



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



EFECTO DE LA INACTIVACIÓN DEL SISTEMA FOSFOTRANSFERASA SOBRE LA CAPACIDAD DE SÍNTESIS DE PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE EN CEPAS EVOLUCIONADAS DE *B. SUBTILIS*.

Karen Carrasco, Natividad Cabrera, Luz María Mejía, Ramón de Anda, Alfredo Martínez, Francisco Bolívar, Guillermo Gosset.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM

A.P. 510-3, Cuernavaca Morelos 62250, México

karencit@ibt.unam.mx

Palabras clave: evolución adaptativa, ingeniería sistemas transporte, Bacillus subtilis recombinante.

Introducción. *B. subtilis* es un atractivo organismo para la producción de proteínas debido a las siguientes razones: (a) es un organismo no patógeno y GRAS, (b) secreta proteínas de manera eficiente, (c) no produce endotoxinas, (e) existe gran información respecto a sus mecanismos de transcripción, traducción, manipulación genética y fermentaciones a gran escala.⁽¹⁾ Sin embargo la secreción de proteínas heterólogas en *B. subtilis* usualmente es baja y la producción de proteínas de alto valor para la industria farmacéutica requiere cultivos de alta densidad celular lo cual trae consigo el problema de producción y acumulación de acetato en el medio, que a una concentración aproximada de 1.5 gL⁻¹ inhibe el crecimiento celular.^(1,2)

Una estrategia que ha resultado exitosa para reducir la producción de acetato en cultivos de *Escherichia coli* es la ingeniería de vías metabólicas con la cual se ha logrado reducir el flujo de carbono, en este caso piruvato, hacia las vías de síntesis de acetato, mediante la eliminación del sistema de fosfotransferasa (PTS) el cual es responsable de internalizar algunos carbohidratos tales como glucosa en bacterias. A partir de cepas PTS⁻, se han seleccionado cepas que recuperaron la capacidad de internalizar glucosa por un mecanismo independiente de PTS (fenotipo PTS⁻ glc⁺).⁽²⁾

Por otra parte, para lograr una alta producción de proteína recombinante es necesario utilizar promotores fuertes, de preferencia que se activen naturalmente y no por inductores artificiales y costosos.⁽¹⁾ Un sistema de expresión génica utilizado en *B. Subtilis* está basado en el promotor inducible por xilosa P_{xylA} cuya actividad es regulada por la proteína represora XylR en el operón *xyl*, localizado en el plásmido pSSBm85.⁽³⁾

Metodología. Cepas: *B. subtilis*: 168, CV842, CV846, CV863, CV879 (PTS⁻, glc⁺), derivadas mediante evolución adaptativa) todas transformadas con el plásmido pSSBm85 que contienen un gene que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP).⁽³⁾

Producción de GFP en matraces. Las cepas anteriormente mencionadas utilizadas se crecieron en matraces bafleados a 37°C en medio Luria Bertani, suplementado con tetraciclina (5 mgL⁻¹), glucosa o xilosa, ambas a 5 gL⁻¹.

A partir de muestras se cuantificó biomasa, glucosa, xilosa, acetato (análisis por HPLC) y concentración de GFP, la cual fue determinada por fluorescencia vía espectrofotómetro (Stammen Et, al), FACS Canto (Citometría de flujo)

Resultados. La producción máxima de GFP en matraz fue de 176 mg L⁻¹ en la cepa evolucionada *B. subtilis* CV879 crecida en LB xilosa 5g L⁻¹ (40% más que una cepa de *Bacillus megaterium* transformada con el mismo plásmido),⁽³⁾ según datos obtenidos en el fluorímetro que nos proporciona un promedio del cultivo, Sin embargo, al realizar un análisis con un citómetro de flujo, nos dimos cuenta que el nivel de producción de GFP en la población de la cepa CV879 es muy heterogénea a través del tiempo. Esto indica que la inducción por xilosa de gen para GFP no es eficiente. Esto podría ser optimizado si se inactiva el gen *xylR* para lograr que la expresión se vuelva constitutiva. Adicionalmente, se observó que la eliminación de PTS en *B. subtilis* tuvo un efecto positivo ya que mediante HPLC se observaron niveles muy bajos (0-0.02g L⁻¹) de producción de acético y nulos para acetoína.

Conclusiones. Se observaron diferencias en cuanto a crecimiento y producción de proteína verde fluorescente entre las cepas evolucionadas de *B. subtilis* (PTS⁻ glc⁺). Los resultados obtenidos indican que la inactivación del sistema PTS, probada exitosamente en *E. coli*, generó cepas mejoradas de *B. subtilis*. Esto abre la posibilidad de generar y escalar procesos para la producción de proteínas de interés un cepas PTS⁻ glc⁺ de *B. subtilis*.

Agradecimiento. Mercedes Enzaldo, Georgina Hernández y Erika Melchy por el apoyo técnico, al Grupo Dr. Dieter Jahn por la donación pSSBm85.

Bibliografía.

- Schumann, W. (2007). Advances in Applied Microbiology. S. S. Allen I. Laskin and M. G. Geoffrey, Academic Press. Volume 62: 137-189.
- De Anda R, Lara AR, Hernández V, Hernández-Montalvo V, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. Metab Eng. 2006 May; 8(3):281-90.
- Stammen S, Müller BK, Korneli C, Biedendieck R, Gamer M, Franco-Lara E, Jahn D. Appl Environ Microbiol. 2010 Jun; 76(12):4037-46.