

03072



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

21

28

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

FALLA DE ORIGEN

*Clonación del gen de alfa-amilasa de Bacillus
licheniformis en Lactococcus lactis.*

*Un modelo para el estudio de la estabilidad y la
expresión de genes heterólogos*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

BIOL, ROMINA MA. DE LA PAZ RODRIGUEZ SANOJA.

MEXICO, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología del
Instituto de Investigaciones Biomédicas
de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la
Dra. Juliette Morlon Guyot.**

Agradezco a mi comité tutorial integrado por:

Dra. Juliette Morlon Guyot

Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Dr. Fernando Valle Baeza

por sus valiosos comentarios, aunque a veces estos hayan sido desalentadores.

Gracias al jurado formado por:

Dra. Juliette Morlon Guyot

Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Dr. Baltazar Becerra Luján

Dr. Edgardo Escamilla Marván

por sus aportaciones y el tiempo dedicado.

Gracias Juliette por compartir conmigo no solo tus conocimientos.

Gracias a Guillermo y a Blanca por su tiempo y por su espacio

Gracias al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por su hospitalidad.

Un agradecimiento especial al Dr. Jorge Calderón Jiménez, su amable disposición nos facilitó el camino.

Gracias a la Dra. Amelia Farrés por sus consejos.

Gracias a Lety García por su apoyo.

Gracias a Jorge Hernández por su ayuda.

Para Ranulfo, para mi compañero, para mi amigo.

Para mis padres, Verónica y Rafael, gracias por continuar apoyandome.

A Ileana, Alejandro, Daniel y Alberto con inmenso cariño.

A Norma y Rafael, por los buenos momentos.

RESUMEN

Las bacterias lácticas son microorganismos ampliamente usados en la industria de la fermentación. Su importancia no sólo reside en la preservación de alimentos, también se encuentran involucradas en el desarrollo de sabores y texturas. Su papel no se restringe a la industria, ya que son comensales de sistemas digestivos de mamíferos, entre ellos el hombre, y se empieza a investigar la posibilidad de utilizarlas como vehículos de vacunas orales.

A pesar de su importancia, los estudios sobre éstos microorganismos no se han diversificado mucho, especialmente en el área de la Biología Molecular, los avances han sido lentos, por lo que en este trabajo se planteó la posibilidad de introducir el gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* en *Lactococcus lactis*, para utilizarlo como modelo de un gen heterólogo y poder así estudiar estabilidad del plásmido y expresión de un gen no lactococal, que son fenómenos muy poco documentados. Además se deseaba trabajar con dicha amilasa para explorar la posibilidad de tener un marcador genético inócuo, en una bacteria GRAS (General recognized as safe).

Para cubrir este objetivo, se diseñaron tres construcciones con dos vectores lactococales, el pLZ12 y el pMG36_e, en una de las construcciones con el pMG36_e se utilizó un promotor y un terminador lactococal, en las otras dos construcciones se dejó el promotor propio del gen de alfa-amilasa. Estos plásmidos, que ya incluían el gen, fueron transformados en *L. lactis* cepas IL1403 y MG1363 por electroporación, después de que se hubieron establecido las condiciones adecuadas.

Los resultados muestran inestabilidad estructural en todas las construcciones realizadas, pero se observan diferentes fenómenos. En el caso de las construcciones donde se utilizó el promotor de la alfa-amilasa, nunca se vio expresión y el gen fue eliminado completamente del vector. En el segundo caso donde el promotor y el terminador usados eran de origen lactococal, sí se observó actividad amilolítica que resultó inestable y parece que el plásmido fue eliminado, conservándose únicamente el fragmento que codificaba resistencia a eritromicina incluido en el cromosoma de la bacteria.

El mecanismo de replicación de los vectores usados (que es por círculo rodante) parece ser el principal causante de los fenómenos observados, ya que durante la replicación, estos plásmidos generan intermediarios de hebra simple los cuales pueden recombinar fácilmente, dando origen a deleciones.

INDICE

I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
III. Objetivos.....	17
IV. Metodología.....	18
V. Resultados.....	23
VI. Discusión.....	54
VII. Conclusiones.....	60
VIII. Bibliografía.....	61
IX. Apéndice.....	71

INTRODUCCION

De todos los microorganismos, las bacterias lácticas son las más usadas por el hombre con la posible excepción de las levaduras (Sandine, 1987). Tradicionalmente se han utilizado en la producción de alimentos fermentados de muy diverso origen como vegetales, carnes, leches, etc. Sin embargo, la importancia de las fermentaciones lácticas no se restringe a la preservación de los alimentos, también son muy importantes en el desarrollo de sabores y texturas.

Adicionalmente se les han atribuido a estas bacterias diversos beneficios a la salud, como disminución de desórdenes gastrointestinales (son comensales de sistemas digestivos de mamíferos), se ha reportado que pueden detoxificar carcinógenos, metabolizar colesterol, aumentar la respuesta inmune y e incluso disminuir caries dental.

Dentro de este amplio grupo conocido como bacterias lácticas se encuentran las del género *Lactococcus*, las cuales son muy importantes en la industria del queso y otros fermentados lácteos. Estos microorganismos son capaces de secretar proteínas a través de su membrana y pared hacia el medio de cultivo, lo que las hace productoras potenciales de proteína heteróloga y extracelular. Además las bacterias lácticas presentan otra ventaja, pues su uso en la industria alimentaria y farmacéutica no está limitado, ya que se consideran GRAS (General Recognized as Safe).

Todas estas características hacen su manipulación genética atractiva, sin embargo, los estudios realizados y los avances obtenidos no se han dado fácilmente.

El desarrollo de vehículos moleculares para la transformación de las bacterias lácticas se ha topado con muchas dificultades. Frecuentemente se observan problemas de inestabilidad plasmídica que se acentúan cuando hay insertos de DNA, aún si estos son pequeños (Kiewiet, et al, 1993). Este fenómeno se presenta en otros microorganismos Gram (+) y ha sido particularmente estudiado en *B. subtilis* (Bron, et al, 1988; Grus & Erlich, 1989; Leonhardt & Alonso, 1991)

Esta inestabilidad se asocia al tipo de replicación (Grus, et al, 1989; Kiewiet, et al., 1993). Se ha observado en plásmidos que se replican por el mecanismo de círculo rodante la formación de multímeros de alto peso molecular, la presencia de intermediarios de hebra simple, muy activos en recombinación y la terminación prematura de la replicación, hechos que incrementan la inestabilidad tanto estructural como segregacional.

Aparte de la inestabilidad plasmídica, en bacterias lácticas se ha observado incompatibilidad plasmídica y sistemas de restricción y modificación que frecuentemente evitan la transferencia efectiva de genes (Chopin, *et al.*, 1984); otro importante problema es el poco conocimiento que se tiene sobre las señales de secreción y expresión (van de Guchte, *et al.*, 1991a) además de que también se han observado la formación de estructuras secundarias en RNA que impiden o disminuyen la traducción cuando se modifican los plásmidos por inserción de un gen (van de Guchte, *et al.*, 1991b).

Por todo esto es importante tener sistemas para el estudio de la expresión, de la secreción y de la estabilidad de genes heterólogos en bacterias lácticas, ya que si podemos acrecentar nuestro conocimiento sobre las reglas que gobiernan todas estas funciones, será posible incrementar los beneficios que obtenemos de estas bacterias.

En este trabajo se realizaron tres construcciones con dos diferentes plásmidos, ambos de origen lactococal, para tratar de introducir el gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* en *Lactococcus lactis* y así, poder entonces estudiar estabilidad y expresión de un gen de origen heterólogo en una bacteria láctica.

Se decidió tomar el gen de alfa amilasa de *Bacillus licheniformis* como modelo por dos razones principales:

- Este gen permitiría estudiar su expresión identificando la presencia o no de actividad amilolítica en la misma caja de cultivo con una prueba muy sencilla.
- Además este gen daba la posibilidad de tener un marcador genético que pudiera considerarse inocuo (a diferencia de los marcadores usados tradicionalmente que codifican resistencia a antibióticos) de tal modo, que no hubiera restricciones para ser utilizado en bacterias que intervienen en procesos destinados a alimentación humana y animal o en producción de fármacos.

ANTECEDENTES

BACTERIAS LACTICAS

Los microorganismos han estado involucrados en la preparación y procesamiento de alimentos de consumo humano desde las épocas más remotas. La principal causa por la que la fermentación se ha usado ha sido la producción de ácidos, alcoholes y otros inhibidores microbianos que además de tener una acción preservadora mejoran sabores y texturas (Walker & Gingold, 1990). Las bacterias lácticas tienen un papel fundamental en muchos de estos procesos fermentativos y dentro de éstas, las especies más usadas en la preparación de alimentos y bebidas pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (van de Guchte, *et al.*, 1992b). En la Tabla 1 se ilustran las aplicaciones y las especies más importantes.

El término de bacterias lácticas comprende un grupo de microorganismos gram-positivos, microaerófilos, que no forman esporas. En este grupo se encuentran diferentes vías de fermentación de carbohidratos cuyo producto final es exclusivamente ácido láctico (homofermentativo) o cuando menos el 50% (heterofermentativo) ácido láctico (Kandler, 1983). La producción de dicho ácido ocasiona una disminución del pH que inhibe el crecimiento de bacterias esporulantes y otros patógenos, además las bacterias lácticas producen algunos bioantagonistas como antibióticos y bacteriocinas (Chassy, 1987).

La función más importante de las bacterias lácticas es la fabricación de productos lácteos madurados, además se sabe que de las industrias que utilizan microorganismos es la segunda en importancia después de las que producen bebidas alcohólicas. Aunque los quesos son los productos lácteos más importantes también existen otros productos significativos como el yogurt, la crema agria, la mantequilla, el kefir, el koumiss y la leche estilo búlgaro (Ward, 1989).

Como se mencionó las bacterias lácticas tienen diversos beneficios sobre la salud, como la disminución de desórdenes gastrointestinales (son comensales de sistemas digestivos de mamíferos). Se ha reportado que pueden detoxificar carcinógenos, metabolizar colesterol y aumentar la respuesta inmune (Goldin & Gorbach, 1984; Guillard, *et al.*, 1985; Perdígón, *et al.*, 1986).

Tabla 1. Usos de las bacterias lácticas y principales especies utilizadas.
(McKay & Baldwin, 1990)

Fermentaciones vegetales	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus pentasaceus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
Fermentaciones carnicas	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pediococcus acidilactici</i>
Bebidas	
Alcoholicas	<i>Leuconostoc oenos</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
café y cocoa	Varias especies de bacterias lácticas
Salsa de soya	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Pediococcus soyae</i>
Fermentaciones tradicionales	Varias especies de bacterias lácticas
Ensilaje	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Probióticos en salud humana y animal	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i>
Embutidos	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus leichmanii</i> <i>Lactobacillus casei</i>
Productos lácteos	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp <i>cremoris</i> <i>Leuconostoc lactis</i> <i>Streptococcus salivarius</i> ssp <i>thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i>

Lactococcus

Las especies de este género son muy importantes en la industria. Algunas cepas son utilizadas como cultivos iniciadores en la manufactura de quesos y bebidas derivadas de leche. Son células ovoides, de 0.5 a 1.0 μm de diámetro, generalmente se encuentran en pares o en cadenas cortas. Gram Positivo (Breed, *et al.*, 1957).

Estudios taxonómicos recientes indican que *Streptococcus lactis*, *Streptococcus lactis* ssp *diacetylactis* y *Streptococcus cremoris*: podían unirse para formar una sola especie ya que poseen en común enzimas como las deshidrogenasas lácticas y la β -fosfogalactasa, además de tener el mismo % mol de G + C (40.3 - 41.5 %). Entre estas bacterias se encuentra cuando menos 50% de homología en la secuencia de sus bases.

Actualmente la especie *Streptococcus lactis* se conoce como *Lactococcus lactis* y se considera se encuentra integrada por tres cepas: *Lactococcus lactis* ssp *lactis* cepa NCDO 176, *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* cepa NCDO 607 y *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* cepa NCDO 176.

GENÉTICA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

ARREGLO DEL MATERIAL GENÉTICO

En el genoma bacteriano podemos encontrar, además del cromosoma, DNA extracromosomal en forma de moléculas circulares que pueden replicarse de manera autónoma y que generalmente no son indispensables para la célula, sólo en ambientes específicos (Moat & Foster, 1988).

El estudio de la genética de las bacterias lácticas está ampliamente relacionado con sus plásmidos, ya que muchas de las funciones metabólicas importantes en las fermentaciones industriales se encuentran codificadas en dichos plásmidos, los cuales generalmente son inestables (Gasson & Davies, 1984). Algunas de estas funciones son:

- Utilización de azúcares como lactosa, sacarosa, y xilosa, las cuales además de ser fuente de carbono y energía son la base de la producción de ácido láctico (Mc Kay & Baldwin, 1978).

- Producción de proteinasas. El crecimiento en leche es dependiente de este sistema enzimático que permite la degradación de la caseína para su utilización (Kok, 1990).
- Utilización de citrato. El citrato puede ser utilizado como fuente alternativa de carbono ya que se presenta en muchos sustratos usados en fermentación como leche, frutas y vegetales. Su degradación generalmente resulta en la formación de productos no usuales como diacetilo, acetoina, butanediol y acetaldehído, los cuales son importantes en el sabor y aroma de algunos alimentos fermentados como mantequilla y queso cottage (Hugenholtz, 1993).
- Producción de bacteriocinas. Son compuestos antimicrobianos, generalmente de reducido espectro, producidos por las bacterias lácticas para eliminar microorganismos muy cercanos o con los que comparten el mismo nicho ecológico (Klaenhammer, 1993).
- Resistencia a bacteriófagos. Los plásmidos pueden codificar sistemas de restricción y modificación que destruyen al fago o bien intervienen en un mecanismo conocido como "infección abortiva", en donde la expresión del plásmido inabita o reduce la capacidad del fago para producir progenie en la célula (Coffey, *et al.*, 1991).
- Sistemas de restricción y modificación (Chopin, *et al.*, 1984).

El estudio de todos estos plásmidos ha sido importante no solo por las funciones que codifican, sino también para la clonación de genes, ya que se han utilizado en la construcción de vectores para lácticas y como fuente de genes industrialmente importantes (Kok, 1991).

TRANSFERENCIA DE GENES

En 1962 se reportó la primera transducción en *Lactococcus lactis* (Allen, *et al.*, 1962). Fue el primer proceso usado extensivamente en el análisis genético de las bacterias lácticas. Tanto características codificadas en plásmido como en cromosoma han sido transferidas por esta vía, dos de las más importantes, la fermentación de lactosa y la producción de proteasas pudieron ser estabilizadas (McKay, *et al.*, 1978; Kempler, G. *et al.*, 1979).

La fusión de protoplastos como un mecanismo de transferencia génica en *L. lactis* fue posible gracias al desarrollo de la metodología de producción y regeneración de protoplastos (Gasson, 1980). Con esta base Kondo y Mc Kay reportaron en 1982 la primera transformación exitosa en la que obtuvieron una eficiencia de 18.5 transformantes por microgramo de DNA. En trabajos posteriores (Kondo & McKay,

1984, Okamoto, *et al.*, 1983) se optimizaron las condiciones, hasta que en 1986 Simon reporta una eficiencia de 5×10^6 transformantes por microgramo de DNA para la resistencia a eritromicina.

A pesar de que se logra tener altas eficiencias de transformación, los investigadores continúan enfrentándose a problemas para la estandarización y la reproducibilidad de los métodos publicados, ya que la variación entre e intra cepas es muy alta. A la fecha, los protocolos se han modificado y se prefiere la electroporación como un método más eficiente y sencillo de transformación.

ELECTROPORACION

La electroporación es un método conveniente para introducir DNA plasmídico en células vivas, con el que generalmente se tienen eficiencias mayores de transformación que con los métodos químicos.

No se tiene claro como un campo eléctrico puede facilitar la entrada de DNA a células sin afectar severamente el funcionamiento normal de las membranas, lo que sí se sabe es que cuando las células son expuestas a campos eléctricos, una serie de cambios físicos y biológicos ocurren. En campos eléctricos de baja intensidad las membranas de las células se polarizan, si los cambios en el campo eléctrico inducen un potencial de membrana que caiga en el rango de 200-400 mV, se forman áreas de desorganización reversible, en donde se cree que rupturas transitorias pueden ocurrir, haciendo a la membrana permeable a moléculas y macromoléculas. (Chassy, 1987). Asimismo, se ha visto que es prerequisite para la transformación la unión del DNA a la superficie celular (Xie, *et al.*, 1992).

La electroporación fue usada para introducir exitosamente DNA primero en células de mieloma de ratón y subsecuentemente en linfocitos, protoplastos de *Bacillus cereus*, levaduras y protoplastos vegetales.

En *L. lactis* los primeros trabajos que se realizaron reportaban eficiencias de transformación de 1×10^2 - 5×10^5 transformantes por μg de DNA (Harlander, 1987; Powell, *et al.*, 1988; McIntyre & Harlander, 1989); solo en el método que desarrollaron Holo & Ness (1989) y que fue optimizado en *L. lactis* ssp *cremoris* se consiguen rendimientos superiores a 1×10^7 transformantes / μg de DNA, la innovación en este método es la utilización de glicina al 2.5%, como debilitador de pared, en el medio de crecimiento de las células que van a ser transformadas, desafortunadamente, el método no pudo ser utilizado en otras subespecies de *L. lactis*, ya que la glicina en tal alta concentración inhibe el crecimiento (Wells, *et al.*, 1993).

