

03072



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO C.C.H.**

**"Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa
de *Lactobacillus amylovorus* en *Escherichia coli*"**

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A
NORMA ANGELICA OVIEDO DE ANDA

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección de la Dra. Juliette Morlon Guyot, y en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química con la asesoría de la Dra. Amelia Farrés González Saravia.

Agradezco a mi comité tutorial integrado por:

**Dra. Juliette Morion Guyot
Dra. Amelia Farrés González Saravia
Dr. Jorge Calderón Jiménez**

Por sus valiosos comentarios para la realización del proyecto.

Gracias al jurado formado por:

**Dr. Fernando Montiel Aguirre
Dra. Juliette Morion Guyot
Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Dra. Blanca Ruiz Ordaz**

Por sus aportaciones y el tiempo dedicado en la revisión de este trabajo.

Agradecimientos

Gracias Juliette por tu apoyo no solo a nivel académico, sino también personal.

Gracias a Guillermo y Blanca por su motivación y su valiosa amistad en todo momento.

Gracias al Dr. Sergio Sánchez por su hospitalidad y sugerencias.

Gracias a la Dra. Amelia Farrés por su tiempo y espacio dedicado para este trabajo.

Gracias a Leti García por su apoyo.

Gracias papá por tu gran ejemplo que me ha permitido llegar a esta meta, de la que estoy segura te hubieras sentido orgulloso.

Gracias mamá, por tu gran ayuda que me ha facilitado el camino y tu gran comprensión y cariño en los momentos difíciles.

Gracias Betel por tu gran cariño que siempre me ha consolado, por comprender la vocación que ha elegido tu mamá y la paciencia con la que me esperabas todas las noches. Con mucho amor te dedico este trabajo, espero que algún día tu recibas los beneficios de mi esfuerzo.

Gracias Fernando y Mireya por ser mi apoyo incondicional en todo momento.

Gracias Romina y Rafael por hacer de esta profesión algo más que biología molecular, por compartir sus sueños y aspiraciones, su confianza depositada en mí y sobre todo por haber sido honestos en todo momento.

Gracias a Elizabeth, Javier y Memo por hacerme olvidar el estrés de la investigación y por su maravillosa amistad.

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	7
<i>Generalidades de bacterias lácticas</i>	7
<i>Lactobacillus</i>	10
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	11
β GALACTOSIDASA (E.C. 3.2.1.23) DE <i>E. COLI</i>	12
<i>Organización y control de los genes lac en E. coli</i>	13
<i>O1 y O2 complementación de lac Z de E. coli</i>	14
<i>Actividad enzimática en β-galactosidasas microbianas</i>	15
<i>Aplicaciones de la β-galactosidasa</i>	18
METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN BACTERIAS LÁCTICAS	19
<i>Metabolismo de lactosa en bacterias lácticas</i>	20
<i>PTS-PEP y sufi-β-galactosidasa</i>	20
<i>Sistemas permesa y β-galactosidasa</i>	23
BIOLOGÍA MOLECULAR EN BACTERIAS LÁCTICAS	25
<i>Organización de los genes del sistema PTS-PEP y β-β-galactosidasa en bacterias lácticas</i>	28
<i>Organización de los genes del sistema permesa-β-galactosidasa en bacterias lácticas</i>	31
<i>Clonación de los genes de β-galactosidasas de bacterias lácticas</i>	31
<i>Streptococcus thermophilus</i>	33
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	34
<i>Lactococcus lactis</i>	34
<i>Lactobacillus helveticus</i>	35
<i>Lactobacillus plantarum</i>	35
<i>Lactobacillus sake</i>	35
<i>Lactobacillus casei</i>	35
OBJETIVOS	38
METODOLOGÍA	39
<i>Microorganismos y vectores</i>	39
<i>Identificación del feno tipo Lac</i>	39
<i>Banco genético</i>	41
<i>Selección de recombinantes β-galactosidasa positivos</i>	41
<i>Extracción de ADN de bacteriófagos</i>	41
<i>Determinación de inserciones en los recombinantes</i>	42
<i>Extracción del pHC79 recombinante</i>	43
<i>Caracterización de las construcciones pICE y pHCN</i>	43
<i>Extracción de la β-galactosidasa</i>	44
<i>Análisis de proteínas y actividad por SDS-PAGE</i>	45
<i>Ensayo de β-galactosidasa</i>	46
<i>Determinación de pH y temperatura óptimas</i>	46
RESULTADOS	47
<i>Identificación del feno tipo β-galactosidasa positivo</i>	47
<i>Obtención del gen de β-galactosidasa</i>	48
<i>Análisis de los bacteriófagos β-galactosidasa positivos</i>	48
<i>Subclonación del gen</i>	55
<i>Caracterización de la β-galactosidasa clonada</i>	62
<i>Determinación del perfil de proteína intracelular de las transformantes</i>	66

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

<i>Ensayo de la actividad in situ</i>	67
DISCUSIÓN	74
<i>Clonación en λ-gt10</i>	75
<i>Subclonación en pUC7A</i>	76
<i>Comparación con otros β-galactosidasas clonadas</i>	79
<i>Similitud con otros genes de β-galactosidasas</i>	80
<i>Expresión de β-galactosidasas en pUC</i>	82
<i>Caracterización de las β-galactosidasas</i>	82
<i>Comparación con β-galactosidasas de bacterias láticas</i>	83
CONCLUSIONES	86
BIBLIOGRAFÍA	88
APENDICE	99
<i>Abreviaturas</i>	99
<i>Notas utilizadas</i>	100
<i>Investigadores y soluciones</i>	101

RESUMEN

Las bacterias lácticas tienen un gran potencial para ser utilizadas como sistemas de expresión inocuos de productos derivados por ingeniería genética. Las cepas de *Lactobacillus* aisladas de fermentaciones vegetales producen diferentes enzimas hidrolíticas como amilases, que las diferencian de otras bacterias lácticas. *Lactobacillus amylovorus* se aisló a partir de desechos agrícolas, utiliza β -galactosidasa para incorporar lactosa como fuente de carbono, a diferencia de la mayoría de las lácticas, que utilizan el sistema fosfo- β -galactosidasa y algunas utilizan ambas enzimas. El gen de β -galactosidasa, enzima que ha sido utilizado con éxito en otros sistemas de clonación, proveniente de una bacteria láctica como *L. amylovorus* podría ser utilizado como marcador de grado alimenticio en la construcción de vectores para bacterias lácticas. Por lo que en este trabajo se pretende aislar el gen y realizar una caracterización preliminar en un hospedero heterólogo como *Escherichia coli*. Con este propósito se construyó un banco genómico de *L. amylovorus* en λ -gt10 con un título de 1.9×10^5 y con una eficiencia del 79%. Se infectó la cepa *E. coli* Y1079 Lac(-) y se aislaron las placas de lisis con actividad de β -galactosidasa en presencia de X-gal. Se detectaron 14 transfectantes con dicha actividad. Estas al infectar *E. coli* JM 101, 103 y 105 también producen actividad en estas cepas. Los fagos recombinantes contienen insertos desde 4700 pb hasta 11.127 pb. Los perfiles de corte muestran bandas en común entre 3 diferentes fagos Lac⁺ y por hibridaciones se demostró que contienen en común un fragmento EcoRI de 2,060 pb. Los fragmentos digeridos con Eco RI correspondientes a los insertos de los fagos Lac⁺ fueron subclonados en pHC79, de donde se obtuvieron las construcciones pHCH y pHCE. Se estimó que hay un fragmento de aprox. 5,231 pb en pHCH, que contiene sitios Sma I, Eco RI Bgl II, Bam HI e Hind III, puede codificar para la enzima detectada por PAGE-SDS. Esta enzima resultó ser parecida, en cuanto a peso molecular, a las reportadas para *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. También se observó la pérdida de la región de resistencia a tetraciclina y el sitio COS, comprobado mediante hibridación. Al transformar con estas construcciones confieren actividad de β -galactosidasa a las cepas *E. coli* JM 101 y JM103 a pesar de la

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

suencia de lactosa e IPTG. La proteína intracelular de las transformantes se analizó por gels PAGE-SDS, detectándose la actividad en una proteína con peso aproximado de 133.05 kDa., además se hizo una caracterización del extracto crudo de proteínas intracelular determinándose pH óptimo y temperatura óptima de la enzima, así como el cálculo experimental de la K_m y V_{max} . Las enzimas de las transformantes presentan una temperatura óptima de 45°C, mientras que la actividad de β -galactosidasa de *L. amylovorus* presenta su pico en 40 °C, en cambio la actividad en *E. coli* muestra ser más sensible al calor y en 50°C se abate su actividad, en tanto que *L. amylovorus* y las transformantes presentan actividad. Las transformantes presentan valores de K_m y V_{max} muy parecidos entre sí, lo que verifica el origen de la enzima.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas han sido utilizadas en la alimentación humana durante siglos. Actualmente ha surgido un mayor interés en estos microorganismos para su utilización en nuevos procesos, lo que ha impulsado la investigación en su fisiología y genética, principalmente en aquellas cepas que intervienen en las fermentaciones lácteas. En el género *Lactobacillus* se encuentran cepas atípicas que participan en fermentaciones vegetales tradicionales y que prefieren la utilización de β -galactosidasa para la degradación de lactosa. En cambio las cepas de *Lactococcus* y *Lactobacillus* que se desarrollan en medios lácteos tienen preferencia por la utilización de la P- β -galactosidasa. Aquellas cepas que se desarrollan en medios lácteos han tenido adaptaciones que les impiden crecer en medios mínimos y tienen requerimientos de algunos aminoácidos que no pueden producir, a pesar de tener los genes para ello. Por esto son interesantes las cepas de *Lactobacillus* que crecen en fermentaciones vegetales, sus requerimientos no son tan exigentes y pueden ser utilizadas en nuevas fermentaciones. Asimismo, la caracterización de sus actividades enzimáticas sientan las bases de otro aspecto fisiológico en bacterias lácticas poco explorado. En estas cepas se encuentran genes de interés industrial y genético tales como hidrolasas y marcadores genéticos ausentes en las cepas provenientes de medios lácteos. En *L. amylovorus* se han explorado este tipo de actividades enzimáticas detectándose amilazas, pectinasas y β -galactosidasa. Esta última enzima no es frecuente entre las cepas industriales, por lo que puede ser utilizada en la construcción de vehículos de clonación. Estos vehículos pueden facilitar la identificación de cepas transformadas y la utilización de éstas en procesos destinados a la producción de alimentos o productos farmacéuticos.

El desarrollo de vectores para la transformación de bacterias lácticas presenta dificultades en el reconocimiento de señales para la expresión de genes (Van de Guchte y col., 1991). Es por esto que son preferibles los genes homólogos provenientes del mismo género donde se pretenden utilizar estos vectores, para asegurar la expresión y prevenir las posibles modificaciones genéticas e incompatibilidades plasmídicas (Chopin y col., 1984).

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

La clonación del gen de β -galactosidasa en *E. coli* servirá para realizar una mejor caracterización de la enzima, de difícil extracción a partir de *L. amylovorus*. La expresión de β -galactosidasa en cepas de bacterias lácticas es baja (Collins y Thompson, 1992). La inducción de la misma difiere en las distintas especies de *Lactobacillus* de la inducción que se conoce en *E. coli*. En los genes que codifican para β -galactosidasa en bacterias lácticas se distinguen 2 grupos: el gen *lacZ* y los genes *lac L* y *lac M*. Estos genes se encuentran localizados tanto en el cromosoma como en plásmidos. El gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* se localizó en el cromosoma. Entre estos genes *Lac* de bacterias lácticas se han descrito los porcentajes de similitud entre éstas y otras bacterias como *E. coli* y *Costridium acetobutylicum*. Dada la similitud de los genes de bacterias lácticas con *E. coli* se espera que el gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* tenga también similitud y presente hibridación. También se espera al caracterizar dicha β -galactosidasa que presente diferencias en sus parámetros de actividad y su movilidad electroforética. Se pretende demostrar que esta β -galactosidasa de *L. amylovorus* clonada en cepas de *E. coli lac Z⁻* difiere en sus propiedades genéticas y bioquímicas de otras β -galactosidasas de bacterias lácticas y de *E. coli*.

