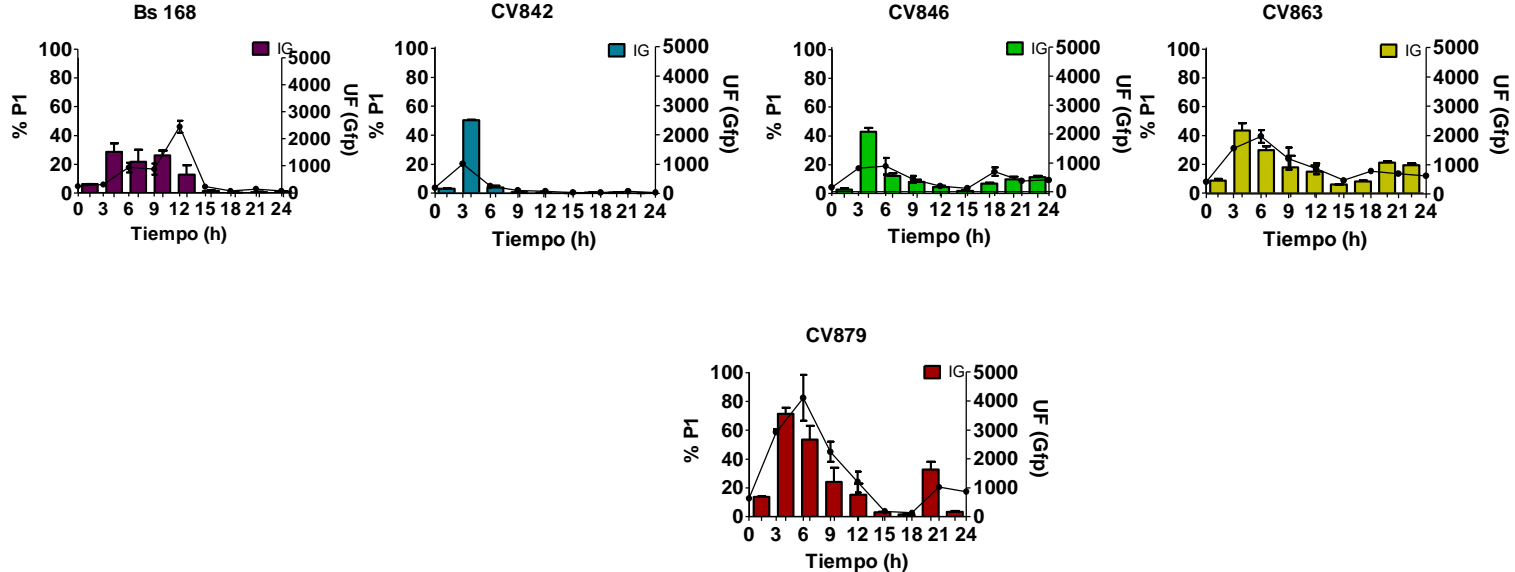


Perfil de fluorescencia de la proteína GFP expresada en las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, CV846, CV863, CV879 transformadas con pSSBm85/XylR⁻ durante los tiempos 0,3,6,9,12,15,18,21 y 24 en medio LB-Glucosa (8g/L). La población (P1) que se encuentra expresando la proteína GFP, se encuentra del lado derecho de la línea vertical marcada (10^3 UF-GFP).



Perfil de fluorescencia de la proteína GFP expresada en las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, CV846, CV863, CV879 transformadas con pSSBm85/XylR⁻ durante los tiempos 0,3,6,9,12,15,18,21 y 24 en medio LB-Xilosa (8g/L). La población (P1) que se encuentra expresando la proteína GFP, se encuentra del lado derecho de la línea vertical marcada (10^3 UF-GFP).

XII.4.1 Perfil de fluorescencia y porcentaje de la población GFP-activa



XII.5 Tablas de fluorescencia de GFP en cepas de *B. subtilis* y evolucionadas

Tabla XII.5 a Cinética de fluorescencia de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85 en medio LB-glucosa. *Medidas obtenidas por citómetro de flujo.

Tiempo	Bs168 (UF)	CV842 (UF)	CV846 (UF)	CV863 (UF)	CV879 (UF)
0	233.5 ±19.09	168.5 ±72.83	152 ±22.62	414.5 ±92.63	631.5 ±54.44
3	292 ±4.24	1004.5 ±45.96	809.5 ±23.3	1552.5 ±105.35	2915.5 ±137.88
6	932 ±253.14	251 ±90.51	884.5 ±415.07	1962.5 ±313.24	4106 ±1127.12
9	875 ±189.91	99 ±46.67	430 ±168.29	1203 ±527.50	2241.5 ±492.85
12	2443.75±312.89	75.5 ±40.30	197.5 ±112.42	862.5 ±263.75	1197 ±513.35
15	216.5 ±9.19	26 ±5.65	121.5 ±9.19	464 ±73.53	175 ±11.31
18	58.5 ±7.77	34 ±12.72	693 ±212.13	785.5 ±70.01	129.5 ±4.94
21	131 ±19.79	78.5 ±9.19	378.5 ±84.14	690 ±73.53	1018.5 ±115.25
24	66 ±14.14	26.5 ±12.02	409 ±38.18	614 ±31.11	864.5 ±89.80

Tabla XII.5 b Cinética de fluorescencia de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85 en medio LB-xilosa.