DESARROLLO DE LOS VECTORES DE CLONACION

Una amplia variedad de vectores se han desarrollado, algunos de los cuales tienen funciones específicas como aislamiento de promotores, terminadores, señales de secreción y de expresión. Los hospederos para estos vectores son generalmente dos cepas de *Lactococcus lactis*, en las cuales los plásmidos que codifican los sistemas de restricción y modificación han sido eliminados, estas son: *L. lactis* ssp *lactis* MG1363 derivada de *L. lactis* ssp *lactis* NCDO712 (Gasson, 1983) y *L. lactis* ssp *lactis* IL1403 derivada de la cepa IL594 (Chopin, *et al.*, 1984).

Básicamente el desarrollo de vectores ha seguido dos estrategias:

- 1) Probar vectores con replicones funcionales en otras Gram +. (Tabla 2).
- 2) Desarrollar vectores a partir de plásmidos crípticos encontrados en las bacterias lácticas. (Tabla 3).

1) Vectores derivados de plásmidos heterólogos

a) pAM β 1

Es un plásmido conjugativo obtenido de *S. faecalis* a partir del cual Simon & Chopin (1988) construyeron dos vectores: pIL252 y pIL253. Ambos plásmidos poseen el marcador macrolido-lincosamida-estreptogramina B, que les confiere resistencia a eritromicina. El pIL252 es un vector de bajo número de copias (6 - 9), mientras que el pIL253 se presenta en alto número (45 - 85). Estos plásmidos pueden soportar de manera estable fragmentos de DNA de hasta 30 kb.

b) pIP501

El plásmido pGB301 es un plásmido obtenido de una deleción espontánea de el pIP501 de *S. faecalis* (Behnke, *et al.*, 1981). Tiene como marcadores la resistencia a eritromicina y cloranfenicol. Es un plásmido grande (9.8 kb) con pocos sitios de restricción. Aun cuando acepta insertos grandes a veces éstos son sujetos a deleciones.

Se desarrollaron otros vectores que pueden replicarse tanto en *E. coli* como en *Streptococcus* como el pVA838 (Macrina, *et al.*, 1982), pSA3 (Dao & Ferretti, 1985) y los pMU1327 y pMU1328 (Achen, *et al.*, 1986) pero no han sido utilizados extensivamente.

Tabla 2. Vectores de clonación heterólogos

Vector	Replicón	Tamaño (kb)	Gen marcador	Número de copias	Referencia
pIL252	pAM81	4.7	Em	Bajo	Simon & Chopin 1988
pIL253	pAM81	5.0	Em	Alto	Simon & Chopin 1988
pGB301	pip501	9.8	Em Cm	Bajo	Behnke, <i>et al.</i> , 1981
pVA838	pAC&C184	9.2	Em Cm	Bajo	Macrina, <i>et al.</i> , 1982.
pVA749	pAC&C184	10.2	Em Cm Tc	Bajo	Dao & Ferrell, 1985.
pSA3	pip501				
pMU 1327/1328	pVA838	7.5	Em	Bajo	Achen, <i>et al.</i> , 1986

Tabla 3. Vectores de clonación basados en replicones lactococales.

Vector	Replicón	Tamaño (kb)	Gen marcador	Número de copias	Referencia
pGK12	pWV01	4.4	Em Cm	Bajo	Kok, <i>et al.</i> , 1984
pGK13	pWV01	5.0	Em Cm	Bajo	Kok, <i>et al.</i> , 1984.
pGKV21	pWV01	4.9	Em Cm	Bajo	van der Vossen <i>et al.</i> , 1985.
pNZ12	pSH71	4.3	Cm Km	Alto	de Vos, 1986
pNZ123	pSH71	2.8	Cm	Alto	Simons, G. <i>com. pers.</i>
pCK1	pSH71	5.5	Cm Km	Alto	Gasson & Anderson, 1985
pVS2	pSH71	5.0	Em Cm	---	Von Wright, <i>et al.</i> , 1987.
pFX1	pD125	5.5	Cm	---	Xu, <i>et al.</i> , 1991a
pFX3	pD125	4.5	Cm	---	Xu, <i>et al.</i> , 1991b

* Em = eritromicina, Cm = clorafenicol, Km = kanamicina, Tc = tetraciclina.

Otros plásmidos que han funcionado en *Bacillus subtilis* como el pE194, pC194 y pUB110 no han podido ser transformados en *L. lactis*, a pesar de que los genes de resistencia a eritromicina, cloranfenicol y kanamicina que se encuentran en cada uno de estos vectores han sido expresados en *Lactococcus* (Kok, *et al.*, 1984; Gasson & Anderson, 1985).

2) Vectores con replicones lactococales.

Todos los vectores que se han desarrollado se han derivado de 2 plásmidos crípticos: el pWV01 de *L. lactis* ssp *cremoris* y el pSH71 de *L. lactis* spp *lactis*. Ambos plásmidos son capaces de replicarse aparte de en *L. lactis* en *B. subtilis* y *E. coli* (Leenhouts, *et al.*, 1991). El análisis de sus secuencias y modo de replicación indican que pertenecen a la clase de plásmidos que generan intermediarios de hebra simple durante su replicación por círculo rodante (Leenhouts, *et al.*, 1991; Gruss & Erlich, 1989).

Como marcadores genéticos en estos plásmidos se han usado los genes de resistencia a eritromicina, cloranfenicol y kanamicina (Tabla 3). En algunos casos estos genes ofrecen la posibilidad de clonar DNA produciendo la inactivación del gen, facilitando la selección de transformantes. Por otro lado sitios de restricción múltiple se incluyeron en los vectores para ampliar las posibilidades de clonación.

Además de los vectores generales se construyeron otros para identificar señales de transcripción, como promotores y terminadores, vectores de expresión y vectores con señales de secreción (Tabla 4).

Vectores de integración

Como se mencionó, muchas de las funciones importantes de las bacterias lácticas se encuentran codificadas en plásmido y pueden ser perdidas fácilmente por inestabilidad segregacional de los plásmidos, por esta razón algunos grupos de investigación se dieron a la tarea de trabajar con vectores de integración. Dos tipos de estos vectores se han desarrollado: derivados de plásmidos heterólogos incapaces de replicarse en *Lactococcus* y aquéllos derivados del replicón pWV01 (Tabla 5).

EXPRESION GENETICA EN *Lactococcus*

Para poder hablar de mejoramiento o manipulación genética es necesario el conocimiento y la comprensión de las señales que permiten la expresión de un gen.

Tabla 4. Vectores con funciones específicas

Vector	Replicon	Gen marcador	Características relevantes	Referencia
Selección				
Promotor/terminador				
pGKV210	pWV01	Em	Gen <i>cat-86</i> sin promotor	van der Vossen <i>et al.</i> , 1985.
pBV5030	pWV01	Em	Gen <i>cat-86</i> sin promotor	Bojovick, <i>et al.</i> , 1991.
pMU1327	pVA380-1	Em	Gen <i>cat 194</i> sin promotor	Achen, <i>et al.</i> , 1986.
pNZ336	pSH71	Cm Km	Gen de β - <i>gal</i> sin promotor	Simons, <i>et al.</i> , 1990.
pGKV259	pWV01	Em Cm	Contiene entre el promotor P59 y el gen <i>cat-86</i> un sitio Sal I y un sitio Pst I.	van der Vossen <i>et al.</i> , 1985.
Señales de traducción				
pFX4, 5 y 6	pD125	Cm	Fusiones de señales de traducción con <i>lacZ</i> .	Xu, <i>et al.</i> , 1991b
Expresión y secreción				
pMG36e	pWV01	Em	Vector de expresión constitutiva, contiene el promotor lactococal P32.	van de Guchte <i>et al.</i> , 1989
pMG36		Km		
Selección de péptido señal				
pGA14	pWV01	Em	Promotor SPO2 y gen <i>amy</i> sin secuencia señal	Smith, <i>et al.</i> , 1987.
pGB14	pWV01	Em	Gen de β -lactamasa sin promotor y sin secuencia señal.	Smith, <i>et al.</i> , 1987.

* Em = eritromicina, Cm = cloranfenicol, Km = kanamicina

Tabla 5. Vectores de integración desarrollados para *L. lactis*

Vector	Derivado del plásmido	Gen marcador	Características relevantes	Referencia
Origen heterólogo				
pWV60A/B	pBR322	Cm	Integración ilegítima en alguna medida. La amplificación se pierde gradualmente bajo condiciones no selectivas.	Leenhouts, <i>et al.</i> , 1989.
pKL10A/B	pBR322	Em	Amplificación probablemente dada por integración de multímeros.	Leenhouts, <i>et al.</i> , 1990.
pKL203A/B	pUB110	Em Cm	Amplificación inestable	Leenhouts, <i>et al.</i> , 1990.
pKL400B	pTB19	Em	Integración estable de una copia	Leenhouts, <i>et al.</i> , 1990.
pKL301B	pSC101	Cm	Integración estable de una copia	Leenhouts, <i>et al.</i> , 1990.
pE194/	pE194	Em	Integración estable	Chopin, <i>et al.</i> , 1989.
Origen lactococal				
pORi28	pWV01	Em	Disponible para integración Campbell-like en cualquier localización.	Leenhouts & Venema, 1993
pINT23	pWV01	Em	Disponible para integración Campbell-like en el gen <i>pepX</i> inactivándolo.	"
pOR1280	pWV01	Em <i>lacZ</i>	Integración por reemplazamiento.	"
pINT29	pWV01	Em	Integración por reemplazamiento en el gen <i>pepX</i> , pero la integración del tipo Campbell no inactiva al gen.	"
pOR113	pWV01	Em	Puede generar fusiones traduccionales en el cromosoma por integración Campbell-like.	"
pOR119	pWV01	Em	Integraciones azarosas en el cromosoma por integración Campbell-like	"

a) Transcripción

A partir de los resultados obtenidos con los vectores para seleccionar promotores (Bojovic, *et al.*, 1991; van der Vossen, *et al.*, 1987, van der Vossen, *et al.*, 1985) y de los datos obtenidos de algunos genes de *L. lactis* aislados (Kok, *et al.*, 1988; Handrikman, *et al.*, 1989, Van Belkum, *et al.*, 1991) se identificaron las siguientes características comunes a los promotores lactococales (Van de Guchte, *et al.*, 1992b):

- 1) Predominio de A en la posición 0 (inicio de la transcripción) y de T en la posición -1.
- 2) Una secuencia -35 TTTG y una región rica en A que recuerda la secuencia -10.
- 3) La distancia que separa las secuencias -10 y -35 tiene aparentemente más de 17 o 18 nucleótidos (lo usualmente encontrado en *E. coli* y en *B. subtilis*).

b) Traducción

En los genes de *L. lactis* que han sido clonados y analizados, principalmente aquéllos involucrados en el metabolismo de la lactosa (Renault, *et al.*, 1989; Boizet, *et al.*, 1988; De Vos & Gasson, 1989), proteasas (Mayo, *et al.*, 1991; Nardj, *et al.*, 1991) y genes de resistencia a fagos (Hill, *et al.*, 1990) se observa que el codón de inicio de la traducción es casi siempre AUG, aunque también funcionan UUG y GUG y que en la región que precede a este codón se encuentra la secuencia de SD, complementaria al extremo 3' del rRNA 16S de *L. lactis* (3'-UCUUUCCUCCA-5').

Sobre la utilización de codones por las lácticas no hay consenso, ya que varía marcadamente entre los genes; en general, *L. lactis* muestra preferencia por codones con A o U en la última posición, lo que refleja el alto contenido de A + T del microorganismo (van de Guchte, *et al.*, 1992b)

CLONACION DE GENES HETEROLOGOS

A partir del desarrollo de vectores de clonación y de la metodología para la transformación de las bacterias lácticas se inició la clonación de genes heterólogos con un éxito relativo. Los genes que se han clonado han tratado de evitar la adición de enzimas purificadas (en la producción de quesos y ensilaje) o aumentar la capacidad antimicrobiana. Recientemente se empiezan a utilizar las bacterias lácticas para la clonación de antígenos que induzcan respuesta inmune específica de tal manera que las bacterias pudieran ser usadas como vehículos de vacunas (Tabla 6).

Tabla 6. Genes heterólogos clonados en bacterias lácticas.

Gen	Origen	Receptor	Vector	Uso	Ref.
Prochimosina	Bovino	<i>L. lactis</i>	pNZ18	Producción de queso	1
Lisozima	huevo	<i>L. lactis</i>	pMG36 _e	Actividad antimicrobiana	2
Proteasa	<i>B. subtilis</i>	<i>L. lactis</i>	pGKV210	Maduración del queso	3
Lisozima	Bacteriofago T4 <i>E. coli</i> Bacteriofago	<i>L. lactis</i>	pMG36 _e	Actividad antimicrobiana	4
Alfa-amilasa	<i>B. licheniformis</i>	<i>L. lactis</i>	pGAK1 pGBK1	Aislamiento de señales de exportación de proteínas	5
Luciferasa	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>L. lactis</i>	pSB292	Estudios de la regulación del metabolismo de la lactosa.	6
Alfa-amilasa	<i>B. stearothermophilus</i>	<i>L. lactis</i>	pNZ12	Aislamiento de señales de exportación	7
Fragmento C de la toxina del tétanos		<i>L. lactis</i>	pLPo1	Vacuna oral	8
Endoglucanasa	<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	pSA3	Ensilaje	9
Endoglucanasa	<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	pERM3.2 pSA3	Ensilaje	10
Alfa-amilasa	<i>B. stearothermophilus</i>				
Lipasa	<i>Staphylococcus hyicus</i>	<i>Lb. curvatus</i>	pLipSi	Desarrollo de sabor	11
Alfa-amilasa	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Lb. plantarum</i>	pIL253	Ensilaje	12

Endoglucanasa	<i>B. subtilis</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	pAM610	Ensilaje	13
Alfa amilasa	<i>B. stearothermophilus</i>	<i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. helveticus</i>	pPSC20	Ensilaje	14
Endoglucanasa Xilanasa β-glicosidasa	<i>Clostridium thermoceilum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	pWP37	Ensilaje	15
Endoglucanasa Xilanasa	<i>C. acetobutylicum</i>				
Endoglucanasa	<i>B. fibrisolvens</i>				
Colesterol oxidasa	<i>Streptomyces sp</i>	<i>Lb. casei</i>	pNZ19	Desarrollo de texturas y sabores	16
Lisostafina	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Lb. casei</i>	pGKV210	Antimicrobiano específico contra <i>S. aureus</i>	17
Colesterol oxidasa	<i>Streptomyces lividans</i>	<i>Lb. reuteri</i>	pC194	Disminución del contenido de colesterol en alimentos	18
Alfa amilasa	<i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	pNZ12	Ensilaje	19

Ref.: 1) Simons, et al., 1987. 2) van de Guchte, et al., 1987. 3) van de Guchte, et al., 1989. 4) van de Guchte, et al., 1992. 5) Pérez-Martínez, et al., 1992. 6) Eaton, et al., 1993. 7) van Asseldonk, et al., 1993. 8) Wells, et al., 1993. 9) Bates, et al., 1989. 10) Scheirlinck, et al., 1989. 11) Voguel, et al., 1990. 12) Jones & Warner, 1990. 13) Hack & Pack, 1990. 14) Cocconcelli, et al., 1991. 15) Scheirlinck, et al., 1990. 16) Somkutti, et al., 1992. 17) Gaier, et al., 1992. 18) Brigidí, et al., 1993. 19) Hols, et al., 1994.

Es importante señalar que aún cuando se han clonado 8 diferentes genes (además de los que codifican resistencia a antibióticos) en *L. lactis*, no se puede hablar de que se encuentren sentadas las bases para la manipulación de esta bacteria, porque lo que se ha observado es una expresión muy pobre de los genes probados y en ocasiones cuando se clonan enzimas, éstas son inactivas.

Otros genes que se han clonado en otras bacterias lácticas (*Lactobacillus*), se encuentran también en la Tabla 6.

ESTABILIDAD PLASMIDICA

La estabilidad de un plásmido es definida como la capacidad de la célula hospedera para mantener la estructura del plásmido asegurando su expresión y manteniendo cuando menos una copia por célula (Wei, *et al.*, 1989).

Existen dos tipos de inestabilidad:

La inestabilidad segregacional, en la que el plásmido se pierde totalmente después de una partición defectuosa a las células hijas. Se ha visto que en este tipo de inestabilidad al menos dos sistemas son importantes, la replicación (Kiewiet, *et al.*, 1993) y la partición (Williams & Thomas, 1992).

La replicación no solo mantiene un número de copias promedio por célula, también el tipo de esta replicación puede condicionar la estabilidad del plásmido; se ha visto que el pWV01 (Leenhouts, *et al.*, 1991) y el pSH71 (Gruss & Erlich, 1989), ambos de *L. lactis* pertenecen a la clase de plásmidos que generan intermediarios de hebra sencilla durante su replicación por círculo rodante (RCR por sus siglas en inglés), lo cual tiene consecuencias importantes para la capacidad de recombinación de estos plásmidos tanto legítima como ilegítimamente, además de la formación de multímeros lineales de alto peso molecular (HMW) que impiden una segregación adecuada.

La partición determina como las copias del plásmido son distribuidas a las células hijas en cada división celular. Los determinantes genéticos de la partición se han encontrado codificados en diferentes plásmidos y se han agrupado por su similitud en la familia de genes *sop I par* y la familia *Inc FII* (Williams & Thomas, 1992).