ANTECEDENTES

Generalidades de bacterias lácticas.

Las bacterias lácticas junto con el género *Bacillus* forman el grupo de la rama de *Clostridium* de subbacterias gram positivas, en tanto que las bifidobacterias, junto con actinomicetales forman la segunda rama de subbacteria gram positiva (Stackebrandt y col. 1983). En tanto que las bacterias lácticas son miembros de la flora silvestre de alimentos crudos y son usadas directamente en tecnología de alimentos, las bifidobacterias son colonizadoras del intestino del hombre y animales, se encuentran también en substratos contaminados con heces fecales (Scardovi, 1982).

Las bacterias lácticas se han utilizado en la preparación y procesamiento de alimentos para los humanos. Muchas de estas fermentaciones se derivan de técnicas utilizadas hace aproximadamente 8000 años para la conservación de alimentos (Steele y Únlü, 1992). Los alimentos fermentados son productos que se pueden ingerir sin necesidad de cocción, aun cuando dichos alimentos se preparan a partir de materiales crudos o semitratados. Durante la fermentación adquieren propiedades características de textura, aroma, sabor, consistencia y color, debido a la actividad biológica de los microorganismos que se encuentran presentes (Hamme, 1990). En la tabla 1 observamos que las bacterias acidolácticas participan en numerosas fermentaciones de alimentos provenientes de fuentes agrícolas y ganaderas tales como: vegetales, cereales, carne y diferentes productos lácteos (Venema y Kok, 1987). Las bacterias lácticas usadas en la preparación de alimentos fermentados y bebidas pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*.

La conversión de carbohidratos a lactato por las bacterias lácticas se considera como el proceso de fermentación más importante en la industria de alimentos. Las bacterias lácticas provocan la acidificación durante la fermentación, y esto restringe el crecimiento de microorganismos que pueden resultar patógenos para el hombre. También es importante la utilización de microorganismos no patógenos como hospederos de genes de interés industrial para la utilización de los productos obtenidos a partir de ellos.

TABLA I. BACTERIAS LÁCTICAS PRESENTES EN ALIMENTOS FERMENTADOS.

Alimento	Especies	Acciones
Cerveza	<i>Lactococcus mesenteroides</i> <i>Lactobacillus sake</i>	Conversión de azúcares en alcohol
Vino	<i>Lactobacillus amylophilus</i>	Fermentación maloláctica, disminución de acidez y mejoramiento de la textura.
Leche fermentada y lácteos	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> subsp. <i>jurgurti</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactococcus cremoris</i>	Conversión de lactosa en ácido láctico, producción de sabor e inhibición de bacterias patógenas.
Quesos	<i>L. lactis</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Lactobacillus casei</i> .	Proteólisis, conversión de lactosa en ácido láctico y producción de sabor.
Crema y mantequilla	<i>L. lactis</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> , <i>Lactococcus cremoris</i> .	Conversión de lactosa en ácido láctico y producción de sabor.
Salsas de soya	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus spp.</i>	Conversión de azúcares en ácido láctico e inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos.
Fermentaciones vegetales	<i>L. acidophilus</i> , <i>Lactobacillus bayarticus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus cellobiosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Lactobacillus delbrückii</i> , <i>Lactobacillus corniformis</i> .	Hetero y homofermentación, contribuye al desarrollo del sabor y producen bacteriocinas para inhibir crecimiento de bacterias patógenas.
Café	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> y <i>Streptococcus faecalis</i> .	Movilitización de azúcares para la mejor digestión del mucílago. Mejora la calidad de la semilla.
Cocos	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lactobacillus collinoides</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Lactobacillus mali</i> , <i>L. bulgaricus</i>	Conversión de carbohidratos en ácidos láctico y acético, etanol, CO ₂ , diacétilo y acetaldéhidlo que incrementa la acidez de la pulpa y se difunden a la semilla realizando el sabor.
Ensaladas de maíz y alfalfa	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. mesenteroides</i> , y <i>Streptococcus</i> <i>hovyi</i>	Conversión de azúcares a ácido láctico y disminución drástica del pH del medio.

En la tabla se resumen las diferentes actividades metabólicas que desarrollan durante la fermentación para la modificación de las propiedades organolépticas del alimento. Se aprecia en la tabla la gran cantidad de *Lactobacillus* que participan en diversas fermentaciones no lácteas.

Por esto las bacterias lácticas, junto con las levaduras, son los microorganismos idóneos para este tipo de manipulaciones genéticas por ser considerados como organismos GRAS (General Recognized as Safe) o de grado alimenticio para el ser humano.

Las cepas de bacterias lácticas que fermentan vegetales tienen requerimientos nutricionales diferentes a las cepas provenientes de un medio lácteo. Incluso algunas vías metabólicas que se utilizan preferentemente son diferentes de las cepas de fermentaciones lácteas.

Muchas de estas cepas presentan secreción de enzimas hidrolíticas, principalmente hacia los polisacáridos presentes en vegetales. *Lactobacillus buchneri* es capaz de fermentar arabinosa y xilosa (Wood, 1992). Algunas cepas de bacterias lácticas tienen la capacidad de producir antibióticos proteicos (bacteriocinas) los que ayudan en la preservación de los alimentos, sin tener que recurrir a los conservadores químicos. Se han reportado algunos géneros que producen sustancias inhibidoras del crecimiento de hongos (Batish y col., 1989).

La reducción de pH y la remoción de grandes cantidades de azúcares requeridos para el crecimiento de bacterias lácticas son acciones primarias para la inhibición del crecimiento de otros microorganismos. Las bacterias lácticas producen también otras sustancias en pequeñas cantidades que son inhibidoras de la proliferación de otros microorganismos. Entre ellos el peróxido de hidrógeno, el diacetilo, el hipotiocianato y la reuterina (Daeschel, 1989).

A las bacterias lácticas se les atribuyen ciertos beneficios para la salud. El ácido láctico es importante para el ser humano al facilitar la digestión de las proteínas de la leche e incrementar la asimilación del calcio, fósforo y hierro. Entre los beneficios a la salud otorgados por el consumo de alimentos fermentados por bacterias lácticas está la disminución de trastornos gastrointestinales y se han reportado también: actividad anticancerígena (Bogdanov y Dalev, 1975; Esser y col., 1983), efecto anticolesterolémico (Mann, 1977 a y b), degradación de nitrosaminas (Rowland y Grasso, 1975), desarrollo de inmunocompetencia (Simone y col., 1986) además de la curación de escoriaciones en cáncer de piel, infecciones orales, eczema y reducción de la caries dental.

La aplicación de bacterias lácticas hace posible la manufactura de miles de alimentos, especialmente cuando se utilizan mezclándose con otras bacterias, levaduras y hongos (Rose, 1982).

Lactobacillus.

En los productos fermentados antes mencionados, el género *Lactobacillus* juega un papel importante. En la tabla 2 los lactobacilos se identifican como gram positivos, no formadores de esporas, catalasa negativos, usualmente no móviles y no realizan reducción de nitrato (Kandler y Weiss, 1986). Los lactobacilos en muchas especies son bacilos cortos, forman cadenas, son microaerofílicos, algunos anaerobios estrictos y fermentan azúcares para producir ácido láctico (Frazier y Westhoff, 1989). Los lactobacilos se dividen en dos grupos: homofermentativos, si producen al menos el 85% de ácido láctico desde glucosa, o heterofermentativos si producen además de ácido láctico, etanol, diacetilo, acetoina, 2,3 butanediol, acetaldehído y/o ácido acético (Starr y col., 1981). La presencia o ausencia de la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa es responsable de la diferencia entre homo y heterofermentativos; los heterofermentativos no tienen esta enzima, pero tienen una fosfoctolasa para romper hexosas y pentosas (Kandler, 1983).

Se ha visto que la regulación del catabolismo de carbohidratos es sensible a cambios de pH, modificándose así sus productos finales. Los lactobacilos homofermentativos pueden ser heterofermentativos en condiciones de alcalinidad (Tseng and Montville, 1993). Los lactobacilos tienen eficientes rutas de fermentación, acopladas a fosforilación por sustrato. No tienen superóxido dismutasa, catalasa o sistema de citocromos para realizar la fosforilación oxidativa y poseen en cambio flavín oxidasa, peroxidasa y una catalasa primitiva para la remoción del radical superóxido (Kandler, 1983).

Algunos lactobacilos requieren manganeso como cofactor para los sistemas enzimáticos como la lactato deshidrogenasa, RNA polimerasa y manganicatalasa, así como para remover radicales superóxido y para la degradación de peróxido de hidrógeno (Archibald, 1986).

TABLA 2. CLASIFICACIÓN EN GÉNEROS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS.

Género	Morfología	Tipo de fermentación	producción de Gas	anaeróbica
<i>Lactococcus</i>	pares o cadenas de cocos	Homofermentativas	No	Si
<i>Pediococcus</i>	cadenas de 4 cocos	Homofermentativas	No	Si
<i>Leuconostoc</i>	pares de cadenas de cocos	Heterofermentativas	Si	Si
<i>Lactobacillus</i>	redondos, bacilares y forman cadenas.	Homofermentativas Heterofermentativas	No Si	Si, anaerobios facultativos
<i>Bifidobacterium</i>	redondas polimorfas y	Heterofermentativas	No	No, anaerobios estrictos

Se presentan los criterios básicos en la clasificación de bacterias lácticas en 5 géneros distintos. Se consideran homofermentativas al convertir más del 85% de glucosa en ácido láctico. En *Lactobacillus* bajo condiciones anaeróbicas el piruvato puede ser oxidado por la piruvato deshidrogenasa NAD dependiente, liberando CO_2 , convirtiéndolo en acetato y acetilfosfato vía acetil CoA.

Lactobacillus amylovorus

Lactobacillus amylovorus fue aislado desde desperdicios de cereales. Esta bacteria crece en cadenas cortas, produce ácido láctico y pequeñas cantidades de ácido acético, no forma gas (CO_2) al metabolizar la glucosa y son negativas las actividades de oxidasa, catalasa y de reducción de nitrosos. Se considera como una bacteria láctica homofermentativa, crece hasta los 45°C , sin embargo no lo hace a 15°C . Al metabolizar la glucosa produce una mezcla racémica de ácido láctico D y L en proporciones iguales. El promedio de contenido de guanina y citosina es de 40.4%, las colonias crecidas en agar presentan un aspecto blanco, opaco y convexo. Esta cepa es susceptible a la presencia de SDS al 0.4%, NaCl al 8% y crece bajo condiciones anaeróbicas en un pH de 4.5 a 8. *L. amylovorus* requiere de los ácidos pantoténico, fólico y nicotínico, además de riboflavina para su crecimiento (Nakamura, 1981).

Muchos lactobacilos presentan buen crecimiento en leche descremada. Sin embargo esta especie no acidifica en leche, así como otros lactobacilos amilolíticos: *Lactobacillus amylophilus* (Nakamura and Crowell, 1979) y *Lactobacillus cellobiosus* (Sribir and Chakrabarty, 1984; 1987). La cepa de *L. amylovorus* NRRL-B-4540 no presenta plásmidos pequeños, aunque si se ha reportado la presencia de un plásmido críptico de aproximadamente 3 megapares de bases (Bohannon, 1985).

Se ha reportado que esta cepa secreta una alfa amilasa de alto peso molecular (Imam y col., 1991), que presenta un pH óptimo entre 5 y 5.5, temperatura óptima de 60-65° C y un peso molecular de aproximadamente 140 KDa. (Burgosa-Casler e Imam, 1991, Castillo y col., 1993). Se ha clonado y expresado el gen de α -amilasa en *Escherichia coli* y *Lactobacillus casei* (pLPCR2) en un fragmento de 6 kb (Jore y De Parais, 1993). Este gen de α -amilasa de *L. amylovorus* recientemente fue clonado e integrado en *Lactobacillus plantarum* (Fitzsimons y col., 1994).

