

CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE INTEGRACIÓN, EXPRESIÓN Y SECRECIÓN PARA *Bacillus subtilis*: EVALUACIÓN EN *Escherichia coli*

Alfonso Gómez^{1,2}, Susana Romero², Rodolfo Quintero¹, Eugenio López², Enrique Merino² y Alfredo Martínez²

¹Instituto Mexicano del Petróleo, ²Instituto de Biotecnología-UNAM, Av Universidad 2001, Chamilpa, Cuernavaca, Mor, 62210, México. Fax: (777) 3 17 23 88, e-mail: alfonso@ibt.unam.mx, eagomez@imp.mx

Palabras claves: β -glucosidasa, secreción, *Bacillus subtilis*

Introducción. El 35% de los costos de producción de etanol carburante a partir de residuos lignocelulósicos se debe a la obtención de celulasas fúngicas, cuyos genes están regulados por represión catabólica. La producción de celulasas extracelulares en bacterias y bajo un promotor sin represión catabólica permitirá reducir estos costos cerca de un 30%. *B. subtilis* es una bacteria que secreta mayoritariamente la proteasa subtilisina (AprE) durante la fase estacionaria. El gen *aprE* tiene un promotor fuerte (*Pm*) y una región que codifica para un péptido señal (*Ps*) que pueden ser utilizados para la expresión y secreción de proteínas heterólogas.

El objetivo de este trabajo fue la construcción y evaluación en *E. coli* de vectores integrativos para *B. subtilis* con las secuencias del *Pm* y del *Ps* de *aprE* seguidas por el gen de una celulasa: la β -glucosidasa (*bglC*) de *Thermobifida fusca* (1).

Metodología. La figura 1 muestra la estrategia de la construcción de los plásmidos. (*Pm*)*aprE*, (*Ps*)*aprE* y *bglC* son productos de PCR cuyos templados son pSG-TTGACA (2), ADN cromosomal de *B. subtilis* y pNS6 (1), respectivamente. Por PCR y con enzimas de restricción seleccionadas, se construyó el vector pSG-(*PmPs*)*aprE*-*bglC* que contiene la secuencia *Pm*-*Ps*-*bglC*. Con una estrategia similar se construyó pSG-(*Pm*)*aprE*-*bglC* el cual no contiene la secuencia *Ps*. Para las construcciones se utilizó *E. coli* XL1-blue. La actividad β -glucosidasa se midió de acuerdo al método descrito por Spiridonov y Wilson (1)

Resultados y discusión. La actividad β -glucosidasa en *E. coli* transformada con los plásmidos del presente trabajo se presenta en la tabla 1, demostrando que estos vectores le confieren a las células la actividad de interés. Las células con *Pm*-*bglC* tienen una mayor actividad que las que además tienen *Ps*, lo cual posiblemente se debe a que *E. coli* no tiene las peptidasas para cortar eficientemente el péptido señal. Es importante señalar que a futuro se evaluará la integración en *B. subtilis*.

Conclusiones. Se diseñaron y construyeron dos plásmidos versátiles que permiten intercambiar cualquiera de los componentes *Pm*, *Ps* o el gen a expresar.

El plásmido pSG-(*PmPs*)*aprE*-*bglC* tiene los componentes requeridos para que el gen de la celulasa se exprese en *B. subtilis* y sea secretada.

La actividad β -glucosidasa de XL1-blue transformada es 5 veces menor que la obtenida con BL21(DE3)-pNS6 debido a que pNS6 es un plásmido de alto número de copias con un promotor fuerte específico de *E. coli*.

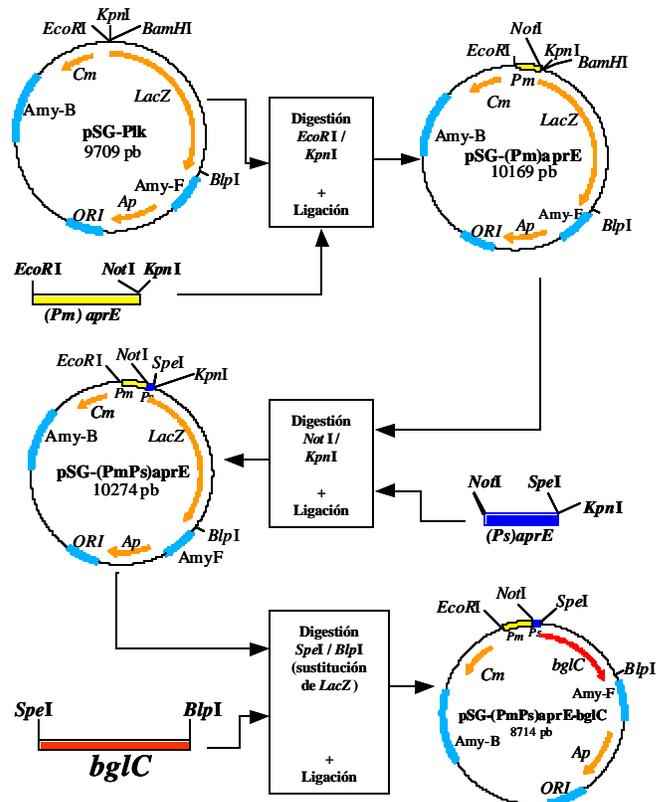


Fig. 1. Estrategia de construcción del vector pSG-(*PmPs*)*aprE*-*bglC*.

Tabla 1. Actividad β -glucosidasa en *E. coli*

Cepa de <i>E. coli</i>	UI/mg biomasa
XL1-blue silvestre	0
XL1-blue-pSG-(<i>Pm</i>) <i>aprE</i> - <i>bglC</i>	7.5
XL1-blue-pSG-(<i>PmPs</i>) <i>aprE</i> - <i>bglC</i>	2.3
BL21(DE3)-pNS6	39

Agradecimiento. a M. C. Ramón De Anda, a la Dra. Teresa. Ponce, a Mercedes Enzaldo y a los proyectos: CONACYT-Z003 y Etanol-IMP- D.31510.02.004

Bibliografía

- Spiridonov, N, Wilson, D (2001). Cloning and Biochemical Characterization of BglC, a β -glucosidase from the Cellulolytic Actinomycete *Thermobifida fusca*. *Current Microbiol.* 42: 295-301.
- Jan, J, Valle, F, Bolivar, F, Merino, E (2001). Construction of Protein Overproducer Strains in *Bacillus subtilis* by an Integrative Approach. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 69-75.