El segundo tipo de inestabilidad, la estructural, generalmente involucra deleciones en los plásmidos, se han reportado diferentes mecanismos que pueden explicar este fenómeno: integración de secuencias de DNA homólogo dependiente de rec E (Ostroff, *et al.*, 1984; Rapoport, *et al.*, 1979); restricción y modificación del DNA

plasmídico transformados (Tanaka, 1979) y transposición. Además deleciones independientes de rec E también se han observado (Uhlen, *et al.*, 1981). Adicionalmente ambos tipos de inestabilidad pueden verse incrementados por insertos de DNA (Gruss & Erlich, 1988; Bron & Luxen, 1985).

Particularmente en bacterias lácticas son pocos los estudios de estabilidad plasmídica. Recientemente se publicaron dos trabajos en los que se estudia la estabilidad de los plásmidos pIL205, pIL252 y pIL253 en *L. lactis* en fermentación por lote (El Alami, *et al.*, 1992) y en cultivo continuo (D'Angio, *et al.*, 1994), en ambos casos se observa que es necesaria la presencia de una "resolvasa" en el vector para que este sea estable.

No se encuentra en la literatura ningún estudio sistemático del efecto de insertar DNA en plásmidos de bacterias lácticas aún cuando se ha observado inestabilidad segregacional en muchos de los trabajos de clonación de genes heterólogos e inestabilidad estructural en algunos casos como en la clonación de la lisozima de lambda en *L. lactis* (van de Guchte, *et al.*, 1992) y de la lisostafina de *B. subtilis* en *Lb. casei* (Gaier, *et al.*, 1992).

Con los antecedentes dados se propuso el siguiente objetivo general de este trabajo:

"Emplear el gen de alfa amilasa de *Bacillus licheniformis* como un modelo para el estudio de la expresión de genes heterólogos en *Lactococcus lactis*".

Para cubrir este objetivo se plantearon las siguientes actividades:

"Determinar las condiciones óptimas de electroporación de *Lactococcus lactis*".

"Construir vectores recombinantes para la clonación del gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* en *Lactococcus lactis*, verificándolos de ser posible en *E. coli*".

"Transformar *Lactococcus lactis* con las construcciones realizadas".

"Analizar las bacterias lácticas transformantes, en términos de su actividad amilolítica, de la presencia del vector de clonación y de la localización del inserto (gen de alfa amilasa de *Bacillus licheniformis*) en las células transformadas".

METODOLOGIA

Microorganismo y plásmido

Las bacterias y los plásmidos utilizados se enlistan en la tabla 7.

E. coli fué crecida en LB (Maniatis, et al., 1982) o en LB solidificado con agar al 1.5% a 37°C. *L. lactis* se creció en M17 (Terzaghi & Sandine, 1975) con glucosa 0.5% en lugar de lactosa, o en M17-glucosa con agar a 30°C. Para la transformación de *L. lactis* y la obtención de DNA total o plasmidico se añadió treonina 20 mM al medio de crecimiento como debilitador de pared.

Los antibióticos fueron usados a las siguientes concentraciones finales: Eritromicina 5 µg/ml y cloranfenicol 10 µg/ml para *L. lactis* y eritromicina 500 µg/ml, cloranfenicol 10 µg/ml y ampicilina 50 µg/ml para *E. coli*.

Las cepas silvestres y transformadas fueron conservadas en glicerol 40% y 20% a -20°C y a -70°C.

Manipulación del DNA

Extracción

El DNA plasmidico de *E. coli* fué obtenido por la técnica de Birboim & Doly (1979). Para la extracción de plásmido de *L. lactis*, tres diferentes técnicas se probaron: la de Bansal y Das (1989) para aislamiento de plásmidos y fagos de *E. coli*, una técnica desarrollada por el Dr. Bruce Chassy para *Lactobacillus* (comunicación personal) y la técnica de O'Sullivan y Klaenhammer (1993) para la extracción de plásmido de *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Una modificación de esta última fué la que se seleccionó por rendir un DNA plasmidico con menos contaminación cromosomal (aunque ésta nunca se erradicó por completo). Básicamente esta técnica consiste en lo siguiente:

- Se toman 5ml de un cultivo de toda la noche. Se centrifuga y se lavan las células con Buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8.0.
- Se resuspende el botón en 200 µl de sacarosa al 25%. Se reposa en hielo 10 min.

Tabla 7. Cepas bacterianas y plásmidos

Cepa o plásmido	Características relevantes	Origen o referencia
Cepa		
<i>E. coli</i>		
DK1	<i>rec A</i>	Colección del laboratorio
LE392	<i>supE44 supF58 hsdR514</i> <i>galK2 galT22 metB1</i>	Silhavy, <i>et al.</i> , 1984
<i>L. lactis ssp lactis</i>		
MG1363	<i>lac prfP</i> . Sin plásmidos*	Gasson, 1983.
IL1403	Sin plásmidos*	Chopin, <i>et al.</i> , 1984.
Plásmidos		
pJ07	pBR322 con el gen de alfa-amilasa de <i>B. licheniformis</i>	Joyet, <i>et al.</i> , 1984
pUC-amy	pUC 19 con el gen de alfa-amilasa de <i>B. licheniformis</i>	Colección del laboratorio
pLZ12	Vector lanzadera para <i>E. coli</i> y <i>L. lactis</i> . pNZ12 con sitio de restricción múltiple. Replicón del plásmido pSH71. Cm ^R .	De Vos, 1986
pMG36 _g	Vector lanzadera para <i>E. coli</i> y <i>L. lactis</i> . Vector de expresión. Promotor y terminador lactococcal. Replicón del plásmido pWV01. Em ^R .	van de Guchte, <i>et al.</i> , 1989.
pGK13	Vector lanzadera para <i>E. coli</i> y <i>L. lactis</i> . Replicón del plásmido pWV01. Em ^R Cm ^R .	Kok, <i>et al.</i> , 1984
pGKV11	Vector lanzadera para <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>L. lactis</i> . Replicón del pWV01. Promotor SPO2. Em ^R . Cm ^R .	van der Vossen, <i>et al.</i> , 1985

* Estas cepas se han curado de plásmidos porque se ha encontrado que en algunos de ellos se encuentra la información que codifica para sistemas de restricción y modificación; además de esta manera, no se dan problemas de incompatibilidad plasmídica.

- Se añaden 400 µl de solución alcalina de SDS (SDS 3%, NaOH 0.2 N), se mezcla inmediatamente y se incuba 10 min a temperatura ambiente.
- Se añaden 300 µl de acetato de sodio 3 M (pH 4.8), se mezcla inmediatamente y se reposa en hielo 10 min.
- Se centrifuga a 15 000 rpm durante 15 min.
- Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se le agregan 650 µl de isopropanol.
- Después de 30 min. se centrifuga a 15 000 rpm durante 15 min.
- Se remueve todo el líquido y se resuspende el botón en 280 µl de agua destilada estéril.
- Se añaden 175 µl de acetato de amonio 7.5 M con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio.
- Se añaden 350 µl de fenol-cloroformo, se mezcla bien y se centrifuga a 13 000 rpm por 5 min.
- Se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo y se le añade 1 ml de etanol. Se deja a -20°C cuando menos 1 hr. Se centrifuga a 15 000 rpm durante 15 min.
- Se lava con etanol 70%, se remueve todo el líquido, se seca y se resuspende en Buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).

Cuando se requería tratar con RNAasa, ésta se usó a una concentración de 0.1 mg/ml y se realizó una limpieza posterior con fenol, fenol-cloroformo y cloroformo.

Cuando se necesitó DNA total su extracción se realizó por un método recomendado por el Dr. Bruce Chassy (Com. pers.):

- A partir de un cultivo de toda la noche, se siembra un matraz de 500 ml.
- A las 4 horas se mide la densidad óptica y se cosechan las células, lavandolas con buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 tres veces.
- Se resuspenden en 15 ml de buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 y se les agrega 12.5 ml de PEG (peso molecular promedio 8 000). Se agita en vortex.
- Se agrega lisozima a una concentración de 100 µg por UA del cultivo original.
- Se incuba a 37°C durante una hora
- Se recuperan las células y se resuspenden en la décima parte del volumen original del cultivo de buffer TE.
- Se mezcla y se agrega 1/9 de SDS.
- Se incuba a 37°C por 15 minutos.
- Se le agrega un volumen de fenol, se agita por inversión y se centrifuga para separar la fase acuosa.
- Esta última es nuevamente tratada con fenol-cloroformo (1:1) y se vuelve a obtener la fase acuosa.
- Se agrega acetato de amonio 7.5 M y se mezcla.
- Se precipita con al menos 2.2 volúmenes de etanol absoluto y se deja precipitar a -20°C al menos 1 hora.
- Se centrifuga a 15 000 rpm por 15 minutos.

- Se seca el botón y se resuspende en buffer TE.
- Se agrega RNA'sa a una concentración final de 100µg / ml, se incuba 1 hora a 55°C.
- Se ajusta la solución al 0.1% con SDS y se agrega proteinasa K a una concentración de 100µg / ml. Se incuba a 55°C, 1 hora.
- Se limpia la muestra con fenol, fenol-cloroformo, y cloroformo-isoamilico, agitando solo por inversión.
- En cada paso se centrifuga y se recupera la fase acuosa.
- Se agrega 1 / 20 de NaCl 5 M y 2.2 volúmenes de etanol absoluto, se deja precipitar a -20°C toda la noche.
- Se centrifuga a 15 000 rpm por 15 minutos y se lava el botón con etanol al 70%.
- Se seca perfectamente y se resuspende en TE.

Las enzimas de restricción utilizadas, la nucleasa Mung-Bean, la fosfatasa alcalina y la T₄ DNA ligasa utilizadas (Amersham y Boehringer GmbH) fueron usadas de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los plásmidos y sus fragmentos de restricción fueron analizados por electroforesis horizontal en geles de agarosa (0.8 - 1.2%). La limpieza de los fragmentos para ligación se llevo a cabo con Gene Clean (Bio - 101). Todas las manipulaciones de DNA in vitro se llevaron a cabo como lo describe Maniatis (1982).

Transformación

E. coli fué transformada por electroporación siguiendo la técnica de Zabarovsky & Winberg (1990), pero utilizando agua como medio de electroporación (Heery & Dunican, 1989).

L. lactis también se transformó por electroporación, pero, en este caso fue necesario determinar las condiciones óptimas para la transformación, ya que aún cuando habían sido reportados varios métodos, ninguno de ellos daba altas eficiencias. Se probaron diferentes parámetros como volumen celular en la cubeta del electroporador, diferentes concentraciones de DNA en la transformación, debilitadores de pared como glicina y treonina y tres diferentes medios de electroporación: Buffer Hepes 7 mM, pH 7.4 (Mureana, et al., 1988); Buffer de fosfatos 7 mM, pH 7.0, MgCl₂ 1 mM, sacarosa 272 mM (Chassy, 1987) y agua.

La transformación se realizó en un Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Cal. USA) en cubetas con una distancia interelectrodos de 0.1 cm, con las siguientes condiciones de operación: Voltaje 2.5 KV, capacitor 25 µFD, controlador de pulso 200 Ohms.

El procedimiento general fué el siguiente:

- Se creció el inóculo por 12 hrs en M₁₇-glucosa-treonina a 30°C, sin agitación.
- Se transfirió al 1% a medio fresco y se incubó 4 hrs.
- Se cosecharon las células y se lavaron con glicerol al 10% tres veces, estas células se pueden mantener de esta manera listas para la transformación a -70°C durante un máximo de 6 meses.
- Al momento de transformar, se lavaron con el buffer de electroporación y se mantuvieron en hielo.
- Se colocaron en la cubeta las células y el DNA (el indicado para cada prueba) y se les dio el pulso, inmediatamente después del cual se les agregó M₁₇-gluc-sacarosa 0.3 M (para estabilizar a las células) y se incubaron durante 4 horas.
- Se plaquearon las células en cajas de M₁₇ con el antibiótico marcador del plásmido introducido y almidón si se necesitaba detectar actividad.

Las transformantes se obtenían entre 24 y 72 horas después de la transformación.

Identificación de las transformantes

Las transformantes fueron identificadas por la actividad amilolítica en placas de M₁₇ - glucosa - almidón (la glucosa se disminuyó para estos casos al 0.1% y el almidón se usó al 0.5%). Se reveló con lugol (yodo metálico 1%, yoduro de potasio 2%).

Además la presencia del gen y del plásmido fue confirmada por hibridación, utilizando ³²P alfa - dCTP, utilizando la metodología propuesta por Maniatis (1982) para transferencia de DNA a filtros de nylon e hibridación de estos y siguiendo la instrucciones del Kit de Multiprime DNA labelling systems 1601Y de Amersham. De cada gel se realizó doble transferencia para poder comparar dos sondas simultáneamente.

RESULTADOS

Para poder cubrir el objetivo del trabajo, se tenía inicialmente que establecer las condiciones de transformación. Para *E. coli*, los protocolos reportados satisfacían nuestros requerimientos, pero para *L. lactis* no, ya que aún cuando en la literatura se encontraron varios métodos, los resultados que se obtenían no eran por mucho los que se reportaban. Así pues, se decidió tomar como los parámetros a revisar el medio de electroporación, la presencia en el medio de crecimiento de debilitadores de pared, el volumen celular en la cubeta del electroporador y la concentración de DNA. Las condiciones del Gene-Pulser se mantuvieron constantes en todos los experimentos en 25 kV/cm, que es la máxima potencia del generador y es, además la que aseguraba la transformación de las células sin afectar su viabilidad.

Transformación de *Escherichia coli*

E. coli fue transformada con la técnica de Zaborovsky & Winberg (1990), variándose las concentraciones de DNA y los volúmenes celulares. El plásmido que se utilizó para hacer las pruebas fué el pLZ12, el cual se escogió por ser un plásmido de alto número de copias en el que habían sido clonados y expresados genes en *E. coli* y diferentes Gram + (de Vos, comunicación personal). Las transformantes se seleccionaron en placas con Cm a una concentración de 10 µg/ml.

Como se puede observar en la tabla 8, la máxima eficiencia de transformación que se obtuvo con el plásmido pLZ12 en *E. coli* fue de 6×10^5 UFC/ µg de DNA / ml, la cual no es muy buena, ya que en *E. coli* se deben obtener frecuencias del orden de 10^8 , por lo que se probaron las mismas condiciones pero usando el plásmido pUC 9 en la transformación, con este plásmido se obtuvieron 5×10^8 UFC/ µg de DNA / ml, lo que mostro que las condiciones eran adecuadas pero que la eficiencia se podía ver disminuida por el uso de un vector con replicón de origen lactococal.

Además, se vio que el volumen celular es una característica que influye sobre la constante de tiempo de resistencia-capacitancia que se obtiene al dar el choque eléctrico, dicha constante de resistencia-capacitancia define de manera indirecta la amplitud del pulso (Ver apéndice). Al parecer se obtienen valores menores de esta constante conforme aumenta el volumen celular (de 4.8 mseg en 50 µl a 4.3 mseg en 200 µl), lo que aparentemente tiene efecto sobre la eficiencia de transformación que aumenta en un orden de magnitud al pasar de un volumen de 200 µl a un volumen de 50 µl.

Tabla 8. Determinación de las condiciones de electroporación de *E. coli*

Volumen celular	Concentración de DNA plasmídico		
	0 µg	0.1 µg	0.3 µg
50 µl	---	6.0×10^5 UFC/µg/ml	1.6×10^5 UFC/µg/ml
100 µl	---	1.5×10^5 UFC/µg/ml	2.3×10^5 UFC/µg/ml
200 µl	---	9.3×10^4 UFC/µg/ml	7.4×10^4 UFC/µg/ml

Las pruebas se realizaron en *E. coli* LE392 con el plásmido pLZ12.

Medio de electroporación: Agua tridestilada, estéril

Condiciones de operación del Gene Pulser:

Voltaje: 2.5 KV

Capacitor: 25 µFD

Controlador de pulso: 200 ohms

Transformación de *Lactococcus lactis*

En el caso de la transformación de *Lactococcus* con el mismo pLZ12 se probaron tres medios diferentes de electroporación, para posteriormente establecer el volumen celular que se iba manejar y la concentración de DNA.

Como se observa en la tabla 9, la mayor eficiencia se obtuvo transformando en agua, aun cuando los medios que tradicionalmente se han utilizado en bacterias lácticas son buffer de fosfatos y buffer HEPES; en este último (como se anota en la tabla) no se obtuvo ninguna transformante.

Como en el caso de *E. coli* la constante de tiempo resulto inversa al volumen celular, 4.5 mseg para 50 μ l de células y 3.6 mseg para 200 μ l. Asimismo, la eficiencia de transformación también disminuye, es importante señalar que la electroporación no tiene ningún efecto nocivo sobre las células, como se observo al plaquear las células transformadas en medio sin antibiótico.

La máxima eficiencia de transformación (5.8×10^3 UFC/ μ g DNA/ ml cel) se obtuvo con un volumen en la cubeta de 50 μ l de células y 0.3 μ g de DNA, por lo que se tomaron estas condiciones para probar si debilitadores de pared como treonina y glicina en el medio de crecimiento podían facilitar la entrada del DNA y con ello aumentar la eficiencia. Como se puede observar en la tabla 10, el número de transformantes se aumentó en un orden de magnitud utilizando treonina en el medio, sin ninguna diferencia entre las dos concentraciones probadas. Por el contrario, al usar glicina la eficiencia disminuye, aunque se debe aclarar que el crecimiento también se vio mermado con este aminoácido y que pudo ser la baja viabilidad de las células la razón de la poca transformación.