β galactosidasa (E.C. 3.2.1.23) de E. coli.

La β galactosidasa está considerada dentro del grupo de las hidrolasas. Se trata de una enzima oligomérica con 4 unidades idénticas, cada monómero con un peso molecular de 116 kDa y 1023 aminoácidos. La β -galactosidasa remueve específicamente su monosacárido correspondiente desde los extremos no reductores de oligosacáridos (de aquellos extremos donde falta el átomo de carbono anomérico libre) de una manera análoga a la acción de las exopeptidasas en proteínas.

La lactosa (O- β -D galactopiranosil 1-4-D-glucopiranososa) o azúcar de la leche se presenta naturalmente en este alimento donde su concentración varía del 0 al 7%, dependiendo de las especies de la que se extrae. El carbón anomérico libre de este residuo de glucosa hace de la lactosa un azúcar reductor, lo mismo ocurre con algunos disacáridos comunes: maltosa y los productos de hidrólisis del almidón, como la isomaltosa a isómero α 1-6 y celobiosa isómero α 1-4.

La lactosa es transportada por una permeasa específica. El transporte ocurre contra un gradiente de concentración, transporte simporte acoplado, para lo cual la permeasa requiere de un residuo de His 322 para su actividad. En el sitio activo de *E. coli* está

implicado un grupo imidazol de un residuo de histidina y un grupo S de metionina. La β -galactosidasa puede tener 3 dominios, comprobado mediante estudios de complementación intracristónica con el fragmento carboxiterminal (α complementación).

Organización y control de los genes *lac* en *E. coli*.

El modelo de inducción más ampliamente aceptado es el propuesto por Jacob y Monod (1961), apoyado por muchas evidencias genéticas y fisiológicas. Los genes de la fermentación de lactosa de *E. coli* se encuentran organizados en una unidad denominada operón *Lac*:



En ausencia de lactosa u otro inductor, la expresión de un gen regulador "*I*" produce una proteína represora que tiene alta afinidad a la región operadora O del operón *Lac*. La unión del represor en el operador evita la transcripción por la ARN polimerasa de los genes estructurales. El encendido molecular operador- represor puede controlar los genes que se encuentran en el mismo cromosoma (acción *cis*). El elemento "*I*" puede actuar aunque se halle en distinto cromosoma, es decir tiene una acción *trans*. Cantidades suficientes de glucosa detienen la expresión de genes que especifican para las proteínas involucradas en la fermentación de numerosos azúcares incluyendo la lactosa, arabinosa y galactosa aunque estos estén presentes en grandes cantidades. Este fenómeno es conocido como represión por catabolito. En presencia de glucosa, los niveles de AMPc son bajos. La CAP (Proteína Activadora por catabolito), es un dímero idéntico de 210 residuos de aminoácidos, se une a AMPc en un complejo que estimula la transcripción de los operones reprimidos por catabolito (como es el caso del operon *Lac*). CAP es un regulador positivo en tanto que el represor *lac I* es un regulador negativo. Se ha observado que la represión por catabolito es independiente de la presencia del gen *lac I* (Loomis, 1964).

El sistema *Lac* es inducible mediante la adición de lactosa al medio, también pueden actuar como inductores los isómeros de la lactosa como la 1,6 aldolactosa originada por la transglicosilación de la lactosa. También tiene algunos inductores gratuitos y sintéticos tales como el IPTG, metil-B-D-tiogalactósido, 2-D-lactosa (β -O-D-galactopiranosil (1,4) 2 deoxi-D-glucopiranososa) y 2-F-lactosa (β -O-D-galactopiranosil (1,4) 2 deoxi-2-fluoro-D-glucopiranososa). El IPTG o isopropil- β -tiogalactósido se asemeja a la aldolactosa, pero éste no es degradado por la β -galactosidasa.

En presencia del inductor las proteínas del operón *Lac* de *E. coli* (β -galactosidasa, galactosidasa permeasa y tiogalactósido transacetilasa) son sintetizadas en proporciones molares de 10:5:2 respectivamente. Esta variación es consecuencia de sus diferentes secuencias Shine-Dalgarno. Alternativamente los ribosomas pueden unirse al ARNm en su gene *lacZ* y ocasionalmente desprenderse en respuesta a una señal de terminación (Iost y Dreyfus, 1995).

ω y α complementación de *lac Z* de *E. coli*.

El gen *lac Z* se comporta como dos segmentos distintos que determinan la estructura de polipéptidos diferentes que conforman el protómero de la β -galactosidasa. Entre el operador y el segmento ω existe una región que puede determinar para la síntesis de dos péptidos distintos. Se pueden distinguir dos niveles de arquitectura cuaternaria. La primera corresponde a la asociación de unidades desensambladas para formar el protómero de 116 kDa. La segunda es la asociación de protómeros para formar el tetrámero de 465 kDa., la única forma con actividad hidrolítica (Ullman y col., 1965). La enzima formada por complementación difiere de la enzima silvestre por su sensibilidad a la temperatura y a la urea .

El péptido ω (segmento distal del operador), tiene la propiedad de restaurar la actividad en mutantes *lac Z*-. El péptido ω tiene un peso entre 30 y 40 Kda que corresponde entre la tercera o cuarta parte del gen *lac Z*. Otro tipo de complementación que se ha caracterizado corresponde a un segmento α próximo al operador. Se ha encontrado que

este tipo de complementación es más débil en comparación a la complementación ω . La actividad del péptido α está asociada a un componente molecular de peso menor a 100 kDa. Los componentes α y ω corresponden a diferentes péptidos y ambos corresponden a la mitad del largo del gen estructural *lac Z* (Ullman y col., 1967).

Actividad enzimática en β -galactosidasas microbianas

En relación al mecanismo de la β -galactosidasa de *E. coli* con su sustrato se ha propuesto la transferencia del residuo galactosa de un galactósido a un aceptor (como agua, otro azúcar o alcohol) ocupando la galactosa y el aceptor una misma posición en la molécula enzimática. Aquí el aceptor entraría sólo después de haber sido removida la galactosa. El IPTG muestra que confiere protección a la β -galactosidasa contra la iodación y la proteólisis que la inactivan (Wallenfels y Weill, 1972). La β -galactosidasa de *E. coli* ha sido tratada proteolíticamente con elastasa, conservando la conformación cuaternaria y su actividad hidrolítica. En cambio, el tratamiento con quimotripsina reduce drásticamente la actividad (Lois y col., 1988). El tetrámero puede volver a formarse en presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} para que tenga actividad hidrolítica, ya que el monómero no presenta actividad enzimática.

La reacción enzimática puede ser afectada por diversos factores como el pH, la temperatura, tiempo de reacción y concentración de sustrato. El pH óptimo de reacción está en función del origen de la enzima. Las diferentes β -galactosidasas microbianas tienen características muy diversas mostradas en la tabla 3. Por ejemplo se conoce que la β -galactosidasa de *E. coli* tiene un pH óptimo de 7.0. Se ha propuesto que la dependencia de la actividad enzimática al pH está influenciada fuertemente por iones bivalentes (Wallenfels y Weill, 1972). En relación a la temperatura óptima de reacción, se reporta que las β -galactosidasas bacterianas muestran una mayor actividad a 37°C.

En términos de su peso molecular, éste varía desde 75 kDa para *Thermomyces lanuginosus* hasta 530-600 kDa de *Streptococcus thermophilus* y *Thermus aquaticus*. Sus condiciones óptimas varían considerablemente entre las distintas fuentes: las β -

galactosidasas de bacterias y levaduras tienen pH óptimo cercanos a la neutralidad, mientras que en hongos es entre 3.5 y 5.5. La temperatura óptima varía entre 37°C y 40°C en levaduras y bacterias, hasta 60-65 para *Aspergillus* y algunas bacterias termófilas. La β -galactosidasa de *T. aquaticus* tiene una temperatura óptima de 80°C. La temperatura óptima es un estrecho compromiso entre la actividad de la enzima que

TABLA 3. PROPIEDADES DE β -GALACTOSIDASAS DE DISTINTOS MICROORGANISMOS.

Microorganismo	pH óptimo	Temp. óptima	P. M. (kDa)	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	3-4	55-60°C	125	Wáclmer y Leube, 1979.
<i>Aspergillus oryzae</i>	4.5	48°C	105 Dímera	Tanaka y col., 1975
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	7.2	37°C	135	Dickson y Martin, 1979.
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6.2	50°C	201 dímero 10 subunid.	Sánchez y Castiño, 1980
<i>Candida pseudotropicalis</i>	7.5	30°C	215	Pedrique y Castiño, 1982
<i>E. coli</i>	7.2	37°C	465 tetramero	Wallerfels y Weil, 1972
<i>Bacillus</i> sp.	6.8	65°C	-----	Wallerfels y Mahotra, 1981.
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7	42-45°C	-----	Schmidt y col., 1989.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6.6	57°C	530 tetramero	Ramana y Dutta, 1981; Greenberg y Mahoney, 1982.
<i>Bacillus coagulans</i>	6	55°C	430	Levin y Mahoney, 1981.
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	9.7-7.2	--	75-80 subun. dímero	Fisher y col., 1995.

Se presentan los valores reportados para las β -galactosidasas caracterizadas de algunos microorganismos. Se proporcionan además las características del multímero de aquellas β -galactosidasas en donde se han encontrado. Al menos en *S. thermophilus* se ha determinado la presencia de un tetramero como en *E. coli*. La β -galactosidasa de esta última no presenta actividad en su forma de monómero, solamente cuando se encuentra agregada en el tetramero.

se incrementa con la temperatura y la desnaturalización de la enzima por efecto de la temperatura. En la tabla 4 se muestran los valores de Km y Vmax en distintas β -galactosidasas microbianas donde los valores de Km menores de 1 corresponden a *E. coli*, *S. thermophilus*, *Aspergillus oryzae* y *Candida pseudotropicalis*. Éste valor nos

indica la concentración del sustrato que se requiere cuando se ha alcanzado la mitad de la velocidad máxima de la reacción. Significa que si una enzima tiene un valor pequeño de K_m , ésta tiene una eficiencia catalítica máxima en concentraciones bajas de sustrato.

TABLA 4. PARÁMETROS CINÉTICOS DE β -GALACTOSIDASAS.

Microorganismo	K_m (mM) o/ONPG	V_{max} μ mg/prot.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0.66	193
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	1.7	89
<i>Escherichia coli</i> ATL	2.1	548
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	1.6	-----
<i>Aspergillus niger</i>	2.4	196
<i>Aspergillus oryzae</i>	0.72	-----
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	2.6-3	3×10^{-4} Min ⁻¹
<i>Candida pseudotropicalis</i>	0.66 -3 μ M	-----
<i>Bacillus coagulans</i>	4.2-8.6	-----
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	11.3	-----

La tabla muestra los valores de K_m y V_{max} obtenidos a partir de ensayos enzimáticos donde se usó el ONPG (orto-nitro-fenil-galactósido) como sustrato. Los valores de K_m y V_{max} son diferentes cuando se utiliza lactosa y otros azúcares como sustratos.

En las β -galactosidasas se ha encontrado que la reacción de hidrólisis puede ser reversible en ciertas condiciones para formar oligosacáridos. La tendencia de formar oligosacáridos es más alta en β -galactosidasas de levadura que en las de *A. oryzae*, y ésta tiene mayor actividad que *Aspergillus niger* (Prenosil y col., 1987). Se ha reportado además que la β -galactosidasa de *Cryptococcus laurentii* tiene una tendencia extraordinaria para la formación de oligosacáridos (Ohtsuka y col., 1990). En *Bacillus circulans* se han encontrado dos isoenzimas con actividad de β -galactosidasas, una tiene la tendencia de formar oligosacáridos y la otra no (Mozaffar y col., 1984).