*Medidas obtenidas por citómetro de flujo.

Tiempo	Bs168	CV842	CV846	CV863	CV879
0	537.5±28.99	386.5±105.35	243.5±77.07	601±71.12	888±42.43
3	11242±322.44	13262±4.24	33798±2744.98	27223±6991.87	33744.5±4463.96
6	11483±1783.32	13788±6675.08	16963±12249.91	46026.5±18258.20	53128.5±20259.31
9	8742±615.18	8206.5±924.18	23861.5±10099.60	63593±13891.81	80691.5±10241.02
12	3153±449.71	4151.5±642.76	20266.5±4883.98	54858.5±15930.40	42602.5±3616.85
15	414±50.91	2029±73.53	1431±135.76	3651±243.75	14400±4174.75
18	289±5.65	1261±164.04	464.5±24.74	6884.5±422.14	41195.5±1699.17
21	361.5±109.60	393±22.62	7069±954.59	17920±670.33	26881±854.18
24	1009.5±20.51	274±74.95	3997.5±57.27	9056±193.74	21497±4259.61

Tabla XII. 5 c Cinética de fluorescencia de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85-XylR- en medio LB-glucosa. *Medidas obtenidas por citómetro de flujo.

Tiempo/Cepa	Bs168 (UF)	CV842 (UF)	CV846 (UF)	CV863 (UF)	CV879 (UF)
0	50922.5 ±8558.52	26227 ±5177.43	66501 ±1514.61	140157.5 ±647.01	151059.5 ±18057.38
3	40892 ±7082.38	30410 ±8613.97	57594 ±5897.27	49534 ±9995.66	89447.5 ±5793.32
6	71711.5 ±10823.68	85130 ±9792.01	83856.5 ±6821.45	62743.5 ±11286.13	84503.5 ±3820.49
9	41392.5 ±713.47	68939.5 ±6325.07	79586 ±10927.62	60402 ±1052.17	120642 ±13204.51
12	27113.5 ±2191.32	61055.5 ±9067.23	21571.5 ±4075.05	15339 ±2347.59	106977.5 ±11017.43
15	44011.5 ±853.47	35385.5 ±651.24	50938 ±11476.34	15012.5 ±2506.69	63695.5 ±5868.27
18	56850 ±1841.30	26492 ±3244.20	45119.5 ±4588.41	28046.5 ±4923.58	22873 ±13237.03
21	70093.5 ±1151.87	28965 ±3495.93	27029 ±10439.72	22155 ±1039.44	9293.5 ±1303.19
24	21176.5 ±3206.72	29948 ±391.73	7894.5 ±1687.86	11412 ±1060.66	10288 ±4071.52

Tabla XII. 5 d Cinética de fluorescencia de las cepas de *B. subtilis* 168, CV842, 46, 63 y 79 transformadas con pSSBm85-XylR- en medio LB-xilosa. *Medidas obtenidas por citómetro de flujo.

Tiempo/Cepa	Bs168	CV842	CV846	CV863	CV879
0	38664.5 ±5179.55	62104.5 ±11023.08	95010.5 ±5149.85	123355.5 ±4328.20	156395 ±26744.19
3	61445 ±13109.75	30596.5 ±919.94	50801.5 ±3650.79	37836.5 ±4291.43	86600 ±9077.83
6	103751.5 ±17337.55	64510 ±6471.44	89956 ±6608.61	53484.5 ±5569.88	135234.5 ±24905.01
9	62725 ±5733.22	100380.5 ±11419.06	103140 ±18362.14	67051.5 ±5831.50	125229 ±3207.43
12	61846 ±11501.79	32855.5 ±2454.36	22991.5 ±4998.53	22167 ±5965.15	78138 ±9159.86
15	48293.5 ±11095.21	65422 ±6284.76	19270.5 ±2697.61	12042.5 ±1866.05	150492.5 ±11625.54
18	34499.5 ±1956.56	64089 ±9550.18	43705.5 ±207.18	35177 ±3020.76	196432.5 ±21185.62
21	22750 ±2364.56	71566 ±11344.82	22154 ±10613.67	60844 ±2183.54	173399 ±31594.94
24	22901 ±156.97	87664.5 ±9152.08	29150.5 ±815.29	42597 ±782.06	185834.5 ±1559.17