Utilizando las condiciones establecidas para la electroporación, se transformaron otros tres plásmidos lactococales: pGKV11, pMG36_e y PGK13, obteniéndose para éstos eficiencias de 3.0×10^3 , 1.7×10^4 y 2.1×10^3 UFC/ μ g DNA / ml cel respectivamente (Tabla 11) lo que hablaba de que el protocolo establecido funcionaba en general para *L. lactis* y también se podía ver que los vectores que mejor se transformaban eran el pLZ12 y el pMG36_e. Finalmente se verificó la integridad de los plásmidos para comprobar que la electroporación no los afectara (Fig. 1).

Introducción del gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis* a *L. lactis*

Para introducir del gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis* en *L. lactis* se diseñaron tres diferentes construcciones con dos diferentes vectores: el pLZ12 y el pMG36_e, ambos de origen lactococal y con la capacidad de replicarse tanto en *L. lactis* como en *E. coli* (Tabla 4).

Tabla 9. Determinación de las condiciones de electroporación de *L. lactis*

Medio de electroporación: Agua

Volumen celular	Concentración de DNA plasmídico		
	0 µg	0.1 µg	0.3 µg
50 µl	---	4.0×10^3 UFC/µg/ml	5.8×10^3 UFC/µg/ml
200 µl	---	1.0×10^2 UFC/µg/ml	5.0×10^2 UFC/µg/ml

Medio de electroporación: Buffer de fosfatos

Volumen celular	Concentración de DNA plasmídico		
	0 µg	0.1 µg	0.3 µg
50 µl	---	---	2.6×10^2 UFC/µg/ml
200 µl	---	---	3.3×10^1 UFC/µg/ml

Medio de electroporación: HEPES

No se obtuvo ninguna transformante.

Las pruebas se realizaron en *L. lactis* IL1403 (con una concentración celular de 4×10^7 UFC/ml) con el plásmido pLZ12.

Condiciones de operación en el Gene Pulser:

Voltaje 2.5 KV

Capacitor 25 µFD

Controlador de pulso: 200 Ohms

Tabla 10. Efecto de la treonina y la glicina en la eficiencia de transformación de *L. lactis*

	Medio de crecimiento		
	M ₁₇	Tre 20 mM	Tre 40 mM
M ₁₇	5.8 X 10 ³ UFC/μg/ml	5.0 X 10 ⁴ UFC/μg/ml	4.8 X 10 ⁴ UFC/μg/ml
Gli 1%	2.0 X 10 ² UFC/μg/ml	1.8 X 10 ² UFC/μg/ml	1.0 X 10 ³ UFC/μg/ml
Gli 2%	80 UFC/μg/ml	60 UFC/μg/ml	50 UFC/μg/ml

Pruebas realizadas en *L. lactis* IL1403 con el plásmido pLZ12.

Se utilizaron las mismas condiciones que en el experimento anterior, tomándose agua como medio de transformación, 50 μl de células en la cubeta y 0.2 μg de DNA plasmídico.

Tabla 11. Efecto de la concentración de DNA en la transformación de diferentes plásmidos lactococales

Plásmido	Concentración de DNA plasmídico		
	0 μg	0.1 μg	0.3 μg
pGKV11	----	3.0 X 10 ³ UFC/μg/ml	9.0 X 10 ² UFC/μg/ml
pMG36 _e	----	1.7 X 10 ⁴ UFC/μg/ml	9.0 X 10 ² UFC/μg/ml
pGK13	----	2.1 X 10 ³ UFC/μg/ml	1.0 X 10 ³ UFC/μg/ml

Pruebas realizadas en *L. lactis* IL1403 con el plásmido pLZ12.

Se utilizaron las mismas condiciones que en el experimento anterior añadiendo treonina 20 mM al medio de crecimiento.



Figura 1. Análisis de los plásmidos obtenidos de transformantes de cepas IL1403 y MG1363. C₁ pMG36_g - IL1403. C₂ pMG36_g - MG1363. C₃ pGKV11 - IL1403. C₄ pGKV11 - MG1363. C₅ pLZ12 - IL1403. C₆ pLZ12 - MG1363. C₇ pGK13 - IL1403. C₈ pGK13 - MG1363. C₉ Lambda Eco RI / Hind III.

pLZ12

La estrategia de clonación para este vector se ilustra en la Fig. 2. El fragmento Bam HI / Eco RI del plásmido pJ07 que contenía el gen de alfa-amilasa con su promotor original, fué ligado en el sitio Bgl II / Eco RI del pLZ12, estos sitios se escogieron porque al estar en el polylinker no se debían alterar las funciones originales del vector.

La construcción fué transformada en *E. coli* LE392 por electroporación con las condiciones descritas en materiales y métodos. Se obtuvieron 900 UFC/ μg de DNA / ml de células. De éstas se aislaron 100 de las que mostraron actividad en placas de LB con almidón (Fig. 3), el plásmido de estas transformantes fué obtenido y cortado para verificar la construcción con enzimas de restricción que reconocían sitios únicos en el plásmido (Eco RI, NcoI, Apa I) o en el gen (Cia I, Nde I, Hind III). La figura 4 muestra el mapa de restricción del gen de alfa-amilasa y la figura 5, el gel correspondiente a la digestión del plásmido pLZ12-amy, en donde se puede ver que se encuentran todos los sitios de corte esperados tanto del gen como del vector. Asimismo se puede observar que el tamaño del plásmido corresponde al esperado, que es de 6880 pb (Fig. 2).

Una vez verificada la construcción se transformó el plásmido pLZ12-amy en *L. lactis* cepas MG1363 e IL1403, se obtuvieron solo 200 UFC / μg de DNA / ml de células (promedio de 5 transformaciones diferentes). Es notorio que la eficiencia de transformación del pLZ12-amy en comparación a el pLZ12 sin inserto es 250 veces menor.

Aún cuando las transformantes obtenidas crecieron bien en el medio con clorafenicol (10 μg / ml), ninguna mostró actividad amilolítica en placa, por lo que en un principio se pensó que podía ser un problema de expresión, así que después de varios experimentos se seleccionaron 50 colonias al azar para determinar la presencia del plásmido. En el gel (Fig 6) se observa un plásmido de 3.6 kb, que es más pequeño que la construcción electroporada e incluso que el mismo pLZ12; también se puede observar que con el inserto el rendimiento en la extracción de DNA plasmídico es menor, probablemente a causa de una disminución en el número de copias del vector. Este fenómeno se presentó de igual manera en las dos cepas de *L. lactis* utilizadas (MG1363 e IL1403).

Se realizó un mapeo de restricción del plásmido presente en las transformantes lácticas. Aparentemente las enzimas Cia I y Hind III, que tienen sus sitios de corte dentro del gen, no cortaron y las enzimas que tienen sus sitios en el plásmido sí lo hicieron, pero la interferencia del cromosoma es tan grande que no es posible determinar confiablemente el tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos, por lo que se decidió retransformar este plásmido (el pLZ12-amy obtenido de *L. lactis*) en

00

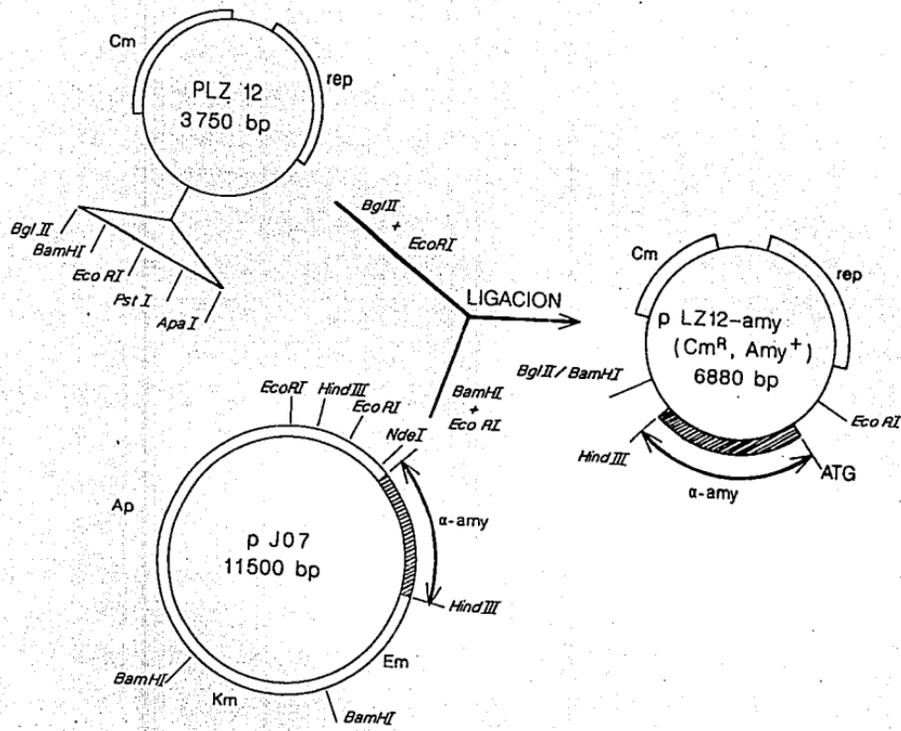


Figura 2. Construcción del plásmido pLZ 12 -amy

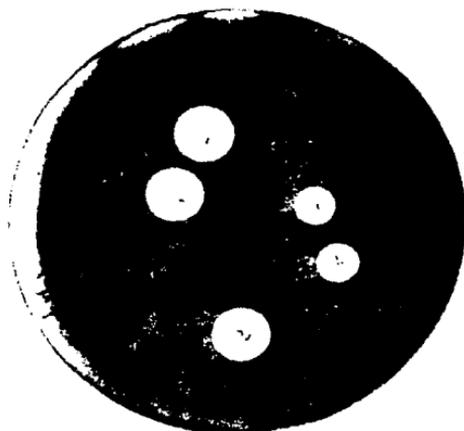


Figura 3. Actividad amilolítica observada en *E. coli* LE392 transformada con el plásmido pLZ12-amy.

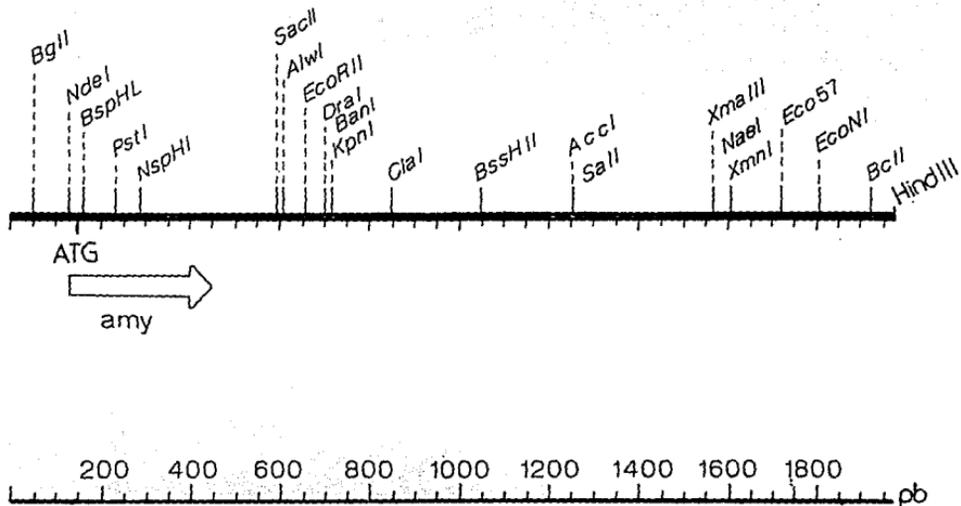


Figura 4. Mapa de restriccion del gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*.

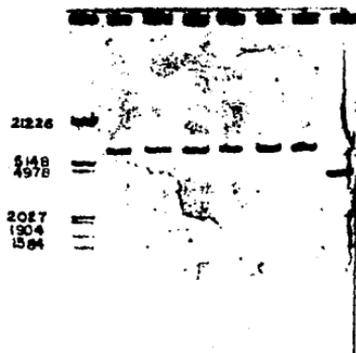


Figura 5. Digestión del plásmido pLZ12-amy obtenido de las transformantes de *E. coli* que mostraron actividad en placa. C₁ Lambda Eco RI / Hind III. C₂ pLZ12-amy / Eco RI. C₃ pLZ12-amy / Nco I. C₄ pLZ12-amy / Apa I. C₅ pLZ12-amy / Cla I. C₆ pLZ12-amy / Nde I. C₇ pLZ12-amy / Hind III. C₈ pLZ12 / Eco RI.

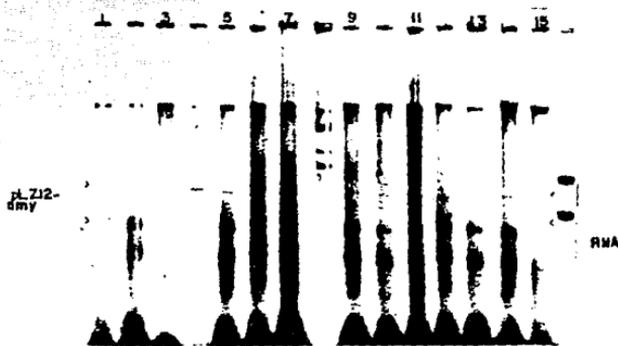


Figura 6. Análisis de los plásmidos obtenidos de *L. lactis* después de su transformación con el plásmido pLZ12-amy. C₁ - 7 *L. lactis* MG1363 / pLZ12-amy. C₈ pLZ12-amy (control). C₉ - 15 *L. lactis* IL1403 / pLZ12-amy. C₁₀ pLZ12 (control). Las bandas del plásmido se señalan, las otras dos bandas visibles son de RNA.

E. coli (DK1 y LE392) ninguna de las nuevas transformantes mostró actividad. Se realizó nuevamente un mapeo de restricción con tres enzimas: Nco I, que corta en el plásmido; Sal I, cuya secuencia de reconocimiento se encontraba en dos sitios, uno en el plásmido y otro en el gen de alfa-amilasa y Cla I que corta justo a la mitad el gen.

En la figura 7 se puede observar que en todos los casos, el pLZ12-amy obtenido de ambas cepas de *E. coli*, independientemente de que se les haya metido plásmido de *L. lactis* MG1363 o de *L. lactis* IL1403, muestran el mismo patrón. También se puede observar que las tres enzimas probadas cortan, independientemente de que se esperaba que los sitios que se encontraban dentro del gen de alfa-amilasa no fueran encontrados, ya que no se vio actividad ni en *L. lactis* ni en *E. coli* cuando ésta última fue transformada con el plásmido obtenido de *L. lactis*.

Para identificar qué partes del vector construido habían sido eliminadas fue necesario hacer doble transferencia del gel a filtros de nylon e hibridar con ³²P dCTP, utilizando como sondas el fragmento Pst I / Hind III del gen de alfa-amilasa y el plásmido. Las hibridaciones se muestran en la figura 8. El plásmido pLZ12, hibridó con el DNA de todas las transformantes, en cambio el gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis* solo lo hizo con los controles positivos (el pLZ12-amy originalmente obtenido de *E. coli*), lo que nos indicaba que el gen completo había sido eliminado del vector.

Buscando la causa para explicar la eliminación del gen, se vio si existían sitios de homología entre el cromosoma de *L. lactis* y el plásmido construido. Se hicieron hibridar por un lado el DNA del plásmido y por otro el gen de alfa-amilasa contra el cromosoma de las dos cepas utilizadas de *L. lactis*. La figura 9 muestra los resultados obtenidos con la cepa IL1403 y la figura 10 con la MG1363. En las figuras se puede ver que se incluyeron el cromosoma de la cepa silvestre, el cromosoma de las células transformadas únicamente con agua, y el cromosoma de las células transformadas con la construcción, todo esto para ver si había cambios en los perfiles cromosómicos, lo cual había sido observado en algunas bacterias del género *Lactobacillus* y ser esto una posible causa de la delección. Los cambios en los perfiles no se observaron en los gels así como tampoco se encontró homología entre el cromosoma y las dos sondas probadas.

En la figura 9 se incluyeron además los resultados obtenidos de la digestión con las enzimas Taq I, Sal I y Nco I del plásmido obtenido de *L. lactis* y retransformado en *E. coli*. Ya se sabía que los sitios Cla I, Sal I y Nco I cortaban lo que no se sabía era si solamente encontrábamos un sitio o más, Taq I se escogió porque aparte de ser isoesquizómero de Cla I, tenía dos sitios de corte en el plásmido, mismos que se encontraban en el replicón; Sal I tiene un sitio en el vector y otro en el gen de alfa-amilasa y Nco I tiene su sitio de corte en el gen de clorafenicol. Los cortes observados permitieron tener un mapa de restricción del plásmido resultante. Los eventos sucedidos se resumen en la figura 11.