La β -galactosidasa de diferentes organismos mostrados en la tabla 4 tienen valores pequeños de K_m , para el orto-nitro-fenil- β -galactósido, el para-nitro-fenil- β -

galactósido, y por el aril- β -galactósidos que por la lactosa (Wallenfels y Malhotra, 1961).

Aplicaciones de la β -galactosidasa.

La β -galactosidasa cataliza la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa. El ser humano al momento de su nacimiento posee la capacidad de producir suficiente cantidad de enzima para hidrolizar la lactosa presente en la leche materna (7.5 % aproximadamente). Dicha capacidad disminuye hasta alcanzar un nivel mínimo crítico, aproximadamente a los 4 años de edad (Palmer, 1981). La producción de la enzima varía de acuerdo al grupo étnico al que se pertenece, ya que se ha observado en general que los grupos étnicos con el hábito de consumo de lácteos en general son más tolerantes a este disacárido (Palmer, 1981)

Una de las aplicaciones más interesantes para las β galactosidasas microbianas es la obtención de leche deslactosada. La leche así modificada no produce los problemas de intolerancia antes mencionados ya que sus productos de hidrólisis son fácilmente asimilables por el organismo. La tecnología alimentaria ha desarrollado un tipo de leche, en la cual ha sido hidrolizada la lactosa enzimáticamente y actualmente es disponible en forma comercial

Otra aplicación es el procesamiento del suero de leche el cual es rico en lactosa y proteínas (Fox, 1991) para ser utilizados en la obtención de productos en la industria de la confitería, helados, panadería, aderezos y como sustitutos parciales de azúcar y de proteína. Las ventajas en la utilización del suero de leche son el mayor poder edulcorante por los productos de la hidrólisis (glucosa y galactosa) y la menor cristalización para la mejor solubilidad de estos productos.

La β galactosidasa es producida naturalmente por microorganismos tales como bacterias, hongos y levaduras, siendo las bacterias lácticas los microorganismos idóneos para ser utilizadas en la industria alimentaria por sus cualidades inocuas para el ser humano. Las

bacterias lácticas pueden ser hospederos de genes de interés industrial y la β -galactosidasa puede servir como un marcador genético de grado alimenticio en los vectores que se utilizan en éstas.

Metabolismo de carbohidratos en bacterias lácticas.

La eficiencia del crecimiento de las bacterias lácticas durante las fermentaciones depende de su capacidad para degradar grandes moléculas y de la eficiencia con que transportan estos productos. Los sistemas de transporte activo son clasificados acorde al modo de acoplar la energía, el transporte activo en bacterias lácticas puede ser subdividido en tres diferentes mecanismos (Poolman, 1993):

- ATPasa que transportan azúcares. Se utiliza la energía liberada durante la hidrólisis de ATP para transportar solutos vs. gradiente de concentración..
- Ion- unido al soluto (azúcar) y mecanismos de intercambio de azúcares. La unión del ion al soluto en sistemas simporte y antiporte, así como los sistemas de intercambio entre precursores y producto.
- PTS dependiente de PEP. Se ha observado que el transporte de carbohidratos involucra la translocación de grupos fosfato del fosfoenolpiruvato hacia los azúcares para que éstos queden fosforilados como en el sistema de fosfotransferasa de *Bacillus*.

Los azúcares comúnmente son transportados gracias a la transferencia del grupo fosfato, en tanto que la mayoría de aminoácidos son transportados por sistemas de transporte secundario. Los *lactobacilli* transportan la mayoría de los azúcares y oligosacáridos por permeasas específicas y pueden ser fosforilados en el interior. Los oligosacárido son hidrolizados por gluconidasas específicas antes de ser fosforilados (Thompson, 1987).

Las dos grandes rutas de degradación de azúcares entre bacterias lácticas son la glucolisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas (en *Lactobacillus delbruecki* y *L. helveticus*) y la ruta de fosfoctolasa (*Leuconastoc sp.*, *L. buchneri* y *Lactobacillus*

brevijs o ambas (*L. casei*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus*) (Kandler, 1983).

Las bacterias lácticas producen L(+) o D(-) lactato o ambos isómeros. Los lactobacilos producen tanto L-lactato como D-lactato. La lactato deshidrogenasa (LDH) es activada por fructuosa 1,6, difosfato y tagatosa 1,6 difosfato. El manganeso también actúa como activador alostérico de la L-LDH dependiente de NAD en lactobacilos (Hensel y col, 1977).

Metabolismo de lactosa en bacterias lácticas.

PTS-PEP y fosfo- β -galactosidasa

Las bacterias lácticas transportan lactosa utilizando el sistema fosfotransferasa PEP (Phosphoenol pyruvate) lactosa, PEP-PTS, o lactosa permeasa. El sistema PEP-PTS para lactosa y la fosfo- β -galactosidasa son un requisito para la rápida fermentación homoláctica en estas bacterias. Las cepas mesofílicas tienen actividad alta de P- β -galactosidasa en tanto que las termofílicas tienen alta actividad de β -galactosidasa (ver figura 1). La presencia del sistema PTS-PEP y la P- β -galactosidasa son un prerrequisito para la rápida fermentación homoláctica mesofílica. Aunque la lactosa es un producto animal, no se espera que se encuentre la actividad de β -galactosidasa entre los estreptococos mesofílicos lácticos que regularmente habitan en vegetales y los intestinos de termitas. Esto explica por qué estas cepas, que crecen en fermentaciones naturales, tienen un tipo de fermentación heteroláctica y no degradan la lactosa tan rápidamente como las cepas industriales lácteas (Stokes y col., 1985). *Lactococcus cremoris* y *L. lactis* utilizan principalmente β -galactosidasa y también presentan niveles significativos de P- β -galactosidasa. Aunque se ha reportado que la actividad de una fosfatasa alcalina puede degradar ONPG-P a ONPG y ocurrir la subsecuente hidrólisis por parte de la β -galactosidasa. *S. thermophilus* sólo tiene una β -galactosidasa, en este caso la galactosa es secretada debido a los bajos niveles de las primeras enzimas de la vía de Leloir en esta cepa (ver figura 3). La lactosa y galactosa inducen

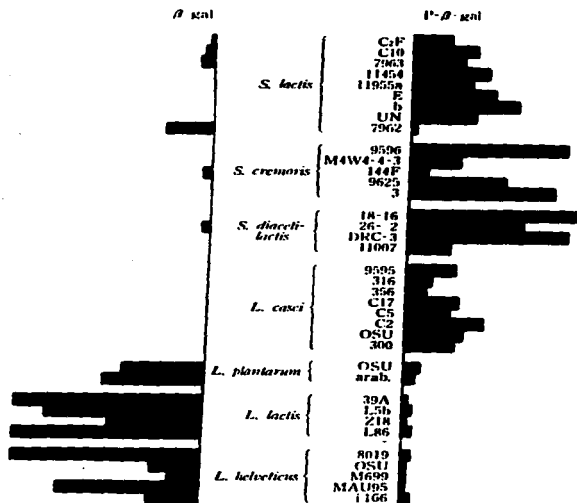


Fig. 1 Actividades de β -galactosidasa (β -gal) y fucos- β -galactosidasa (fuc- β -gal) que presentan las bacterias lácticas. Se indican en cada especie las distintas cepas que presentan actividad para una o ambas enzimas. Las barras negras representan el porcentaje de actividad con respecto a las cepas con mayor actividad como *Lactococcus lactis* 39A y *Streptococcus cremoris* 9596 (Nakazawa, 1992).

la actividad de β -galactosidasa y el IPTG es reportado como inductor gratuito en *L. lactis* pero no es así en el caso de *S. thermophilus*. Ambos presentan represión por glucosa. El sistema PTS-PEP es más eficiente, consiste de 2 proteínas citoplasmáticas E I y Hpr, dos componentes específicos para lactosa Lac E anteriormente llamada enz II^{lac}

y Lac F anteriormente denominada enz III^{lac}. Asimismo, la presencia de las enzimas de la ruta de la D-tagatosa permite la utilización de la galactosa (Lawrence y Thomas, 1976).

El transporte de azúcares mediado por el sistema PEP-PTS involucra la transferencia del grupo fosforil de las enzimas E1 y Hpr a los componentes específicos de la fosforilasa FIII^{lac} como se muestra en la figura 2 cuando la lactosa es introducida y fosforilada por el transportador II^{lac}. En estas enzimas se transfiere el grupo fosfato a un residuo de histidina. En bacterias gram-positivas la enzima Hpr es fosforilada en un residuo de serina por una proteína cinasa ATP dependiente. Esta fosforilación, aunque no es en el grupo fosfato transferible, sí modula la actividad del sistema fosfotransferasa. El transportador II^{lac} se encarga de transferir el grupo fosfato proveniente del PEP a la lactosa. El complejo II^{lac} y FIII^{lac} pueden también catalizar la expulsión de galactósidos libres formados intracelularmente.

Cuando la lactosa es introducida por el PEP-PTS mediante el II^{lac} y FIII^{lac} (Lac E y Lac F respectivamente) tiene una fosforilación intracelular que genera lactosa-fosfato. En la figura 3 se observa que la lactosa-fosfato es hidrolizada por la fosfo- β -galactosidasa (Lac G) que produce glucosa y galactosa-6-fosfato (Thompson, 1980). La glucosa es metabolizada vía glucólisis y la galactosa 6 fosfato es metabolizada hacia la ruta de la tagatosa por la D-galactosa-6-fosfato-isomerasa (Lac AB) que la convierte en D-tagatosa-6-fosfato. Esta última es fosforilada por la D-tagatosa-6-fosfato cinasa (Lac C) a D-tagatosa 1,6 bifosfato y escindida a triosa-fosfato por la D-tagatosa 1,6 bifosfato aldolasa (Lac D) para formar dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato (Bissett y Anderson, 1974; Rutger y col., 1991).

Las reacciones para transportar y catabolizar lactosa constituyen un ciclo anabólico continuo al constituirse en una parte catabólica y otra anabólica, en el cual se producen ácido láctico y ATP. La formación de PEP es una encrucijada, la cual puede utilizarse para el transporte de lactosa o para la síntesis de ATP mediada por la piruvato cinasa, la

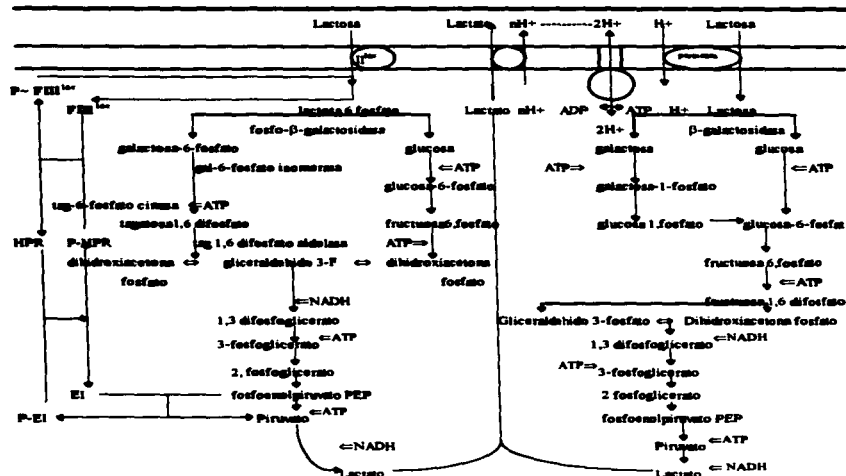


Fig. 3 Sistemas de transporte de la lactosa y su degradación en bacterias. Se observan las rutas para la conversión de lactosa-6-fosfato y lactosa en lactato. La galactosa-6-fosfato es convertida en gliceraldehído-3-fosfato a través de la ruta de Leloir. La galactosa es convertida hasta glucosa-6-fosfato por los enzimas de la ruta de Leloir. El sistema de transporte de lactosa (LacIac) es dependiente del fosfoenolpiruvato, donador del grupo fosfato para los enzimas que se encargan de fosforilar la lactosa introducida. Tomado de De Vos and Simons, 1988.

cual controla la utilización de PEP. La piruvato cinas está controlada por efectores negativos, como el fósforo inorgánico, y positivos, como la fructosa difosfato. El PEP sirve como donador fosforil mediante la fosforilación intracelular vía manosa-PTS y la salida y entrada de glucosa por la PTS manosa (Renauk, 1988).