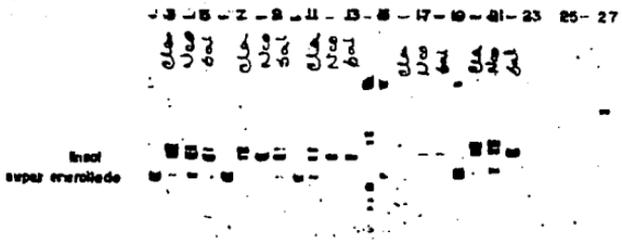
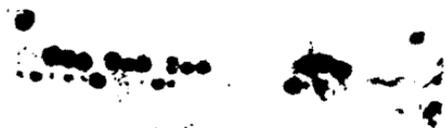


Figura 7. Análisis y digestión del plásmido pLZ12-amy obtenido de *L. lactis* IL1403 y MG1363 y retransformado en *E. coli* cepas LE392 y DK1. C₁ pLZ12-amy / Cla I. C₂ *IL1403 / pLZ12-amy / DK1 (IL1) C₃ IL1 / Cla I. C₄ IL1 / Nco I. C₅ IL1 / Sal I. C₆ IL1403 / pLZ12-amy / LE392 (IL2) C₇ IL2 / Cla I. C₈ IL2 / Nco I. C₉ IL2 / Sal I. C₁₀ IL1403 / pLZ12-amy / LE392 (IL3) C₁₁ IL3 / Cla I. C₁₂ IL3 / Nco I. C₁₃ IL3 / Sal I. C₁₄ Lambda Eco RI / Hind III. C₁₅ MG1363 / pLZ12-amy / DK1 (MG1). C₁₆ MG1 / Cla I. C₁₇ MG1 / Nco I. C₁₈ MG1 / Sal I. C₁₉ MG1363 / pLZ12-amy / LE392 (MG2) C₂₀ MG2 / Cla C₂₁ MG2 / Nco I. C₂₂ MG2 / Sal I. C₂₃ MG1363 / pLZ12-amy / LE392 (MG3) C₂₄ MG3 / Cla I. C₂₅ MG3 / Nco I. C₂₆ MG3 / Sal I. C₂₇ pLZ12-amy / Eco RI (control).

* IL1403 / pLZ12-amy / DK1 = El plásmido fué obtenido de *L. lactis* IL1403 y retransformado en *E. coli* DK1.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27



1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27



Figura 8. Hibridación southern del DNA de los plásmidos mostrado en la figura 7 con las siguientes sondas:
a) pLZ12
b) fragmento Pst I / Hind III del gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis*.

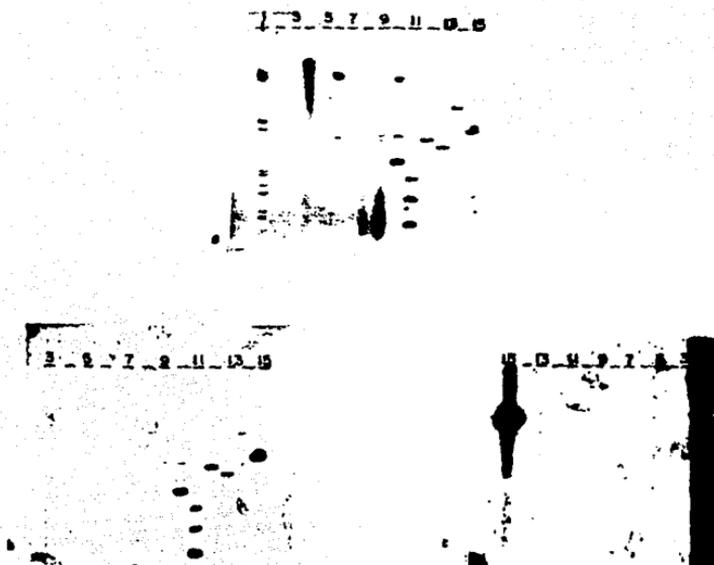


Figura 9. Hibridación southern con el cromosoma de *L. lactis* IL1403 transformado y sin transformar con el plásmido pLZ12-amy. Digestión del plásmido obtenido con diferentes enzimas de restricción.

a) Gel para hibridar. C₁ Lambda Eco RI / Hind III. C₄ IL1403 Cromosoma. C₅ IL1403 Cromosoma / Eco RI. C₆ IL1403 Cromosoma (células electroporadas solo con agua). C₇ IL1403 Cromosoma (células electroporadas con agua) / Eco RI. C₈ IL1403 / pLZ12-amy Cromosoma. C₉ IL1403 / pLZ12-amy Cromosoma / Eco RI. C₁₀ IL1403 / pLZ12-amy retransformado a *E. coli*. C₁₁ Digestión del pLZ12-amy retransformado a *E. coli* con Taq I. C₁₂ Digestión con Sal I. C₁₃ Digestión con Nco I. C₁₄ pLZ12-amy control / Eco RI. C₁₅ pLZ12 / Eco RI.

b) Hibridación contra el vector pLZ12.

c) Hibridación contra el fragmento Pst I / Hind III del gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis*.

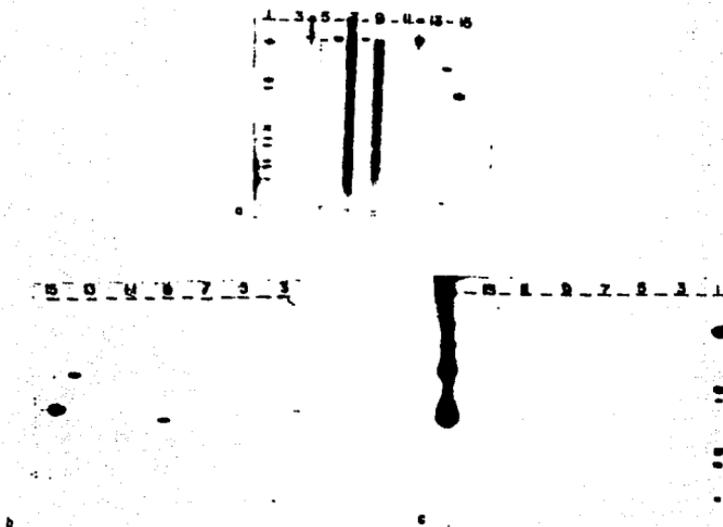


Figura 10. Hibridación southern del vector pLZ12 y el gen de alfa amilasa con el cromosoma de *L. lactis* MG1363.

a) Gel para hibridar. C₁ Lambda Eco RI / Hind III. C₃ MG1363 Cromosoma. C₄ MG1363 Cromosoma / Eco RI. C₅ MG1363 cromosoma (células electroporadas solo con agua). C₆ MG1363 cromosoma (células electroporadas con agua) / Eco RI. C₇ MG1363 / pLZ12-amy cromosoma (obtención a las 24 horas de transformado) C₈ MG1363 / pLZ12-amy cromosoma / Eco RI. C₉ MG1363 / pLZ12-amy (plásmido). C₁₀ MG1363 / pLZ12-amy cromosoma (obtención a las 48 hrs de transformado). C₁₁ MG1363 / pLZ12-amy cromosoma (obtención a las 72 hrs de transformado) C₁₂ MG1363 / pLZ12-amy cromosoma (72 hrs) Eco RI. C₁₄ pLZ12 -amy / Eco RI (control). C₁₅ pLZ12 / Eco RI (control).

b) Hibridación contra el vector pLZ12.

c) Hibridación contra el gen de alfa-amilasa.

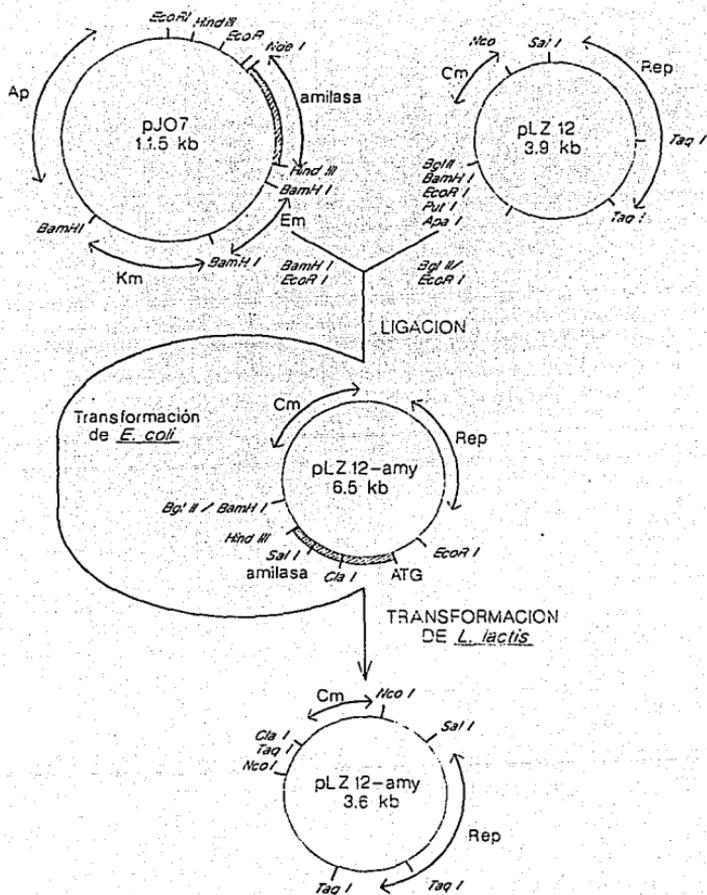


Fig. 11. Resumen de los eventos sucedidos en el plásmido pLZ12-amy desde su construcción hasta su transformación a *L. lactis*.

La construcción fué estructuralmente inestable en *L. lactis* ya que el gen de alfa-amilasa fué eliminado del vector. Además se identifica un sitio Cla I, que no se encontraba originalmente en el vector y un sitio adicional Nco I, justo en la zona de delección del gen de alfa-amilasa por lo que parece que fueron formados en el plásmido al ser este modificado por la bacteria.

pMG36_e

Después de lo observado con el pLZ12, se decidió utilizar el plásmido pMG36_e, el cual, además de tener un origen de replicación diferente (pWV01) al pLZ12, incluye las señales de un promotor y un terminador lactococal.

El pMG36_e es un vector que se presenta en bajo número de copias en *L. lactis* y que además es difícil de purificar, sobre todo en grandes cantidades (como se mencionó en materiales y métodos en la extracción siempre se arrastra DNA cromosomal, razón por la cual se probaron tres diferentes técnicas de purificación, óptandose por la de O'Sullivan & Klaenhammer (1993), pero nunca se eliminó dicha contaminación completamente, por lo que para su purificación se transformó a *E. coli*, aún cuando se sabía que la eritromicina (el marcador del plásmido) no es un antibiótico que pueda ser usado para aislar transformantes en microorganismos Gram (-).

Usando eritromicina a una concentración de 500 µg/ml fue posible aislar transformantes de *E. coli* que mantuvieran el plásmido de manera estable y se pudo de esta manera obtener el suficiente DNA para realizar las construcciones.

Dos diferentes estrategias se utilizaron para la inserción del gen de alfa-amilasa en el vector, ambas se ilustran en la figura 12. En la primera el gen es obtenido en el fragmento Eco RI / Hind III del pUC-amy (el gen lleva su promotor) y es ligado al fragmento Eco RI / Hind III del pMG36_e (con este corte se elimina el promotor lactococal).

En la segunda construcción, el fragmento Nde I / Hind III del pUC-amy es insertado (después de un tratamiento con Mung Bean Nucleasa en el extremo Nde I) en el sitio Sma I / Hind III del pMG36_e. En este caso el gen de alfa-amilasa ha sido privado de sus secuencias promotoras originales -10 y -35 y se espera use el promotor lactococal que incluye el vector.

En ambas construcciones la secuencia del péptido líder del gen de alfa-amilasa se mantiene intacta.

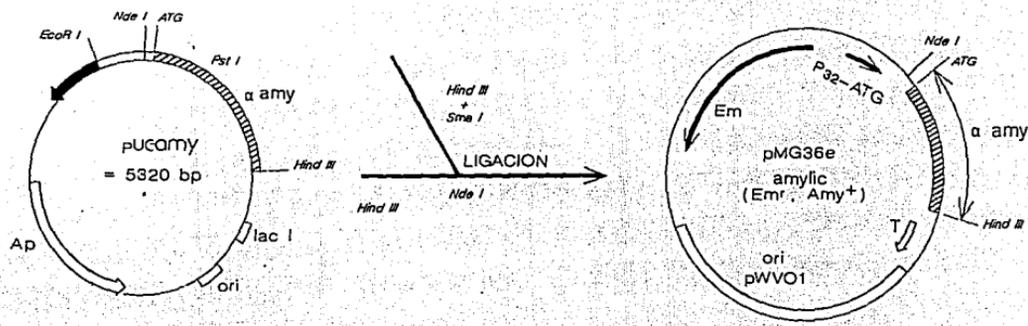
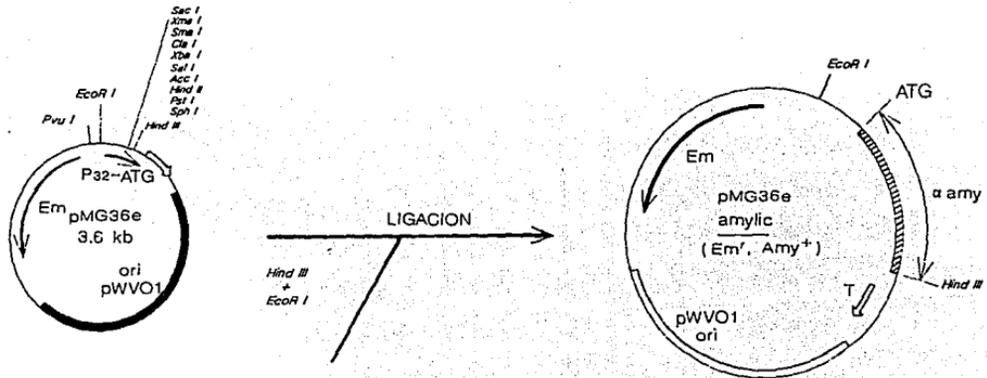


Figura 12. Construcciones realizadas con el plásmido pMG36_e y el gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*.

1) pMG36_e - amy. Construcción con el promotor del gen de alfa-amilasa.

E. coli LE392 y *E. coli* DK1 fueron transformadas con dos ligaciones diferentes de la construcción Eco RI / Hind III, en dos experimentos aislados. En DK1 no se pudo aislar ninguna transformante, en cambio en la cepa LE392 se aislaron 500 UFC / μ g de DNA de ligación / ml de células, de las que prácticamente todas tenían actividad (Fig. 13-a), la cual perdían fácilmente a la resiembra (Fig 13-b)). Aproximadamente el 45% de las células perdió la actividad en la primera resiembra y el 55% restante lo perdió en la segunda.

Durante la extracción de plásmido de las transformantes no se pudo observar el vector en las células a pesar de que se partía de la misma colonia que mostraba actividad en caja. Pensando en que el método de extracción no estuviera funcionando se realizó extracción de DNA total, y se encontró que el 50% de las transformantes tenían el plásmido, pero sin inserto y el otro 50% lo había perdido totalmente.

El hecho de que las transformantes presentaran actividad amilolítica, aseguraba la eficiencia de la ligación y de su transformación, sin embargo, todos los plásmidos que se vieron no tenían inserto, por lo que se cree que la construcción pudo ser sometida a delección.

Se decidió entonces transformar la ligación directamente a *L. lactis* MG1363 e IL1403 en tres experimentos diferentes. Se obtuvieron 60 transformantes / μ g de ligación / ml de células en la cepa MG1363 y 100 transformantes / μ g de ligación / ml de células en la cepa IL1403. Todas fueron analizadas, ninguna mostró actividad y sólo en una se encontró un plásmido de mayor tamaño que el pMG36_e (también en *Lactococcus* fue necesario hacer extracción de DNA total para poder ver el plásmido).

La única transformante que fue diferente mostraba un plásmido más grande, que podía corresponder al vector con inserto. Se linealizó el plásmido con dos enzimas de restricción: Eco RI que cortaba en el sitio en el que había sido insertado el gen y Cla I que tenía su sitio de corte en el gen de alfa-amilasa (fig 14). Ambas enzimas cortaron lo que parecía indicar que tenía el gen, sin embargo, no se vio expresión de la alfa-amilasa. El plásmido resultante medía aproximadamente 8.8 Kb, muy grande para lo esperado que era de 5.8 kb, pero cuando fue resembrada la colonia para completar el análisis, del vector se perdió el inserto y el plásmido quedó del mismo tamaño que el pMG36_e.

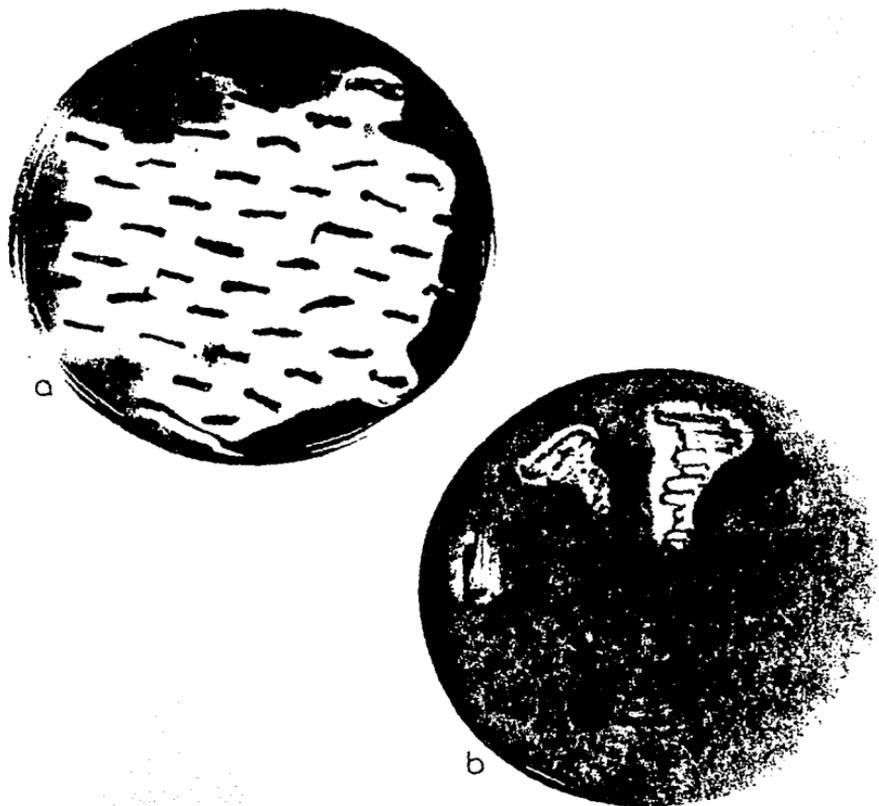


Figura 13. Actividad amilolítica observada en *E. coli* LE392 transformada con el plásmido pMG36_e-amy construcción Eco RI / Hind.III.

- a) Primera siembra.
- b) Resiembra de las colonias amilolíticas, en donde se observan colonias que han perdido la actividad.

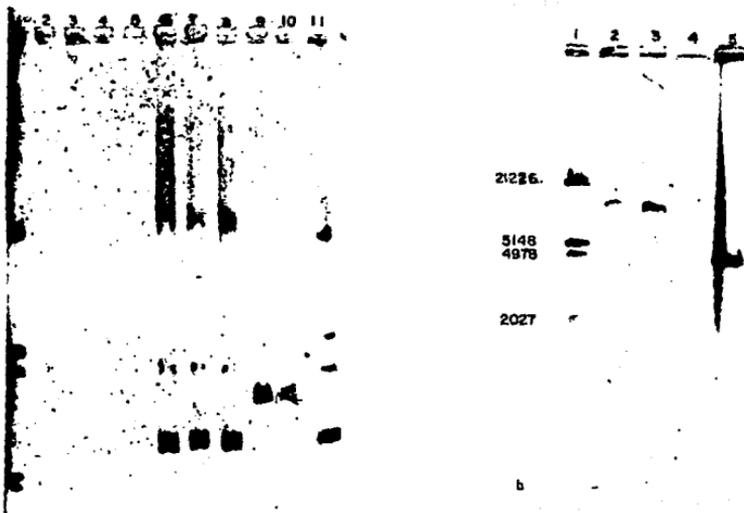


Figura 14. Análisis del DNA plasmídico de algunas de las transformantes de *L. lactis* obtenidas de la electroporación de la ligación pMG36_e-amy construcción Eco RI / Hind III.

a) C1) Lambda Eco RI / Hind III. C2 - C10) DNA plasmídico de *L. lactis* IL1403 transformadas con pMG36_e-amy (El carril 9 muestra un plásmido mayor en tamaño). C11) pMG36_e.

b) C1) Lambda Eco RI / Hind III. C2) pMG36_e- amy obtenido de la transformante que se muestra en a) C9 digerido con Cla I. C3) pMG36_e - amy a) C9 digerido con Eco RI. C5) pMG36_e / Eco RI (control).

Se evaluó la estructura del plásmido de la misma manera que en el caso anterior, por hibridación y se encontró que todas las transformantes hibridaron perfectamente con el vector, pero ninguna lo hizo con el gen de alfa-amilasa (Fig. 15). El vector a pesar de ser diferente había sido sometido a la defeción del inserto del mismo modo que en el caso anterior. También se puede observar que el plásmido no se encuentra en muchas de las transformantes de *E. coli* aisladas de los medios con eritromicina, por el contrario si se encuentra en todas las transformantes de *L. lactis* aisladas.

2) pMG36_α-amy. Construcción con el promotor lactococal del vector

La construcción fué transformada con dos ligaciones diferentes de la construcción Sma I / Hind III en *E. coli* cepas LE392 y DK1. La eficiencia de transformación en la cepa LE392 fué muy semejante a la obtenida con la construcción anterior y de igual manera prácticamente todas las transformantes mostraron actividad (Fig. 16-a) que perdieron en un 60% en la primera resiembra y completamente en la segunda (Fig 16 - b). Con la cepa DK1 únicamente se obtuvieron 12 transformantes (Fig. 17), todas con actividad amilolítica, pero también todas perdieron la actividad a la resiembra.

La extracción de DNA plasmídico no funcionó para identificar al vector, por lo que nuevamente se intentó extrayendo DNA total, con lo que se pudo identificar el plásmido en las transformantes que correspondía al pMG36_α sin inserto y éste se presentaba de la misma manera en ambas cepas.

Por otra parte, la ligación fué directamente transformada a la bacteria láctica en 5 experimentos diferentes, de los que se obtuvieron en total 500 transformantes. En estas transformantes solo se encontró el vector sin inserto, utilizando la extracción de DNA total, porque con la extracción de plásmido no se veía nada. Sin embargo, hubo dos transformantes de la cepa MG1363 que mostraron actividad (fig 18). Pensando en que el plásmido fuera segregado se les extrajo DNA total y DNA plasmídico a partir de la primera colonia que apareció después de la transformación y la resiembra a las 48 hrs (fué hasta este tiempo porque el crecimiento de la transformante era lento en comparación de la cepa sin transformar). Como en estas preparaciones no se veía el vector en ninguna de las extracciones, ni de plásmido, ni de cromosoma, el DNA se hibridó contra el plásmido y contra el gen. *E. coli* hibridó con el plásmido únicamente, mientras que las colonias que mostraron actividad amilolítica de *L. lactis* hibridaron tanto con el plásmido como con el gen. En la figura 19 se puede ver que la hibridación es muy marcada con el cromosoma y en el caso de la primera transformante en el carril 11 de las dos hibridaciones se distingue tenuemente el plásmido que por el tamaño estimado corresponde al vector con el gen de alfa-amilasa, por lo difícil que es ver el vector, es muy probable que el número de copias se haya reducido todavía más y probablemente se este purificando junto al DNA del cromosoma y por eso está hibridando con él.

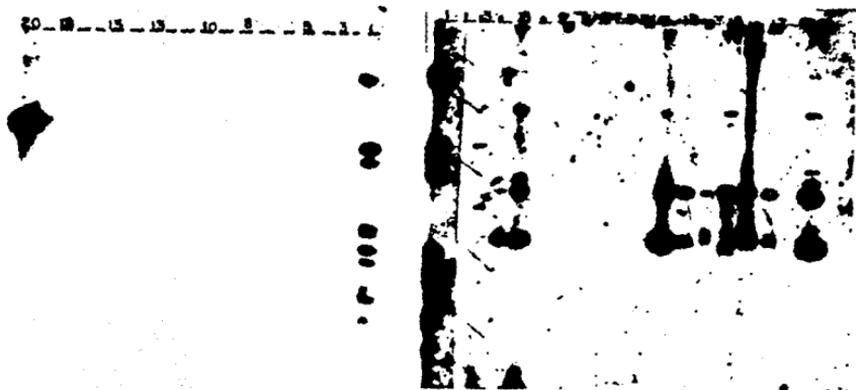


Figura 15. Hibridación southern del DNA de las transformantes obtenidas con el plásmido pMG36e-amy en *E. coli* LE392 y *L. lactis* IL1403 y MG1363.

a) Hibridación con el gen de alfa-amilasa

b) Hibridación con el vector de clonación (pMG36e).

C1) Lambda Eco RI / Hind III, C3 - C9) *E. coli* LE392 - pMG36e, C10 - C12) *L. lactis* MG1363 - pMG36e, C13 - C18) *L. lactis* IL1403 - pMG36e (en el carril 13 se encuentra la transformante que en la figura anterior se observaba de mayor tamaño), C19) pMG36e, C20) pUC-amy.

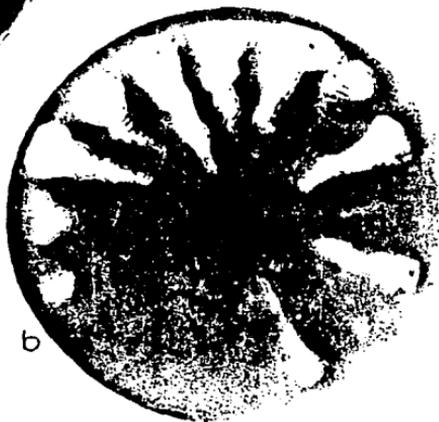
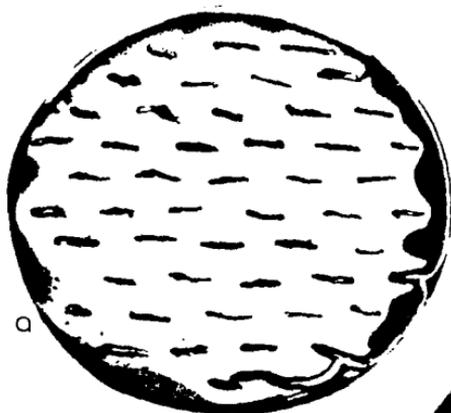


Figura 16. Actividad amilolítica observada en *E. coli* LE392 transformada con el plásmido pMG36_E - amy construcción Sma I / Hind III.

a) Primera siembra

b) Resiembra de las colonias amilolíticas, en donde se observan colonias que han perdido la actividad.



Figura 17. Actividad amilolítica observada en *E. coli* DK1 transformada con el plásmido pMG36_a - amy construcción Sma I / Hind III.

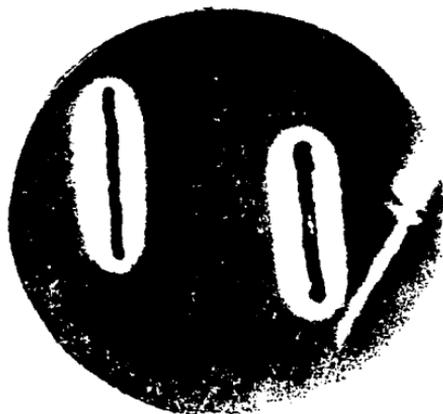


Figura 18. Actividad amilolítica mostrada por *L. lactis* MG1363 transformada con la construcción pMG36_g - amy Sma I / Hind III.



Figura 19. Hibridación southern del DNA de las transformantes obtenidas con la construcción pMG36_e - amy construcción Sma I / Hind III de *E. coli* LE392 y DK1 y *L. lactis* MG1363 e IL1403 con:

- a) El gen de alfa-amilasa
- b) El vector de clonación (pMG36_e)

C1) Lambda Eco RI / Hind III, C3) *E. coli* DK1 - pMG36_e-amy. DNA total (a partir de la primera colonia que creció en el medio selectivo para transformantes). C4 y C5) Misma transformante, extracción de plásmido a las 24 y 48 hrs. C6 y C7) *E. coli* LE392 - pMG36_e-amy DNA total y plasmídico (primera colonia que creció en el medio selectivo para transformantes), C8 *L. lactis* MG1363 - pMG36_e-amy (transformante con actividad 1, preparación de DNA total a partir de la colonia observada en la figura 18), C9) *L. lactis* MG1363 - pMG36_e-amy (transformante con actividad 2, preparación de DNA total a partir de la segunda colonia mostrada en la figura 18), C10) *L. lactis* MG1363 - pMG36_e-amy 1. DNA total (resiembrado), C11) DNA plasmídico de la transformante anterior, C12) *L. lactis* MG1363 - pMG36_e-amy 2. DNA total (resiembrado), C13) DNA plasmídico de la transformante anterior, C14 y C15) *L. lactis* IL1403 - pMG36_e-amy 1, extracción de DNA total y plasmídico, C16 y C17) *L. lactis* IL1403 - pMG36_e-amy 2, extracción de DNA total y plasmídico, C19) pMG36_e, C20) pUC-amy.

Se resembraron nuevamente estas bacterias en el medio de selección pero privandolas completamente de glucosa, esperando presionar o seleccionar a la que utilizara el almidón, aún cuando se sabía que por lo rico del medio podían no hacerlo. La prueba de actividad resultó negativa y en las extracciones de DNA (cromosomal y plásmidico) no se alcanza a distinguir el vector, lo cual no sorprende porque en las bacterias que presentaron actividad tampoco se encontró. Se hibridó nuevamente contra el gen de alfa amilasa y el vector, porque al resultar negativa la prueba, era muy posible que el gen de la amilasa hubiera sido eliminado o modificado. La figura 20 muestra las hibridaciones, en las que podemos observar en los carriles 4 y 6 nuevamente la hibridación del plásmido con el cromosoma y que el gen de alfa amilasa ya no lo hace más que con su control positivo. Es importante aclarar que en ninguno de los casos de hibridación contra el vector éste lo ha hecho con el control negativo, que es el cromosoma de la bacteria sin transformar.

Se intentó retransformar el DNA obtenido, tanto en *E. coli* como en *L. lactis*, sin éxito. Este hecho, aunado a la hibridación que se dió con el cromosoma, nos hace pensar que el plásmido se integró o, en su defecto, se encuentra interactuando de manera muy estrecha con el cromosoma. Se hibridó el mismo DNA, por un lado con el gen que codifica la resistencia a eritromicina y por el otro con el replicón del vector. Tal como se observa en la figura 21 la hibridación se dió únicamente con el gen de eritromicina al nivel del cromosoma, indicando una posible integración (fig. 21).

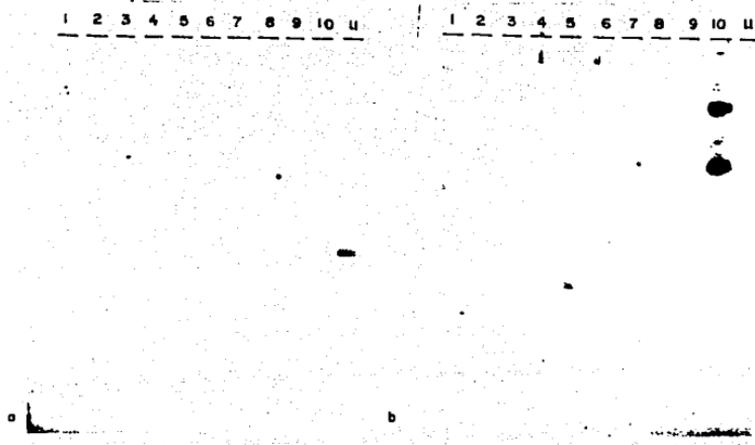


Figura 20. Hibridación southern del DNA de las transformantes de *L. lactis* MG1363 - pMG36_e-amy 1 y 2 a partir de DNA obtenido de las colonias sembradas por tercera vez.

- a) Hibridación con el gen de alfa amilasa
- b) Hibridación con el vector (pMG36_e)

C1) Lambda Eco RI / Hind III, C4 y C5) *L. lactis* MG1363 - pMG36_e-amy 1. DNA total y plasmídico, C6 y C7) *L. lactis* MG1363 - pMG36_e-amy 2. DNA total y plasmídico, C8) *L. lactis* MG1363 (DNA total) C10) pMG36_e C11) fragmento Pst I / Hind III del gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis*.



Figura 21. Hibridación southern del DNA de las transformantes de *L. lactis* MG1363 - pMG36_e 1 y 2 a partir de las colonias resemebradas.

a) Hibridación con el gen de eritromicina.

b) Hibridación con el origen de replicación del pMG36_e.

C1) pMG36_e. C3) *L. lactis* MG1363 (DNA total). C4 y C5) *L. lactis* MG1363 - pMG36_e-amy 1. DNA plasmídico y total. C6 y C7) *L. lactis* MG1363 - pMG36_e-amy 2. DNA plasmídico y total. C11) Lambda Eco RI / Hind III.

DISCUSION

Aún cuando ya existen protocolos reportados para la transformación de bacterias lácticas por electroporación, muchas veces la eficiencia de estos es variable y dependiente de la cepa.

Se estableció un método para transformar *Lactococcus lactis* por electroporación, método que nos permite obtener frecuencias de 10^3 - 10^4 transformantes / μg de DNA, para todos los vectores probados y sin problemas de repetibilidad al menos en el caso de las dos cepas utilizadas. Otros autores han reportado eficiencias semejantes: Aymerich, *et al.*, (1993) obtuvo de 10^2 - 10^5 transformantes / μg de DNA, con el plásmido pNZ12, en diferentes especies de *Lactobacillus*; Marciset & Mollet (1994) entre 10^2 y 10^5 con el mismo plásmido, en diferentes cepas de *Streptococcus thermophilus*; Chassy & Flickinger (1987) de 10^3 a 10^4 con el mismo plásmido en *L. casei* y Wells *et al.* (1993a) consigue una eficiencia de transformación de 10^7 con un plásmido diseñado por ellos mismos (pMIG) en *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. No hay reportes que nos indiquen las eficiencias de transformación observadas con los plásmidos que se usaron en este trabajo, pero comparando con los trabajos anteriores, se tienen eficiencias adecuadas para una bacteria láctica.

Varios autores (Aukrust & Nes, 1988; Badil, *et al.*, 1989; Gaier, *et al.*, 1990) encontraron que la electroporación en buffer de fosfatos producía el mayor número de transformantes, mientras que Luchansky *et al.*, (1989) obtiene altas eficiencias en Buffer HEPES. Ambos medios fueron probados en la transformación de *L. lactis* spp *lactis* con poco éxito, por lo que se decidió probar un medio con menor fuerza iónica, como el agua desionizada, la cual ya había sido utilizada con éxito en *E. coli*. En este medio se obtuvo la mayor eficiencia de transformación, probablemente porque al disminuir la conductividad del medio fue posible aumentar la resistencia del circuito y por lo tanto tener mayores constantes de tiempo (Ver Apéndice). Antonov *et al.*, (1993) encuentran también que los medios hipotónicos aumentan la eficiencia de la transformación de *E. coli*, concluyendo que el proceso de transformación depende de la fuerza osmótica del medio.