L. casei transporta la lactosa y la galactosa mediante el sistema PEP-PTS, que es inducido por galactosa y lactosa, y reprimido por galactosa-6-fosfato y altas concentraciones de glucosa (Mckay y col., 1970; Chassy y Thompson, 1983).

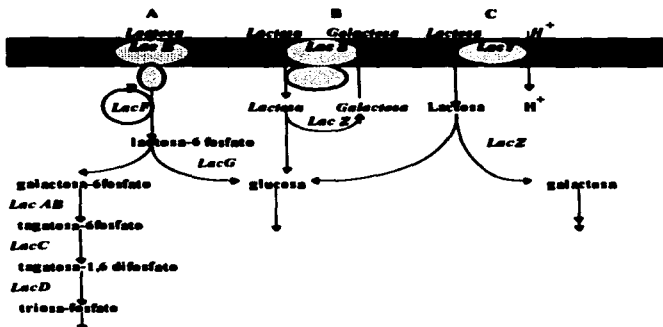


Fig. 3 Sistemas de transporte para lactosa en bacterias lácticas y ruta de la tagatosa-6-fosfato en las que participan los enzimas del operón Lac de *Lactococcus lactis*. A) Sistema PTS caracterizado en *L. lactis* y *Lactobacillus casei*. B) Sistema autotransporte lactosa-galactosa caracterizado en *Streptococcus thermophilus* y otras bacterias lácticas. C) Sistema autotransporte Lactosa-H⁺ característico de *Escherichia coli* y *Lactococcus lactis* cepa ATCC7962. Tomado de De Vos and Vaughan, 1994.

Sistema permeasa y β -galactosidasa

Cuando la lactosa es introducida por una permeasa específica e hidrolizada por la β -galactosidasa (Premi y col., 1972) la galactosa que se produce se metaboliza a través de la ruta de Leloir, donde es fosforilada y convertida a glucosa-6-fosfato y fermentada vía glucólisis a piruvato como se aprecia en la figura 2 y 3. La β -galactosidasa es inducible en estas células por galactosa y lactosa (Kilara y Shahani, 1976).

Las enzimas de la ruta de Leloir incluyen la galactocinasa (Gal K), que fosforila la galactosa en su C1, la galactosa-1-fosfato uridil transferasa (Gal T), la UDP glucosa 4 epimerasa (Gal E), la UDP glucosa sintetasa (Gal U) y la fosfoglucomutasa. Como sus reacciones son reversibles, es posible la síntesis de UDP galactosa en ausencia de galactosa exterior, la cual puede ser utilizada en la síntesis de polisacárido complejos al exterior. La glucosa actúa en forma similar que en *E. coli*, provocando represión por catabolito aun en presencia de lactosa o galactosa.

Biología molecular en bacterias lácticas.

En bacterias lácticas los estudios en biología molecular han tenido un lento avance en cuanto al desarrollo de vehículos moleculares para la transformación de estas bacterias que permitirá aumentar su uso potencial en biotecnología. Uno de los impedimentos para la investigación en bacterias lácticas han sido los métodos de transformación genética. Es importante para la tecnología del ADN recombinante contar con un método con alta frecuencia de transformación. Con este fin se han utilizado la formación de protoplastos, conjugación, transducción y la electroporación (McKay y Baldwin, 1990). Así mismo se han optimizado los protocolos de extracción de ADN para estos microorganismos.

Algunas bacterias lácticas poseen plásmidos que son candidatos para realizarles estudios genéticos dada la facilidad para aislarlos y ser caracterizados. Estos plásmidos pueden ser utilizados como vectores de clonación y para la amplificación de algún producto génico, se extienden también hacia otras bacterias lácticas. En tanto que las cepas de *Leuconostoc* que participan en fermentaciones lácteas tienen un número alto de

plásmidos, las cepas de *Lactobacillus* contienen pocos o carecen por completo de ellos (Orberg and Sandine, 1984; Davies and Gasso, 1981). Chassy y col. (1976), fueron los primeros en notar la presencia de plásmidos en este género. Los plásmidos incluyen los genes involucrados en el metabolismo de la lactosa, resistencia a drogas, producción de ácido láctico y glucosamina. Junto con Lee Wicker establecieron un protocolo para la producción, transformación y regeneración de protoplastos. (Chassy y col., 1976; Lee-Wicker y Chassy, 1984). En 1993 se presentó la primera secuencia de un gene de importancia industrial: la proteinasa lactococcal (Gasso, 1993). Asimismo la maquinaria proteolítica continúa siendo caracterizada tanto bioquímica como genéticamente. Las enzimas proteolíticas tienen un gran potencial para el desarrollo de sabores y la maduración de quesos. Otra preocupación al respecto es solucionar los problemas ocasionados por los bacteriófagos durante las fermentaciones. En este sentido, la caracterización molecular de bacteriófagos y la búsqueda de genes que proporcionen resistencia a la infección por los mismos se ha desarrollado ampliamente (Batish, 1989; Sabine, 1963; Shahani, 1976; Reddy, 1971). La investigación en bacterias lácticas aumentó exponencialmente durante la década de los 80's. Ahora se tienen caracterizadas en estas bacterias distintos tipos de bacteriocinas incluyendo el grupo de bacteriocinas termostables (McKay y Baldwin, 1990). Otro avance ha sido la aplicación de la ingeniería genética para alterar el flujo de las rutas metabólicas, siendo el primer ejemplo la manipulación de la ruta para la producción de diacetilo. Otro avance notable ha sido el creciente interés por la investigación básica en bioquímica y genética de bacterias lácticas. Un ejemplo de esto ha sido el análisis detallado de los genes para la síntesis de aminoácidos (Bardowski y col., 1992, Delorme y col., 1992, Godon y col., 1992). Actualmente también se están desarrollando las técnicas para el mapeo físico y genético del cromosoma de *Lactococcus*, sentando las bases para el análisis completo del genoma en estos microorganismos (Tulloch y col., 1991; Le Bourgeois y col., 1992). Posteriormente la técnica conocida como electroporación facilitó la transferencia de material genético en bacterias lácticas (McKay y Baldwin, 1990). Algunas de las innovaciones o beneficios que se pueden obtener mediante el uso de la tecnología del

ADN recombinante en estos microorganismos, son:

- Resistencia a bacteriófagos.
- Resistencia a antibióticos.
- Superproductores de bacteriocinas.
- Cepas que produzcan o no polisacáridos aglutinantes.
- Sobreproductoras de diacetilo.
- Mejores colonizadores del tracto gastrointestinal en el caso de ciertos lactobacilos.
- Detoxificadores de procarcinógenos y carcinógenos.
- Catalasa y superóxido dismutasa positivo.
- Recipientes de sabor y de genes que sintetizan algún medicamento o vacuna.
- Aceleración en la maduración del queso.

Otras de las aplicaciones de la clonación de genes de bacterias lácticas es la construcción de vectores de grado alimenticio. Un problema que la biología molecular enfrenta es el impedimento para liberar microorganismos recombinantes al ambiente o en procesos de producción por ser portadores de genes para la resistencia a antibióticos. La respuesta ante esto ha sido la generación de vehículos moleculares con genes inocuos como marcadores genéticos de fácil identificación.

Estos vectores están basados en la utilización de genes que codifiquen para enzimas metabólicas, hidrolasas y de resistencia natural a antimicrobianos. Estos remplazan los otros sistemas de clonación donde se utilizan marcadores con resistencia a antibióticos, poco seguros para ser utilizados en la industria de alimentos. Los vectores de grado alimenticio pueden ser utilizados para transformar microorganismos que participen en fermentaciones de alimentos, y los genes para la utilización de carbohidratos son marcadores de selección adecuados para este propósito. Se han clonado genes de bacterias lácticas que podrían ser utilizados como marcadores de selección en la construcción de vectores, tales como: genes de lactosa (De Vos col., 1989), sacarosa (Rauch y De Vos, 1992) y resistencia a nisina (Hughes y McKay, 1992). Cada día se incrementan el número de contribuciones a la genética de *Lactobacillus*. El gen de α -amilasa de *L. amylovorus* (Jore y De Parais, 1993) también puede ser utilizado como

marcador genético en la construcción de un vector de grado alimenticio. Se ha establecido un sistema con *Lactobacillus helveticus* como hospedero del vector pBG10 que contiene el gen de β -galactosidasa de *Lactobacillus bulgaricus* y la α -amilasa de *Bacillus licheniformis*. Ambos genes se expresan y uno de ellos puede ser interrumpido por la clonación de fragmentos de ADN, donde la detección las bacterias transformadas con inserto es fácil. Este sistema de hospedero-vector resulta adecuado para la clonación y expresión de genes heterólogos en *L. helveticus* para aplicaciones en la industria de alimentos (Honoo y col. 1992).

Organización de los genes del sistema PTS-PEP y P- β -galactosidasa en bacterias lácticas.

En *Lactococcus lactis* se clonó por primera vez un gene heterólogo de P- β -galactosidasa estreptococcal. En los primeros experimentos realizados en *Streptococcus sanguis* con la clonación del gen de P- β -galactosidasa, se detectó la actividad gracias a que éste puede introducir la lactosa por la vía PTS-PEP. Sin embargo se presentaba inestabilidad plasmídica y pérdida de los genes clonados debido a integración en el cromosoma de *S. sanguis*. Al emplearse *E. coli* como hospedero para el estudio de genes de P- β -galactosidasa no se encontraron estos problemas de integración al cromosoma. Sin embargo en *E. coli* no se fermenta la lactosa por la vía PTS-PEP y muestra una actividad de P- β -galactosidasa no significativa.

La P- β -galactosidasa de *L. lactis* y la β -galactosidasa de *S. thermophilus* fueron los primeros genes en ser clonados y ahora se encuentran bien caracterizados

Muchas cepas de *L. lactis* portan en plásmidos la información genética para el sistema PTS-PEP. Asimismo los genes de las enzimas de la vía de la tagatosa se pueden encontrar cercanos a los genes del transporte de lactosa y la misma P- β -galactosidasa. Con una organización muy parecida entre diferentes bacterias lácticas, a excepción de *Lactobacillus*. Los determinantes genéticos del grupo que transporta la lactosa y el sistema secundario de transporte han sido identificados como *lac R*, *lac E*, *lac F*, *lac AB*, *lac C* y *lac D*.

El gen *lac R* codifica para una proteína dimérica de 28 kDa similar a algunos represores de *E. coli*. En *L. lactis* la tagatosa 6 fosfato es el principal inductor y no la galactosa 6 fosfato.

Los genes *lac E* y *lac F* forman las proteínas que se encargan del transporte de la lactosa en tanto que *lac AB*, *lac C* y *lac D* formaran las enzimas correspondientes a la ruta de la tagatosa para la conversión de galactosa. En la figura 4 se muestran estos genes organizados en un operón en *L. lactis*, ya que se ha identificado la presencia de un gen regulador que actúa sobre ellos. La proteína *lac R* que produce dicho gen es muy similar a los represores que se encuentran en *E. coli*. El gen *lac R* es inducido durante el crecimiento en lactosa, existen al menos 2 operadores en el promotor *lac* con diferente afinidad por *lac R* (*lac O1* y *lac O2*). El primero con una alta afinidad y el segundo con una afinidad más baja para *lac R*. Se ha propuesto que el gen *lac R* en ausencia del inductor se une al operador *lac O1*, reprime la transcripción de *lac A* y activa a su vez su propia transcripción. Un incremento en la proteína provocaría la unión de ésta al operador *lac O2* impidiendo o pasando la transcripción de *lac R*. En presencia del inductor, en cuanto se produce tagatosa-6-fosfato, el producto de *lac R* se separa de ambos operadores permitiendo la transcripción de los genes del operón (De Vos y Vaughan, 1994). Esta organización del operón *lac* se comparte entre *L. lactis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*.