Todo esto nos indica que es importante evaluar diferentes medios de electroporación cuando se trabaja con diferentes especies o cepas bacterianas. Aparentemente, el buffer utilizado para lavar y resuspender las células que van a ser transformadas es uno de los parámetros más importantes.

Se había reportado que el número total de transformantes obtenidas era directamente proporcional a la cantidad de DNA añadido, desde 1 hasta 250 ng, de acuerdo con Wells *et al.*, (1993) y desde 10 ng hasta 1 µg según Holo & Ness (1989) y McIntyre & Harlander (1989); por lo que se usaron en la transformación las concentraciones de DNA más altas posibles (100 y 300 ng). Los resultados no muestran el efecto reportado, que tal vez sea visible cuando se trabajan con solo dos cantidades menores de DNA. Por otro lado no pudieron ser usadas concentraciones superiores de plásmido, por que se provocaba un arco eléctrico sobre la cubeta de electroporación que impedía la transformación de las células.

Powell *et al.*, (1988) mencionaban que la pared celular podía ser una barrera importante para la entrada de DNA por electroporación; este problema lo solucionaron al hacer crecer las células en un medio con debilitadores de pared como lisozima, treonina y/o glicina.

Wells, *et al.*, (1993) obtienen en *L. lactis* eficiencias de transformación del orden de 10^7 UFC / µg DNA, haciendo crecer las células en glicina al 2.5% p / v. Esta concentración de glicina resultó inhibitoria para el crecimiento de nuestras cepas por lo que se probaron concentraciones menores de dicho aminoácido además de treonina, tratando de encontrar un balance entre el debilitamiento de la pared que permitiera la entrada de DNA sin aumentar la fragilidad osmótica de las células (lo que aparentemente causaba la glicina). Se consideró que este punto se consiguió con la treonina 20 mM, ya que no afectaba la viabilidad de las células y si aumentaba el número de células transformantes.

No solo los factores aquí investigados influyen en la eficiencia de la electroporación, hay muchos otros que pueden ser estudiados y que en el presente trabajo fueron designados de acuerdo a lo que otros autores habían descrito, como edad del cultivo en el momento de la transformación (siempre se tomaron las células en la fase exponencial del crecimiento, entre 0.4 y 0.6 de D. O.); temperatura de la muestra antes, durante y después del shock eléctrico; diferentes voltajes, etc.

Por lo observado en los resultados son factores determinantes en el éxito de la transformación la pureza del vector, para evitar un arco eléctrico; el ser muy estricto al lavar las células; el medio de electroporación y el uso de debilitadores de pared.

Después de establecidas las condiciones de electroporación se realizó la primera construcción para la clonación del gen de alfa-amilasa con el vector pLZ12.

Esta construcción fue transformada y expresada en *E. coli*. El DNA plasmídico de éstas transformantes fué, después de purificado, electroporado en *L. lactis* con las condiciones descritas en materiales y métodos.

Durante la transformación o en etapas tempranas del cultivo de las transformantes, el plásmido pLZ12-amy fué sometido a delección por las dos cepas de *L. lactis* utilizadas, independientemente de que estas cepas carecieran de sistemas de restricción y modificación de acuerdo a lo descrito por Chopin, *et al.*, (1984) y sin que el plásmido tuviera secuencias homólogas al DNA cromosomal.

Si la delección ocurrió en etapas inmediatas a la electroporación, probablemente una fracción pequeña de las células tomadas de la primera caja de selección llevaban la delección. Después de la resiembra esta fracción pudo ser dominante, al tener la ventaja de tiempos generacionales menores.

Ciertamente el fenómeno de delección en plásmidos lactococales debe ser más amplio de lo que se documenta en la literatura. Únicamente existen dos reportes en los que se menciona: En el primero la lisozima del fago lambda no pudo ser mantenida en el pMG36_e por *L. lactis* IL1403 (van de Guchte, *et al.*, 1992a); en el segundo caso el plásmido pGKV210 con el gen de lisostafina de *B. subtilis* fué recortado por *Lb. casei* y *Lb. curvatus* (Gaier, *et al.*, 1992). En ninguno de los casos se investigaron las causas del fenómeno, solo se anota que sucedió.

La delección de DNA insertado en plásmido es un fenómeno que ha sido observado desde los 70's en diferentes cepas de *Streptococcus sanguis* (Behnke, *et al.*, 1979; Le Blanc & Hassell, 1976) y posteriormente en *Bacillus subtilis*, siendo en este último donde mayor cantidad de estudios se han realizado.

Muchos de los plásmidos utilizados en los experimentos de clonación en *B. subtilis*, así como los usados en *L. lactis* generan durante su replicación por círculo rodante intermediarios de hebra simple. La conversión eficiente de estos intermediarios de hebra simple a plásmidos de doble cadena requiere de un origen de replicación menor que permita la polimerización de la segunda cadena. Cuando no se tiene un origen de replicación funcional se acumula DNA de hebra simple y se ha sugerido que es éste el principal causante de la inestabilidad, tanto segregacional como estructural. En particular, es muy frecuente observar delecciones entre pequeñas secuencias repetidas o invertidas (3-20 pb) que se pueden encontrar en gran número dentro de los plásmidos (Bron, *et al.*, 1991) dichas secuencias ven su presencia engrandecida al tener durante la replicación una etapa en hebra simple, ya que esto permite la formación de estructuras secundarias inestables.

En *L. lactis* no se tiene evidencia de ninguno de estos fenómenos, lo que si se sabe es que los plásmidos pSH71 y pWV01 (cuyos replicones se utilizaron en la construcción de los vectores pLZ12 y el pMG36_e respectivamente) se replican por círculo rodante

generando intermediarios de hebra simple y multimeros lineales de alto peso molecular, que podrían tener el mismo comportamiento que dichos intermediarios en *B. subtilis*. También se observó que la presencia del inserto volvió al plásmido indetectable o prácticamente indetectable en geles de agarosa, quizá por disminución del número de copias del plásmido, otro fenómeno que ya había sido documentado en *B. subtilis* (Grus & Erlich, 1988) y en *L. lactis* (Kiewiet, et al., 1993). Sin embargo, el retransformar este plásmido a *E. coli* el número de copias se mantuvo, lo que nos indica que en el fenómeno se conjunta el vector, el inserto y el receptor, no es algo restringido al vector en sí mismo.

Es importante señalar que los modelos establecidos para *B. subtilis* deben ser tomados con reserva en cuanto su aplicación a *L. lactis* porque *B. subtilis* desarrolla competencia natural, lo que implica que toma el DNA del medio en moléculas lineales, mientras que la transformación de las bacterias lácticas es por electroporación, lo que supone que el plásmido entraría superenrollado o en moléculas circulares.

En la segunda construcción, en la que se utilizó el pMG36_g observamos una situación diferente:

- 1) La primera construcción, con el fragmento Eco RI / Hind III del pUC-amy ligada a los mismos sitios del pMG36_g, resultó inestable, tanto en *E. coli* como en *L. lactis*. En *E. coli* se pudo ver expresión del gen de alfa-amilasa y la resistencia a eritromicina, mientras que en *L. lactis* solo se obtuvo la resistencia y se confirmó la presencia del plásmido pero sin inserto.
- 2) La segunda construcción incluyó un promotor y un terminador lactococal, sustituyendo al promotor del gen de alfa amilasa de *B. licheniformis*.

Esta construcción fue transformada directamente a *L. lactis*, sin ser verificada en *E. coli* porque en esta bacteria fue inestable. De aproximadamente 500 transformantes, se obtuvieron dos con actividad amilolítica. En ninguna de las dos transformantes se detectó el plásmido recombinante en geles de agarosa, pero sí fue detectado al hibridar contra el gen de amilasa y contra el vector. Por las técnicas convencionales no es posible separar, al menos completamente, el plásmido del cromosoma y puede ser esta la razón por la que el cromosoma también hibrida con las dos sondas usadas.

Se resembraron las transformantes con actividad amilolítica y como consecuencia perdieron la actividad; se pueden considerar dos factores determinantes: la expresión de la amilasa pudo causar la muerte de las células recombinantes, al ser la producción de esta enzima una exigencia metabólica muy grande, de tal modo que a la resembrada las únicas células que quedaban vivas eran aquellas bacterias que recortaron el plásmido.

En geles de agarosa nuevamente no se detectó el DNA plasmídico de las transformantes resembradas y el extracto obtenido no transformó ni a *E. coli* ni a *L. lactis*, ni para la resistencia a eritromicina, ni para la actividad de alfa-amilasa, a pesar de que las transformantes conservaban al menos la resistencia al antibiótico; por lo que, se decidió hibridar contra el gen de alfa-amilasa, para ver si había sido eliminado o solo modificado; contra el gen de eritromicina y contra el origen de replicación del vector. Únicamente se obtuvo respuesta positiva con el gen de eritromicina y esta fué dada al nivel del cromosoma, lo que sugiere que el gen fué integrado.

La transferencia del gen marcador de un plásmido al cromosoma involucraría un sistema de recombinación y una región de homología. La región de homología puede estar dada por el promotor lactococal del plásmido, que es de alrededor de 200 pares de bases, longitud suficiente para que haya recombinación en *E. coli recA+* (King & Richardson, 1986) y en *B. subtilis recE+* (Khasanov, *et al.*, 1992), en *L. lactis* se desconoce completamente sobre secuencias mínimas para que la recombinación sea posible.

Parece posible que en un sistema donde se forman intermedios de hebra simple, estos pudieran ser muy activos al recombinar con el cromosoma, en especial cuando hay secuencias homólogas.

Este fenómeno de integración del gen marcador ha sido observado en células de *B. subtilis rec+*, durante la construcción de una librería genómica el gen de resistencia a cloranfenicol se integró al cromosoma. (Rapoport, *et al.*, 1979) como un suceso fortuito, no buscado por el investigador.

También se ha sugerido que la inestabilidad de un plásmido recombinante puede ser el resultado de la presencia de un promotor fuerte y que dicha inestabilidad puede ser eliminada al utilizar un promotor débil (López, *et al.*, 1984).

Pérez-Martínez *et al.*, (1992) utilizaron el gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis* en *L. lactis* para seleccionar a partir de 50 000 fragmentos de DNA cromosomal que contenían promotores y señales de exportación, uno que permitiera la expresión del gen de la amilasa. Aunque en este trabajo no se estudia la estabilidad de la construcción, sí se resalta el drástico efecto de las señales genéticas en la producción de esta enzima, ya que de 50 000 fragmentos que prueban solo uno permite ver expresión del gen. El análisis de la secuencia del fragmento seleccionado no indica ninguna característica especial, ya que se encuentra consenso entre el promotor aislado y los promotores generales de Gram +. Los autores no intentaron definir el por qué se requería este alto grado de especificidad para poder ver actividad, es probable que en muchas de las construcciones que se hicieron, se hubiesen dado selecciones y ser esta la causa por la que no se vió expresión, de tal modo que el

problema fuera la inestabilidad de la construcción, probablemente dada por el gen mismo, y no la expresión como tal ya que otros genes heterólogos han sido clonados con promotores lactococales e incluso con sus propios promotores, sin ningún problema aparente.

Para poder discernir si es el gen de alfa-amilasa la fuente de la inestabilidad, se debería clonar otro gen utilizando los mismos plásmidos y los mismos sitios, aunque es evidente que faltan una gran cantidad de estudios que involucren el comportamiento fisiológico y genético de estos microorganismos, antes de que se puedan manipular de manera exitosa.

CONCLUSIONES

Es posible la transformación eficiente de *Lactococcus lactis* cepas IL1403 y MG1363 por electroporación. Los factores más críticos son el medio de electroporación, la pureza del vector y la presencia de debilitadores de pared que no afecten marcadamente la viabilidad celular.

De las construcciones realizadas las obtenidas con el plásmido pLZ12 son expresadas y establemente mantenidas por *E. coli*, mientras que las realizadas con el pMG36_e son expresadas pero inestables.

En *L. lactis* todas las construcciones probadas fueron inestables, aun cuando se ha reportado que las cepas IL1403 y MG1363 son las idóneas (hasta el momento) para la clonación de genes heterólogos.

El gen de alfa-amilasa fué clonado y expresado en el vector pMG36_e utilizando un promotor y un terminador lactococal. La construcción fué inestable y se terminó con la probable integración al cromosoma del fragmento del plásmido responsable de la resistencia a eritromicina.

El inserto de DNA, en este caso el gen de alfa amilasa, parece ser el que directamente ocasiona la inestabilidad de los plásmido utilizados. No es obvio cómo interfiere el inserto, pero si podríamos notar que estimula la presencia de intermediarios inestables en los plásmidos usados, que para replicarse utilizan el mecanismo de círculo rodante.

BIBLIOGRAFIA

- Achen, M. G., Davidson, B. E. & Hillier, A. J. 1986. Construction of plasmid vectors for the detection of streptococcal promoters. *Gene* 45:45-49.
- Allen, L. K., Sandine, W. E. & Elicker, P. R. 1962. Transduction in *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Res.* 30:351-357.
- Antonov, P. A., Maximova, V. A. & Pancheva, R. P. 1993. Heat shock and osmotically dependent steps by DNA uptake after *Escherichia coli* electroporation. *Biochim. Biophys Acta* 1216:286-288.
- Aukrust, T. & Nes, I. F. 1988. Transformation of *Lactobacillus plantarum* with the plasmid pTV1 by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 52:127-132.
- Aymerich, M. T., Hugas, M., Garriga, M., Vogel, R. F. & Monfort, J. M. 1993. Electrotransformation of meat lactobacilli. Effect of several parameters on their efficiency of transformation. *J. Appl. Bact.* 75:320-325.
- Badii, R., Jones, J. & Warner, P. J. 1989. Sphaeroplast and electroporation-mediated transformation of *Lactobacillus plantarum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 9:41-44.
- Bansal, B. & Das, R. H. 1989. A simple and rapid method for the isolation of plasmid and phage DNAs. *Nucleic Acid Res.* 17:10129.
- Bates, E. E. M., Gilbert, H. J., Hazlewood, G. P., Huckle, J., Laurie, J. & Morn, S. 1989. Expression of a *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2095-2097.
- Behnke, D., Malke, H., Hartmann, M. & Waller, F. 1979. Post-transformational rearrangement of a in vitro reconstructed group A-Streptococcal erythromycin resistance plasmid. *Plasmid* 2:605-616.
- Behnke, D., Gilmore, M. S. & Ferreti, J. 1981. Plasmid pGB301, a new multiple resistance streptococcal cloning vehicle and its use in cloning of the gentamycin / kanamycin resistance determinant. *Mol. Gen. Genet.* 182:414-421.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7:1513-1521.

Boizet, B., Velleval, D., Sios, P., Novel, M., Noul, G. & Mercenier, A. 1988. Isolation and structural analysis of the phospho- β -galactosidase gene from *Streptococcus lactis* 2268. *Gene* 62:249-261.

Bojovic, B., Djordjevic, G. & Topisirovic, L. 1991. Improved Vector for promoter screening in Lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:385-388.

Breed, R. S., Murray, E. G. D. & Smith, N. R. 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7th edition. Williams & Wilkins Co. Baltimore.

Brigidi, P., Bolognoni, F., Rossi, M., Cerre, C. & Matteuzzi, P. 1993. Cloning of the gene for cholesterol oxidase in *Bacillus* sp, *Lactobacillus reuteri* and its expression in *Escherichia coli*. *Lett. appl. Microbiol.* 17: 61-64.

Bron, S., Luxen, E. & Swart, P. 1988. Instability of recombinant pUB110 plasmids in *Bacillus subtilis*: plasmid encoded stability function and effects of DNA inserts. *Plasmid* 19: 231-241.

Bron, S., Holtsappel, S., Venema, G. & Peeters, B. P. H. 1991. Plasmid deletion formation between short direct repeats in *Bacillus subtilis* is stimulated by single stranded rolling circle replication intermediates. *Mol. Gen. Genet.* 226:88-96.

Chassy, B. M. 1987. Prospects for the genetic manipulation of lactobacilli. *FEMS Microb. Rev.* 46:297-312.

Chassy, B. M. & Flickinger, J. L. 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microb. Lett.* 44:173-177.

Chassy, B. M. & Flickinger, J. L. 1988. In: Gene PulserTM transfection apparatus operating instructions and applications guide. Bio-Rad Laboratories. Richmond, Cal. USA.

Chopin, A., Chopin, M. C., Mõllo-Batt, A. & Langella, P. 1984. Two plasmid-determined restriction systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* 11:260-263.

Chopin, M. C. Chopin, A., Rouault, A. & Galleron, N. 1989. Insertion and amplification of foreign genes in the *Lactococcus lactis* subsp *lactis* chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1768-1774.

Cocconcelli, P. S., Gasson, M. J., Morelli, L. & Battazzi, V. 1991. Single-stranded DNA plasmid, vector construction and cloning of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase in *Lactobacillus*. *Res. Microbiol.* 142:643-652.

Coffey, A., Costello, V., Dally, C. & Fitzgerald, G. 1991. Plasmid encoded bacteriophage insensitivity in members of the genus *Lactococcus*, with special reference to pCl829. In: Dunny, G. M., Clary, P. P. & McKay, L.L. (Ed). Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci. American Society for Microbiology. USA.

D'Angio, C., Beal, C., Boquien, C.-Y., Langella, P. & Corrieu, G. 1994. Plasmid stability in recombinant strains of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* during continuous culture. FEMS Microbiol. Lett. 116:25-30.