Solamente en *L. casei* se han encontrado diferencias en su organización. El gen *lac F* se encuentra al final del operón y no el gen *lac G*, como en los anteriores. Además incluye el gen *lac T* que guarda similitud con proteínas terminadoras de la transcripción. En este caso, la transcripción puede estar regulada a nivel de fosforilación por *lac T*. Este gen es regulado en su transcripción por una secuencia terminadora y la proteína puede ser inactivada por fosforilación por parte de la β -glucosidasa PTS. La tagatosa y la galactosa no son inductoras de este operón para el caso de *L. casei*. Asimismo los genes de la ruta de tagatosa no forman parte de este operón.

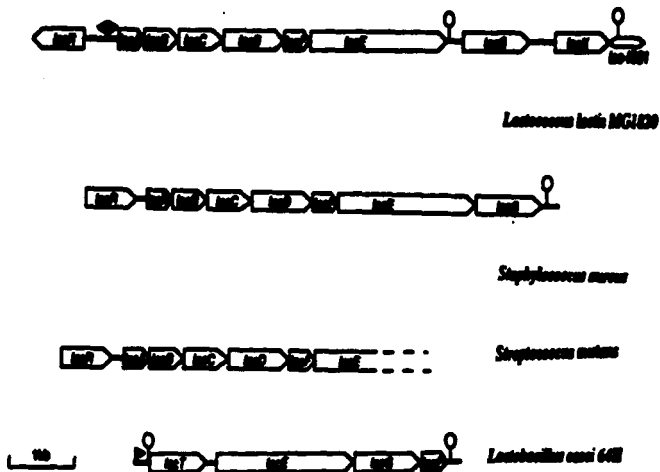


Fig. 4 Organización de los genes *lac* de bacterias lácticas y otras relacionadas, que participan en el sistema *lactoferrina* (PTS) dependiente de piruvato y *lacto-β-galactosidasa*, así como las enzimas de la ruta de *lactosa*. Las flechas muestran la localización de los promotores y el sentido en que se transcriben las genes, así también las asas indican los terminadores de transcripción. Los genes que se muestran en las esquemas corresponden: *lacA* y *lacB*: galactosa 6 fosfato isomerasa, *lacC*: captaosa 6 fosfato cinaso, *lacD*: captaosa 1,6 difosfato aldolasa, *lacF*: *F* *omnina* III A^{lac} del sistema PTS, *lacE*: *E* *enzima* HBC^{lac}, *lacG*: *lacto-β-galactosidasa*, *lacX*: gen regulador, *lacR*: gen regulador y *lacY*: autorregulador. (De Vos and Vaughan, 1994)

Organización de los genes del sistema permesa- β -galactosidasa en bacterias lácticas.

El sistema permesa- β -galactosidasa forma parte de una organización modular entre bacterias lácticas. En la fig. 5 se observa que *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* tienen el gen *lac S* adyacente al *lac Z*, a diferencia de *L. lactis* en el cual no se ha descrito la presencia de un gen *lac S*. A pesar de que en la cepa de *L. lactis* ATCC7962 o NCDO2054 se ha descrito la utilización de lactosa, gracias a la presencia de una β -galactosidasa bien regulada en su expresión. Curiosamente se trata de una cepa atípica no láctea donde se estudió también el transporte de galactosa acoplado a protones. El gen de *lac Z* de *L. lactis* NCDO2054 se encuentra flanqueado por ORF's similares a los que se presentan en la organización de un operón, tiene un gen *lac A* adyacente a *lac Z* y muy similar al gen *lac A* de *E. coli* que codifica para una tiogalactosidasa.

L. lactis presenta también el gen de *lac S*, aunque no está adyacente a los genes que codifican para la β -galactosidasa (*lac L* y *M*), pero es el único donde se ha encontrado dicho gen. *L. casei*, *L. helveticus* y *L. lactis* requieren de dos genes para la expresión de polipéptidos que constituyan una β -galactosidasa activa.

Por otra parte, aparecen designados como *gal T* y *gal T^a* los genes que corresponden por comparación de secuencias de aminoácidos a galactosa 1 fosfato uridil transferasa (*L. helveticus*) y hexosa 1 fosfato uridil transferasa (*Streptomyces sp.*), respectivamente (Pridmore y col., 1991).

Clonación de los genes de β -galactosidasas de bacterias lácticas.

Se han clonado distintos genes de β -galactosidasa provenientes de varias especies de bacterias lácticas. En los trabajos reportados se han descrito dos tipos de genes para β -galactosidasa: los genes *lac Z* y los *lac L - M* (ver tabla 5). En algunos trabajos también localizaron el gen *Lac S* que codifica la permesa específica para lactosa, y los genes de las enzimas correspondientes a la ruta de Leloir. Entre las peculiaridades de estos genes *lac* se han encontrado: mutaciones espontáneas (que producen delecciones en el gen), sobreposición de genes y secuencias de inserción. Se describen a continuación las

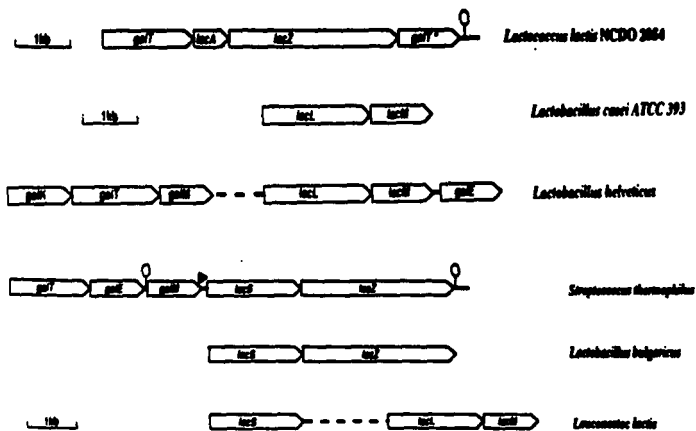


Fig 5. Organización de los genes *lac* y *gal* en bacterias lácticas que forman parte del sistema β -galactosidasa. *L. lactis* NCDO 2854 no contiene un gen *lac S* como tal, las diferencias de los genes *gal T* y *gal P* se explica en el texto. Junto con *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*. Muestran una organización muy parecida en la que aparece un gen *lac Z* único que codifica para la β -galactosidasa. En cambio, el grupo conformado por *L. lactis*, *L. casei* ATCC393 y *L. helveticus* presentan dos genes; *lac I* y *lac II*, ambos polipéptidos conforman la β -galactosidasa activa (De Vos and Vaughan, 1994).

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

particularidades de los genes *lac* clonados y los porcentajes de similitud que presentan en sus secuencias.

Streptococcus thermophilus.

El gen *lac S* codifica para la permeasa que transporta lactosa en *S. thermophilus* y ha sido clonado por complementación en una cepa *lac Y1*, mutante de *E. coli*. Este forma parte de un operón que comprende el gen de β -galactosidasa (*lac Z*). Ambos son transcritos por un promotor anterior a *lac S*. Antes del promotor se han localizado los

TABLA 5. GENES DE β -GALACTOSIDASAS DE BACTERIAS LÁCTICAS

Microorganismo	Tamaño del gen o fragmento clonado	Vector de clonación	Localización	Característica.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3,850 pb	pBR322	Cromosomal	Tipo <i>lac Z</i>
<i>Leuconostoc lactis</i>	5,800 pb	pACYC184	plásmido pNZ63	Tipo <i>lacM</i> y <i>lacL</i> Sobrelapados
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	3,024 pb	pKK223-3	cromosomal	Tipo <i>lacZ</i> , con mutaciones espontáneas
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,175pb	-----	plásmido	Tipo <i>lac L</i> y <i>lac M</i> sobrelapado
<i>Lactobacillus sake</i>	8,650 pb	pRB473	cromosomal	Tipo <i>lac L</i> y <i>lac M</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	-----	-----	cromosomal	Tipo <i>lacL</i> y <i>lacM</i> con mutaciones espontáneas
<i>Lactobacillus casei</i>	5,100 pb	pBS200	plásmido pLZ15	Tipo <i>lac L</i> y <i>M</i>

Se muestran en la tabla las características principales de los genes *lac* de bacterias lácticas, especificando la localización del gen y el tipo *lac Z* y *lac L-M*. En varios de estos genes no se tiene el tamaño real del ORF correspondiente, sino se tiene referencia sobre el tamaño del fragmento clonado.

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

genes que codifican para la UDPglucosa-hexosa-1-uridil transferasa (*gal T*) UDPglucosa-4-epimerasa (*gal E*) y aldosa epimerasa o mutarotasa (*gal M*). Gal E y Gal T son enzimas de la ruta de Leloir para el metabolismo de galactosa, a pesar que *S. thermophilus* presenta un fenotipo gal⁻, por lo que se supone que estas enzimas actúan en la síntesis de polisacáridos. Todos estos genes responden al mismo mecanismo de inducción que los genes *lac* (Herman y McKay, 1986).

Lactobacillus bulgaricus

Los genes de *lac Z* y *lac S* de *L. bulgaricus* de las cepas 31 y ATCC11842 fueron clonados al mismo tiempo y se encontraron en sus secuencias diferencias mínimas. Ambos fueron expresados en *E. coli* (Leong-Morgenthaler y col., 1991). Los genes fueron obtenidos de bancos genómicos, pero el aislamiento de los genes *lac S* se realizó mediante PCR, ya que la clonación directa resultaba ser difícil.

La organización del operón resulta ser análoga a la de *S. thermophilus*. Aparentemente, a pesar de la existencia de secuencias muy parecidas a proteínas reguladoras, se cree que no actúa como represor para este sistema, dado la expresión constitutiva en *L. bulgaricus* (Pootman, 1993). Se ha observado que son esenciales 2 histidinas para la actividad de la β -galactosidasa que resultan ser las mismas en posición que en *E. coli* (Moon y col., 1994).

Sin embargo las cepas comerciales pierden su capacidad para transportar o hidrolizar lactosa. Se ha determinado la aparición de mutaciones espontáneas que producen deleciones en el gen *lac Z*, las que pueden ser inclusive de varias kilobases (Molly y Delley, 1990). En estas mutantes es interesante notar que, además de la deleción en *lac Z*, tienen un fenotipo proteasa (-). Se sugiere que los genes correspondientes pueden estar próximos al gen de *lac Z*.

Leuconostoc lactis

La lactosa hidrolizada por la β -galactosidasa se convierte en glucosa, para seguir la ruta de fosfoctolasa, y en galactosa, que será convertida en un intermediario glucolítico por la ruta de Leloir. *L. lactis* tiene los genes de transporte e hidrólisis de lactosa en el plásmido pNZ63, asimismo los genes para la utilización de galactosa. La permeasa Lac

S de *L. lactis* mantiene parecido en tamaño a las permeasas reportadas para *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*. En el caso del gen *lac Z* este se compone de 2 genes sobrepuestos, designados como *lac L* y *lac M*, que codifican para 626 y 321 aminoácidos respectivamente. Ambos son requeridos para la formación de una β -galactosidasa funcional que consiste de 2 subunidades (David y col., 1992). Se plantea que la traducción del gen *lac M* es acoplada al de *lac L*.

***Lactobacillus helveticus*.**

A diferencia de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, el gen de la permeasa no ha sido clonado y parece no formar parte del operón de *Lac*. La β -galactosidasa se identificó, resultando ser un gen de naturaleza similar a los genes *lac L* y *lac M* (Zwahlen y Mollet, 1993). También algunos estudios muestran que estos genes son susceptibles de tener mutaciones espontáneas como *L. bulgaricus* y presentar secuencias IS (secuencias de inserción).

***Lactobacillus plantarum*.**

El gen *lac Z* de *L. plantarum* se encuentra en un plásmido y presenta una región sobrepuesta comprendida entre 254 y 688 pb, de un fragmento de 1175 pb, mismo que ha sido registrado en el Genebank como gen *lac Z*.

***Lactobacillus sake*.**

La β -galactosidasa de *Lactobacillus sake* DSM20017 es codificado por dos genes cromosomales localizados en un fragmento digerido con HindIII de 8.65 kb, clonado en el vector pRB473. El transcrito que produce es un ARNm de aproximadamente 2.9 kb. Estos dos genes sólo muestran similitud del 18 al 59% con otras β -galactosidasas. Asimismo, se presentan secuencias inversas repetidas de 9-12 pb. Conserva la misma distribución de aminoácidos que la β -galactosidasa de *L. lactis*, lo que sugiere un origen común (Obst y col., 1993).

***Lactobacillus casei*.**

Aunque no existe una publicación acerca de una β -galactosidasa de *L. casei*, varios artículos citan que ésta se encuentra clonada y que se trata de una proteína

heterodimérica $\alpha_2\beta_2$ de 220 kDa, codificada en un plásmido de 28.3 k.pb (Chassy citado por Mercanier y col., 1993)

Ambas clases de genes (*lac M-lac L* y *lac Z*) determinan para enzimas similares entre ellos y la β -galactosidasa de *E. coli*. Asimismo la β -galactosidasa de *Leuconostoc* tiene más similitud con la de *Clostridium acetobutylicum*, también clonada en *E. coli* (Hancock y col., 1991). Los genes *lac* en bacterias lácticas tienen una organización modular. Esta característica parece recién adquirida por posible transposición horizontal de los genes *lac*. También la presencia de estos genes en elementos como plásmidos conjugables, epítomos u otros elementos móviles o elementos I.S. adyacentes a los genes *lac* apoyan esta teoría.

En *L. bulgaricus* se ha detectado el elemento ISL3 de 1494 pb y rodeado de ISR (secuencias inversas repetidas imperfectas de 38 pb). Estos elementos ISL tienen gran similitud con transposasas reportadas (Germond y col., 1995). También en *L. helveticus* se ha reportado el elemento ISL2, de 858 pb, también con ISR perfectas de 16 pb (Zwahlen y Mollet, 1994).

La comparación de secuencias de los genes *pbg* de *L. casei*, *L. lactis* y *S. aureus* comparan un alto nivel de similitud y las proteínas producidas tienen similitud estructural entre sí (tabla 6). Los genes encargados del transporte PTS-PEP muestran gran similitud entre *L. lactis* y *S. aureus*, especie en la que se ha descubierto este sistema de transporte.

TABLA 6. SIMILITUD ENTRE GENES DEL SISTEMA PTS-PEP Y FOSFO- β -GALACTOSIDASA

%	<i>L. lactis/L. casei</i>	<i>L. lactis/S. aureus</i>	<i>L. casei/S. aureus</i>
<i>lac F</i>	45%	79%	47.5%
<i>lac E</i>	48.3%	71.6%	45.3%
<i>lac G</i>	54.7%	82.3%	53.6%

Comparación entre los genes *lac* de *L. lactis*, *L. casei* y *S. aureus*: *lac F* enzima II A^{lac} del sistema PTS, *lac E* Enzima IIBC^{lac} y *lac G* fosfo- β -galactosidasa.

En el caso de los genes *lac Z* de bacterias lácticas, que presentan un gen estructural único el cual se encuentra codificado en el cromosoma. Se esperaba para las

modalidades de genes *lac L* y *lac M* aparecen generalmente en plásmidos. Sin embargo, se han detectado genes *lac L* y *lac M* en *L. sake* y *L. helveticus* de origen cromosomal (tabla 5). Estos genes *lac M* y *lac L* guardan una similitud del 99% entre *L. lactis* y *L. casei* como se aprecia en la tabla 7. En el caso de *S. thermophilus*, el gen de *Lac Z* tiene una similitud del 42% con el gen *lac Z* de *C. acetobutylicum*, más alta en comparación con otras bacterias lácticas que son especies más cercanas. El gen de *lac Z* de *L. bulgaricus* comparte 40 % de similitud con el de *Clostridium* y 45.5% con *S. thermophilus* (Schroeder, 1991).

TABLA 7. SIMILITUD ENTRE LOS GENES *LAC Z* DE BACTERIAS

%	<i>L. lactis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>C. acetobutylicum</i>	<i>E. coli</i>
L.l.	100%				
S.t.	33.3%	100%			
L.b.	28.2%	45.5%	100%		
C.a.	36.2%	42.0%	40%	100%	
E.c.	22.7%	27.4%	27%	28.3%	100%
L.casei	99%	-----	-----	-----	-----

Comparación de los genes *lac Z* de bacterias lácticas con *E. coli* y *C. acetobutylicum*, donde se observa el mayor grado de similitud entre los genes *lac Z* de bacterias lácticas con *C. acetobutylicum*.

OBJETIVOS.

El presente trabajo tiene por objetivos realizar la clonación del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli* y analizar la expresión del gen en este hospedero heterólogo. Es factible que este gen pueda ser utilizado posteriormente como un marcador para la construcción de vectores de grado alimenticio.

Es también de importancia el análisis bioquímico esta enzima y su actividad cuando se expresa en *E. coli*. Este estudio puede demostrar que *E. coli* puede ser receptora de este gen que a su vez puede ser utilizado en vectores transbordadores para *Lactobacillus*.

Las actividades propuestas para el análisis molecular de dicho gen son:

- Caracterizar éste mediante mapas de restricción, tanto en el bacteriófago λ gt-10 como en las construcciones obtenidas en el vector pHC79.
- Realizar hibridaciones para comprobar la posible complementariedad entre el gen clonado, el gen *lacZ* de *E. coli* y el gen de *L. amylovorus*.

Como parte del análisis de la expresión de la β -galactosidasa clonada:

- Determinar mediante SDS-PAGE el perfil de proteínas intracelulares en las cepas que portan el gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus*, en *E. coli* y del propio *L. amylovorus* para establecer las posibles diferencias.
- Determinar los parámetros cinéticos de la enzima, los cuales serán comparados con los otros microorganismos, y bacterias gram positivas y negativas.
- Localizar la proteína que corresponde a la enzima mediante actividad *in situ* en geles de poliacrilamida renaturalizados y nativos, además de la determinación del tamaño de la β -galactosidasa clonada.

METODOLOGÍA

Microorganismos y vectores.

Se utilizó la cepa de *Lactobacillus amylovorus* NRRL-B-4540 (ATCC) cultivada en medio LCM a 37°C. Las cepas *Escherichia coli* LE392 y C600 hflA se utilizaron en la construcción y titulación del banco genómico. También se utilizaron como receptoras del gen de β -galactosidasa las cepas de *Escherichia coli* Y1089r-, Y1090r- (portadoras del plásmido pMC9) y JM 101, JM103 y JM105. Todas las receptoras presentan un fenotipo β -galactosidasa negativo.

Los vectores utilizados en este estudio fueron: el bacteriófago λ -gt10 (Huynh y col., 1985), pBR322, pKK223 (Bronius, 1984), pUC19, y el cósmido pHc79 (Hohn y Collins, 1980). Algunos de estos vectores se compraron a Boehringer. La estrategia de clonación del gen de β -galactosidasa se muestra en el diagrama 1 y a continuación se especifican las actividades que se realizaron.

Identificación del fenotipo Lac⁺

Para identificar la actividad de β -galactosidasa en *L. amylovorus*, se utilizó medio LCM con glucosa o con lactosa como única fuente de carbono. Se le adicionaron 40 μ l de IPTG con una concentración de 100 mM y X gal al 8.2% diluido en dimetilformamida. También fue probada la actividad en cajas de LCM con Xgal, sin IPTG ni lactosa. Se consideró la presencia de actividad positiva si aparecían colonias de color azul pálido, lo cual es común en *Lactobacillus*. En las cepas de *E. coli*, se utilizó medio LB con X-gal e IPTG en idénticas concentraciones, en el caso de las *E. coli* Lac⁺ o con el plásmido pUC19 se presentan colonias de color azul fuerte, y en las *E. coli* Lac⁻ se presentan colonias de color blanco.

A las cepas de *E. coli* transformadas, se les adicionó en el medio LB X-gal 40 μ g/ml, con o sin IPTG y ampicilina 50 μ g/ml se identificaron las colonias que desarrollaban un color azul pálido como transformantes con actividad positiva.

Estrategia de clonación

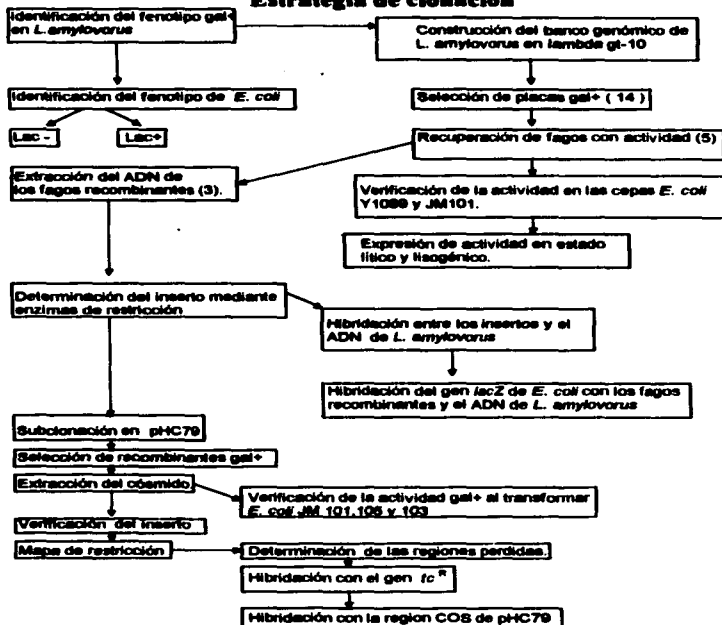


Diagrama 1. Se muestran los pasos para la obtención de los bacteriófagos con actividad gal+, la subclonación del inserto, y la verificación de la construcción en pHC79. Durante la clonación del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* se realizaron diferentes hibridaciones confirmatorias y comparativas con el gen de *lacZ* de *E. coli*.

Banco genómico.

Se construyó un banco genómico en λ gt10, con digestiones parciales con Eco RI de DNA cromosomal de *L. amylovorus* (Oviedo, 1994). Las ligaciones se ensayaron con el kit comercial de Boehringer, según especificaciones del proveedor (Hohn and Murray, 1977). Estos bancos se titularon en las cepas LE392 y C600 hflA para determinar el número de fagos recombinantes y la viabilidad del banco generado. La eficiencia de los bancos representa la proporción de fagos recombinantes respecto al total de fagos viables. Los bancos obtenidos se preservaron en glicerol al 15% a -20°C.

Selección de recombinantes β -galactosidasas positivas.

Se realizaron pruebas para detectar la actividad de β -galactosidasas en la cepa *L. amylovorus* y se observó que ésta desarrolló en cajas de LCM con X-gal e IPTG un color azul pálido después de 48 horas de incubación. De igual manera presentó actividad cuando se creció en presencia de lactosa y sin IPTG (ver foto 1). Se realizó la búsqueda de la expresión del gen para la β -galactosidasa en la cepa *lac Z- E. coli* Y1089, la cual presenta dicho fenotipo debido a la sobreexpresión del gen represor *lacI* codificado en el plásmido pMC9.

Se infectaron las cepas de *E. coli* Y1089 y Y1090, con los bacteriófagos de los bancos generados en λ -gt10, según protocolo de Maniatis y col., 1982. La selección se llevó a cabo en cajas de medio NZ con X-gal e IPTG (40 μ g/ml), mismo que se adicionó al agar suave. Se utilizó un título de 1000 pfu. y se incubaron a 42° durante 48 hrs para inducir la fase lítica.

Extracción de ADN de bacteriófagos.