Dao, M. L. & Ferretti, J. J. 1985. *Streptococcus-Escherichia coli* shuttle vector pSA3 and its use in the cloning of streptococcal genes. Appl. Environ. Microbiol. 49:115-119.

de Vos, W. M. 1986. Gene cloning in lactic streptococci. Neth. Milk Dairy J. 40:141-154.

de Vos, W. M. & Gasson, M. J. 1989. Structure and expression of the *Lactococcus lactis* gene for phospho- β -galactosidase (*lac G*) in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*. J. Gen. Microbiol. 135:1833-1846.

Eaton, T. J., Shearman, C. A. & Gasson, M. J. 1993. The use of bacterial luciferase genes as reporter genes in *Lactococcus* regulation of the *Lactococcus lactis* subsp *lactis* lactose genes. J. Gen. Microbiol. 139:1495-1501.

El Alami, N., Boquien, C.-Y., Corrieu, G. 1992. Batch cultures of recombinant *Lactococcus lactis* subsp *lactis* in a stirred fermentator. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:358-363.

Gaier, W., Vogel, R. F. & Hammes, W. P. 1990. Genetic transformation of intact cells of *Lactobacillus curvatus* Lc2 and *L. sake* Ls2 by electroporation. Lett. Appl. Microbiol. 11:81-83.

Gaier, W., Vogel, R.F. & Hammes, W. P. 1992. Cloning and expression of the lysostaphin gene in *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus casei*. Lett. appl. Microbiol. 14:72-76.

Gasson, M. J. 1980. Production, regeneration and fusion of protoplast of lactic streptococci. FEMS Microbiol. Lett. 9:99-102.

Gasson, M. J. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. J. Bacteriol. 154:1-9.

Gasson, M. J. & Davies, F. L. 1984. The genetics of dairy lactic-acid bacteria. In: Davies, F. L. & Law, B. A. (ed). Biochemistry of cheese and fermented milk. Elsevier App. Sci. Pub. England.

Gasson, M. J. & Anderson, P. H. 1985. High copy number plasmid vectors for use in lactic streptococci. *Fems Microbiol. Lett.* 30:193-196.

Goldin, B. R. & Gorbach, S. L. 1984. The effect of oral administration of *Lactobacillus* and antibiotics on intestinal bacterial activity and chemical induction of large bowel tumors. *Devel. Ind. Microbiol.* 25:139-150.

Gruss, A. & Erlich, S. 1988. Insertion of foreign DNA into plasmids from Gram-positive bacteria induces formation of high-molecular-weight plasmid multimers. *J. Bacteriol.* 170:1183-1190.

Gruss, A. & Erlich, S. D. 1989. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol. Rev.* 53:91-241.

Guilliland, S. E.; Nelson, C. R. & Maxwell, C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:377-381.

Handrikman, A. J., Kok, J., Laan, H., Soemiro, S., Ledebouer, A. M., Konings, W. N. & Venema, G. 1989. Identification of a gene required for maturation of an extracellular lactococcal serine proteinase. *J. Bacteriol.* 171:2789-2794.

Hack, B. & Pack, M. Y. 1990. Expression of the *Bacillus subtilis* endoglucanase gene in *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnol. Lett.* 12:919-924.

Harlander, S. K. 1987. Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation. In: Ferretti, J. J. & Curtis, R. (ed). Streptococcal Genetics. American Society for Microbiology. Washington, D. C.

Heery, D. M. & Dunican, L. K. 1989. Improved efficiency M13 cloning using electroporation. *Nucleic Acid Res.* 17:2715.

Hill, C., Miller, L. A. & Klaenhammer, T. R. 1990. Nucleotide sequence and distribution of the pTR2030 resistance determinant (hsp) which aborts bacteriophage infection in lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2255-2258.

Holo, H. & Ness, I. F. 1989. High-frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3119-3123.

Hols, P., Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N. & Delcour, J. 1994. Use of Homologous expression-secretion signals and vector-free stable chromosomal integration in engineering *Lb. plantarum* for alfa-amylase and levanase expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1401-1413.

Hugenholtz, J. 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:165-178.

Jones, S. & Warner, P. J. 1990. Cloning and expression of alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* in a stable plasmid vector in *Lactobacillus plantarum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 11:214-219.

Joyet, P., Guerneau, M. & Heslot, H. 1984. Cloning of a thermostable alpha-amylase gene from *Bacillus licheniformis* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 21:353-358.

Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:209-224.

Kempler, G. M., Baldwin, K. A., McKay, L. L., Morris, H. A., Halambeck, S. & Thorsen, G. 1979. Use of genetic alterations to improve *Streptococcus lactis* C2 as a potential cheddar cheese starter. *J. Dairy Sci.* 62:259-274.

Khasanov, F. K., Zvingila, D. J., Zainullin, A. A., Prozorov, A. A. & Bashkurov, V. 1992. Homologous recombination between plasmid and chromosomal DNA in *Bacillus subtilis* requires approximately 70pb of homology. *Mol. Gen Genet.* 234:494-497.

Kiewiet, R., Kok, J. Seegers, J.F.M.L., Venema, G. & Bron, S. 1993. The mode of replication is a major factor in segregational instability in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:358-364.

King, S. R., Richardson, J. P. 1986. Role of homology and pathway specificity for recombination between plasmids and bacteriophage. *Mol. Gen. Genet.* 204:141-147.

Kok, J. van der Vossen, J. M. B. M. & Venema G. 1984. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:726-731.

Kok, J., Leenhouts, K. J., Handrikman, A. J., Ledebøer, A. M. & Venema, G. 1988. Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:231-238.

Kok, J. 1990. Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 87:15-42.

Kok, J. 1991. Special-purpose vectors for Lactococci. In: Dunny, G. M., Clary, P. P. & McKay, L. L. (Ed). Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci. American Society for Microbiology. USA.

Kondo, J. K. & McKay, L. L. 1982. Transformation of *Streptococcus lactis* protoplast by plasmid DNA. Appl. Environ. Microbiol. 43:1213-1215.

Kondo, J. K. & McKay, L. L. 1984. Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplast: optimization and use in molecular cloning. Appl. Environ. Microbiol. 48:252-259.

Le Blanc, D. J. & Hassel, F. 1976. Transformation of *Streptococcus sanguis* challis by plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. 128:347-355.

Leenhouts, K. J., Kok, J. & Venema, G. 1989. Campbell-like integration of heterologous plasmid DNA into the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 55:394-400.

Leenhouts, K. J., Kok, J. & Venema, G. 1990. Stability of integrated plasmids in the chromosome of *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 56:2726-2735.

Leenhouts, K. J., Tolner, B., Bron, S., Kok, J., Venema, G. & Seegers, J. F. M. L. 1991. Nucleotide sequence and characterization of the broad host range lactococcal plasmid pWV01. Plasmid 26:55-66.

Leenhouts, K. J. & Venema, G. 1993. Lactococcal plasmid vectors. In: Hardy, (ed). Plasmids. IRL Press. Washinton, D. C. In Press.

López, P., Espinosa, M., Greenberg, B. & Lacks, S. A. 1984. Generation of deletions in pneumococcal *mal* genes cloned in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 81:5189-5193.

Macrina, F. L., Tobian, J. A. Jones, K. R., Evans, R. P. & Clewell, D. B. 1982. A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. Gene 19:345-353.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, T. 1982. Molecular Cloning; a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Marciset, O. & Mollet, B. 1994. Multifactorial experimental designs for optimizing transformation: Electroporation of *Streptococcus thermophilus*. *Biotech. Bioengin.* 43:490-496.

Mayo, B., Kok, J., Venema, K., Bockelmann, W., Tenber, M., Reinke, H. & Venema, G. 1991. Molecular cloning and sequence analysis of x-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:38-44.

McIntyre, D. A. & Harlander, S. K. 1989. Improved electroporation efficiency of intact *Lactococcus lactis* subsp *lactis* cells grown in defined media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2621-2626.

McKay, L. L. & Baldwin, K. A. 1978. Stabilization of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:360-367.

McKay, L. L. & Baldwin, K. A. 1990. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microb. Rev.* 87:3-14.

Moat, A. G. & Foster, J. W. 1988. *Microbial Physiology*. 2nd ed. Wiley Interscience. USA.

Mureiana P. M., Luchansky, J. B. & Klaenhammer, T. R. 1988. Gene PulserTM transfection apparatus operating instruction and application guide. Bio-Rad Laboratories. Richmond, Cal. USA.

Nardi, M., Chopin, M., Chopin, A., Cals, M. & Gripon, J. 1991. Cloning and DNA sequence analysis of an x-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* ssp *lactis* NCDO763. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:45-50.

Okamoto, T., Fujita, Y. & Irie, R. 1983. Protoplast formation and regeneration of *Streptococcus lactis* cells. *Agric. Biol. Chem.* 47:259-263.

Ostroff, G. R. & Penne, J. J. 1984. Molecular cloning with bifunctional plasmid vectors in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 193:299-305.

O'Sullivan, D. J. & Klaenhammer, T. R. 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* ssp. *Appl. Environ. Microb.* 59:2730-2733.

Perdigón, G., Nader de Macías, M. E., Alvarez, S., Oliver G. & Pesce de Ruiz-Holgado, A. 1986. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun.* 53:404-410.

- Pérez-Martínez, G., Kok, J., Venema, G., van Dijk, J. M., Smith, H. & Bron, S. 1992. Protein export elements from *Lactococcus lactis*. *Mol. Gen. Genet.* 234:401-411.
- Powell, I. B., Achen, M. G., Hillier, A. J. & Davidson, B. E. 1988. A simple and rapid method for genetic transformation of lactic streptococci by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655-660.
- Rapoport, G., Klier, A., Billault, A., Fargette, F. & Dedonder, R. 1979. Construction of a colony bank of *E. coli* containing hybrid plasmids representative of *Bacillus subtilis* 168 genome. *Mol. Gen. Genet.* 176: 239-245.
- Renault, P., Gaillardin, C. & Heslot, H. 1989. Product of the *Lactococcus lactis* gene required for malolactic fermentation is homologous to a family of positive regulators. *J. Bacteriol.* 171:3108-3114.
- Sandine, W. E. 1987. Genetics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 205-220.
- Schreirlinck, T., De Meutter, J., Arnaut, G., Joos, H., Claeysens, M. & Michiels, F. 1989. Integration and expression of alpha -amylase and endoglucanase genes in the *Lactobacillus plantarum* chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:534-541.
- Schreirlinck, T., De Meutter, J., Arnaut, G., Joos, H., Claeysens, M. & Michiels, F. 1990. Cloning and expression of cellulase and xylanase genes in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microb. Biotechnol.* 33:534-541.
- Silhavy, T. J., Berman, M. L. & Enquist, L. W. 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Simon, D., Rouault, A. & Chopin, M. C. 1986. High efficiency transformation of *Streptococcus lactis* protoplast by plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:334-395.
- Simon, D. & Chopin, A. 1988. Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie* 70:559-566.
- Simons, G., Rutten, G., Homes, M. & de Vos, W. M. 1987. Production of bovine prochymosin by lactic acid bacteria. *Proc. 4th Eur. Congr. Biotech.* 183-187.
- Simons, G., Buys, H., Hogers, R., Koenhen, E. & de Vos W. M. 1990. Construction of a promoter probe vector for lactic acid bacteria using the *lacG* gene of *Lactococcus lactis*. *Dev. Ind. Microbiol.* 31:31-39.
- Smith, H., Bron, S., van Ee, J. & Venema, G. 1987. Construction and use of signal sequence selection vectors in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169:3321-3328.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Somkuti, G. A., Solaiman, D. K. Y. & Steinberg, D. H. 1992. Expression of the *Streptomyces* sp cholesterol oxidase in *Lactobacillus casei*. Appl. Environ. Biotechnol. 37:330-334.

Tanaka, T. 1979. Restriction of plasmid-mediated transformation in *Bacillus subtilis* 168. Mol. Gen. Genet. 175:235-237.

Terzaghi, B. E. & Sandine, W. E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol. 29:807-813.

Uhlén, M., Flock, J. I. & Phillipson, L. 1981. Rec E independent deletions of recombinant plasmids in *Bacillus subtilis*. Plasmid 5:161-169.

van Asseldonk, M., de Vos, W. M. & Simons, G. 1993. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* USP45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous alpha-amylase. Mol. Gen. Genet. 240:428-434.

van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Jeeninga, R. E., Kok, J. & Venema, G. 1991. Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. Appl. Environ. Microbiol. 57:492-498.

van de Guchte, M., van der Vossen, J. M. B. M., Kok, J. & Venema G. 1989. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 55:224-228.

van de Guchte, M., Kodde, J., van der Vossen, J. M. B. M., Kok, J. & Venema, G. 1990. Heterologous gene expression in *Lactococcus lactis* subsp *lactis*: synthesis, secretion and processing of the *Bacillus subtilis* neutral protease. Appl. Environ. Microbiol. 56:2606-2611.

van de Guchte, M., Kok, J. & Venema G. 1991a. Distance dependant translation coupling and interference in *L. lactis*. Mol. Gen. Genet. 227:65-71.

van de Guchte, M., van der Lelle, D. & Venema G. 1991b. A possible contribution of mRNA secondary structure to translation initiation efficiency in *L. lactis*. FEMS Microbiol. Lett. 81:205-208.

van de Guchte, M., van der Wal, F. J., Kok, J. & Venema, G. 1992. Lysozyme expression in *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:216-224.

van de Guchte, M., Kok, J. & Venema G. 1992. Gene expression in *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiol. Rev. 88:73-92.

- van der Vossen, J. M. B. M., Kok, J. & Venema, G. 1985. Construction of cloning, promoter-screening and terminator-screening shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 540-542.
- van der Vossen, J. M. B. M., van der Lelie, D. & Venema, G. 1987. Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-Specific Promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2452-2457.
- Voguel, R. F., Gaier, W. & Hammes, W. P. 1990. Expression of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* in *Lactobacillus curvatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 69:289-292.
- Von Wright, A., Tynkkynen, S. & Suominen, M. 1987. Cloning of a *Streptococcus lactis* subsp *lactis* chromosomal fragment associated with the ability to grow in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1584.
- Walker, J. M. & Gingold E. B. 1990. *Molecular Biology & Biotechnology*. 2nd edition. Royal Society of Chemistry. Great Britain.
- Ward, O. P. 1989. *Biocología de la fermentación*. Ed. Acribia, S.A: España.
- Wei, D., Parulekar, S. J., Stark, B. C. & Weigand, W. A. 1989. Plasmid stability and amilase production in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis* TN106 (pAT5). *Biotechnol. Bioeng.* 33:1010-1020.
- Wells, J. M., Wilson, P. W. & Le Page R. W. F. 1993. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 629-636.
- Wells, J. M., Wilson, P. W. Norton, P. M. Gasson, M. & Le Page, R. W. F. 1993. *Lactococcus lactis*: high level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol. Microbiol.* 8:1155-1162.
- Williams, D. R. & Thomas, C. M. 1992. Active partitioning of bacterial plasmids. *J. Gen Microbiol.* 138:1-16.
- Xie, T. D., Sun, L., Zhao, H. G., Fuchs, J. A. & Tsong, T. Y. 1992. Study of mechanisms of electric field induced DNA transfection IV. *Biophys. J.* 63:1026-1031.
- Xu, F., Pearce, L. E., & Yu, P. L. 1991a. Genetic analysis of a lactococcal plasmid replicon. *Mol. Gen. Genet.* 227:33.
- Xu, F., Pearce, L. E., & Yu, P. L. 1991b. Construction of a family of lactococcal vectors for gene cloning and translation fusion. *FEMS Microbiol. Lett.* 30:193.
- Zabarovsky, E. R. & Winberg, G. 1990. High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. *Nucleic Acid Res.* 18:5912.

APENDICE

Electroporación

El electroporador tiene un capacitor que genera un pulso eléctrico que cae en forma de una curva exponencial. El voltaje del pulso llega rápidamente a un pico de voltaje, V_0 , que declina en el tiempo de la manera descrita por la ecuación 1.

$$V(t) = V_0 [e^{-(t/T)}] \quad \text{ec. 1}$$

T (la constante de tiempo RC) es el tiempo que tarda el voltaje en declinar $1/e$ (37%) del valor inicial.

El campo eléctrico al que es expuesto una muestra que se encuentra entre dos electrodos es:

$$E = V / d \quad \text{ec. 2}$$

En donde V es el voltaje aplicado a través de los electrodos que se encuentran separados por una distancia d. Como los electrodos se encuentran fijos E disminuye en el tiempo con la misma cinética que V:

$$E(t) = E_0 [e^{-(t/T)}] \quad \text{ec. 3}$$

Cuando se especifica el voltaje del pulso o del campo eléctrico, siempre se habla de los valores en el pico V_0 y E_0 . El generador de pulso usado en estos estudios produce un potencial máximo de 2.5 kV. Para obtener campos eléctricos grandes (del orden de 12.5 kV hasta 25 kV) se utilizan celdas con una distancia interelectrodos de 0.2 y 0.1 cm.

La constante de tiempo, que es una manera conveniente de expresar la amplitud del pulso se define como:

$$T = RC \quad \text{ec. 4}$$

Donde: T es en segundos, R , la resistencia en ohms y C , la capacitancia en faradios.

En el caso de la electroporación de bacterias, se utilizan campos eléctricos muy grandes y volúmenes muy pequeños, lo que resulta en una densidad de energía muy alta, que puede provocar un arco entre los electrodos. Para eliminar este riesgo parte de la energía es desviada de la muestra a través de resistores, con lo cual se disminuye enormemente la posibilidad de tener un arco