Se probaron dos métodos de extracción de ADN a partir de bacteriófagos, resultando el mejor con base en la eficiencia y calidad del ADN obtenido, el reportado por Bansal y Das, 1989. Este consiste en la purificación de fagos a partir de la resuspensión de placas de lisis frescas en amortiguador SM. Se centrifugan los restos bacterianos y se destruye su ADN y ARN mediante un tratamiento enzimático con DNAsas y RNAsas..

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

Después los fagos se precipitan con un volumen de PEG-NaCl, incubando a 0°C durante una hora y centrifugando a 12,000 r.p.m. (Yamamoto y Alberta, 1970). El botón obtenido es resuspendido en amortiguador GTE y se le agrega el amortiguador de Naia, y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla obtenida se limpia con fenol. En este caso la fase acuosa está invertida, y por ello se recupera la fase de abajo, y posteriormente ésta se trata con fenol cloroformo, donde el sobrenadante limpio corresponde a la fase acuosa que contiene el ADN. Este sobrenadante limpio es mezclado con un volumen de isopropanol para precipitar el ADN, se centrifuga y el botón recuperado se lava con etanol al 70% y se seca. El botón se resuspende en amortiguador TE y puede ser utilizado para digestiones con enzimas de restricción. La eficiencia de la extracción se puede analizar en geles de agarosa comparando contra una cantidad conocida de ADN. Cuando se obtiene una buena cantidad de ADN para utilizarse en diluciones se puede realizar la estimación del ADN por espectrofotometría con luz U.V. (Maniatis y col., 1982)

Determinación de insertos en las recombinantes

A partir del ADN de tres bacteriófagos recombinantes con actividad de β -galactosidasa positiva, se realizó el análisis por restricción con las enzimas Eco RI, HindIII y BamHI. Los fragmentos obtenidos se separaron en geles de agarosa al 0.8 % con TAE como amortiguador. Se calculó con el tamaño de los fragmentos correspondientes al inserto, el tamaño aproximado de la región clonada en lambda gt10 que confiere la actividad de β -gal'.

Se aisló el fragmento inserto en la recombinante λ gt-9gal+, a partir de la digestión con HindIII, con un tamaño aproximado de 2076 pb. Otras sondas utilizadas fueron los fragmentos de 3280 y 2060 pb obtenidas por digestión de λ gt-9gal+ con Eco RI. Este último fragmento se siguió utilizando como sonda principal de λ gal+. Las sondas antes mencionadas se utilizaron para hibridar con el ADN de las otras dos recombinantes (λ gt-6 gal' y λ gt-8gal') en busca de regiones complementarias.

Los fragmentos correspondientes al inserto presente en λ gt-9 se obtuvieron de las digestiones parciales con las enzimas de restricción EcoRI, BamHI y HindIII. Los fragmentos se ligaron en los vectores pBR322, pKK223 y pHC79. Estos vectores se introdujeron mediante la transformación de células competentes (Maniatis y col., 1982), en tanto que las ligaciones con pHC79 se empaquetaron con el kit de empaquetamiento para λ de Boehringer. La cepa JM101 se transformó y se cultivó en cajas de medio Lb con ampicilina al 70 μ g/ml y X-gal (40 μ g/ml). Las copas que presentaban actividad se preservaron y cultivaron en medio Lb con ampicilina, adicionando cloranfenicol para la amplificación del plásmido.

Extracción del pHC79 recombinante.

La extracción del cósmido se realizó mediante lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979). Sin embargo no fue suficiente para obtener una buena eficiencia en la extracción. Con el fin de incrementar la eficiencia se probaron diferentes tiempos de incubación y se redujo al final a 10 minutos, después de agregar la solución III (3 M acetato de sodio, pH 4.8). Se adicionó un paso, agregando 2/3 de volumen de una mezcla de acetato de amonio 7.5 M con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio, después de precipitar con 1 volumen de isopropanol y resuspendirlo en agua destilada estéril (O'Sullivan y Klaenhammer, 1993). Este método se utilizó en las extracciones de pHC79 recombinante gal⁺ para los siguientes estudios:

Caracterización de las construcciones pHCE y pHCH

Las recombinantes con actividad que se obtuvieron en la subclonación se designaron como pHCH y pHCE y se analizaron mediante restricción con las enzimas Eco RI, HindIII, BamHI, BglII, y Sma I.

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

Asimismo se obtuvieron los fragmentos correspondientes al gen de *lacZ* contenido en pUC19, mediante la digestión con HindIII y NdeI (236 pb) como sonda inicial, que después se reemplazó por el fragmento PvuII (322 pb), más específico para la región *lacZ*. También se obtuvieron las sondas para caracterizar las construcciones pHCH y pHCE:

- a) El fragmento HindIII-SalI (620 pb) de pBR322 específico del gen de resistencia a tetraciclina.
- b) El fragmento BamHI-AvaI (1025 pb) de pHCH79 que corresponde al gen de tetraciclina.
- c) El fragmento Sau3A (500 pb) que contiene el sitio *Cos* de pHCH79.

Estos fragmentos se utilizaron como sondas para hibridar con las construcciones y en el caso de la sonda *lacZ*, para hibridar con el ADN cromosomal de *L. amylovorus*, las recombinantes de bacteriófagos, y las construcciones pHCH y pHCE.

Extracción de la β -galactosidasa.

Se extrajo la proteína intracelular de las cepas JM101 transformadas con las construcciones pHCH y pHCE que les conferían la actividad de β -galactosidasa. Estas se cultivaron en medio LB con ampicilina 70 μ g/ml, y 0.4 g/litro de lactosa, en tanto que *L. amylovorus* se cultivó en medio LCM con lactosa al 1% en lugar de glucosa. Se realizaron fermentaciones de 1 litro para cada extracción. Las fermentaciones de las transformantes tuvieron un tiempo de incubación de 48 hrs y para *L. amylovorus* fue de 60 hrs.

La extracción de proteína intracelular en las transformantes de *E. coli* se realizó de la siguiente manera:

- A partir de 1 litro de cultivo, se cosecharon las bacterias por centrifugación a 6,000 rpm durante 10 minutos y se lavaron tres veces con amortiguador Tris, al 0.01 M,

pH 7, y al final se resuspendieron 100 ml de amortiguador de fosfatos al 0.01M, pH 7.

- La suspensión se congeló a -20 °C y descongeló a 37°C. La mezcla se sonicó durante 5 minutos con ciclos de 15 segundos de tratamiento por 30 de enfriamiento.
- Al sonicado se adicionaron 0.05 g de lisozima para después incubarlo a 37°C por 30 minutos. Se centrifugó para precipitar los restos bacterianos a 9500 rpm durante 20 minutos .
- El sobrenadante recuperado se congeló y se liofilizó.
- El liofilizado de proteína se resuspendió en un amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7, se dializó y posteriormente se cuantificó por el método de Lowry y col. (1951).

Por su parte *L. amyovorvus* se creció en LCM, con lactosa al 1% y glicina, las células se cosecharon y se lavaron como en el caso de *E. coli*. Se hizo el tratamiento con lisozima durante 2 horas antes de la sonicación en tres ciclos de 10 minutos, con 30 s. de tratamiento por 30 s de enfriamiento. Las muestras se congelaron y descongelaron después de la sonicación para lizar las bacterias.

Análisis de proteínas y actividad por SDS-PAGE.

Los extractos de proteína intracelular se alicuotaron a 1.5 mg, para responderse directamente para análisis por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Se cargaron 150 μ g de proteína del extracto crudo por pozo de cada muestra y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y al 7.5%, con y sin albúmina. A las muestras de las cepas JM103 transformadas con pHCH, pHCE y pUC19, así como las cepas JM103 sin transformar y *L. amyovorvus*, se les practicó un ensayo de actividad de β -galactosidasa *in situ* en SDS-PAGE reasutralizados en Tris 0.1 M a pH 7.5 y geles nativos. Las muestras se hirvieron o no por 2 minutos antes de ponerlas en el gel. Las bandas correspondientes a las β -galactosidasas se detectaron por inmersión del gel en amortiguador de fosfatos que contenía solución de ONPG (0.05M) en amortiguador de

fosfatos 0.1M, pH 7, a temperatura ambiente, durante 24 hrs (Herman and McKay, 1986).

Ensayo de β -galactosidasa.

La actividad de β -galactosidasa se midió por el método de Miller (1972). Los ensayos se llevaron a cabo usando como sustrato 0.05 M de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) en amortiguador de fosfatos 0.1M a pH 7. Cada ensayo tiene 30 μ l de muestra en un volumen de 300 μ l, después de 30 o 60 minutos la reacción es detenida por la adición de 500 μ l de Na₂CO₃ 1M. La actividad se expresó como μ moles de ONPG hidrolizado por minuto y por mg de proteína a 37°C.

Determinación de pH y temperatura óptimos.

El efecto del pH en las β -galactosidasas de las transformantes, *E. coli* y *L. amylovorus* se determinó en amortiguador fosfatos-citrato para el rango de pH de 2-8.5 y de fosfato-glúccina para el rango de pH de 7 a 12, con un intervalo de 0.5 unidades en ambos rangos.

Para la determinación de temperatura óptima se utilizaron condiciones idénticas del ensayo general en un rango de 25 a 70°C con intervalos de 5°C.

También se calcularon algunos parámetros cinéticos, para lo cual se realizaron ensayos variando la concentración de sustrato en un rango de 100 a 3000 μ M de ONPG, con intervalos de 100 μ M desde 100 a 1000 μ M, y también se incluyeron las concentraciones de sustrato de 2000 y 3000 μ M.

RESULTADOS.

Identificación del fenotipo β -galactosidasa positivo

La actividad de β -galactosidasa las colonias de *L. amylovorus* en placas de LCM se reconoce si se torna azul pálido en presencia de X-gal, no como el azul oscuro que se obtiene en *E. coli*. Así también, se presenta la actividad con colonias color azul pálido en otras cepas de bacterias lácticas como *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *Lactobacillus casei ssp. casei*, *Lactobacillus casei ssp rhamnosus* (Collins y Thompson, 1992). Las colonias de *L. amylovorus* presentan dicho fenotipo cuando se encuentran en presencia de X-gal y es independiente de la presencia de IPTG o lactosa (foto 1).

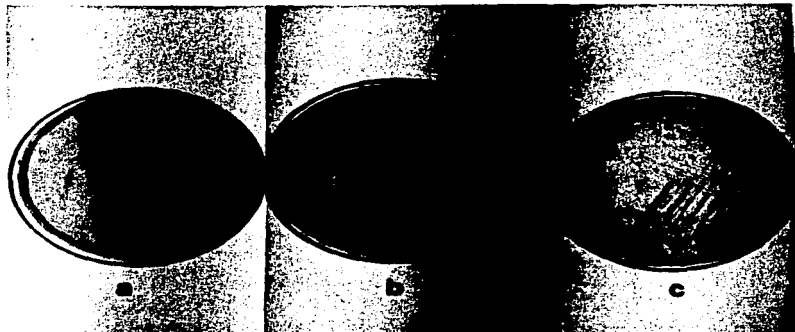


Foto 1. Colonias de *L. amylovorus* que muestran actividad de β -galactosidasa en placas de LCM con X-gal como sustrato. a) X-gal + IPTG, X-gal + lactosa, c) X-gal.

Obtención del gen de β -galactosidasa

Se construyó un banco genómico con fragmentos del ADN cromosomal de *L. amylovorus* de 6 a 10 k.pb en λ gt-10 con un título de 1.9×10^5 y una eficiencia del 79% de fagos recombinantes. Se infectó *E. coli* Y1089 para la obtención de al menos 1000 placas de lisis por caja con X-gal e IPTG. Entre las placas, aparecidas después de 12 horas, se detectó la actividad de β -galactosidasa (placas azules) solamente después de 4 semanas. Se seleccionaron 14 placas de lisis que mostraban actividad de β -galactosidasa, entre un total aproximado de 40, 000 placas. Los bacteriófagos recombinantes se recuperaron de estas placas, de los cuales sólo cinco volvieron a manifestar su actividad de β -galactosidasa al infectar cepas de *E. coli* Y1089 y JM101. En estas cepas la actividad de β -galactosidasa se muestra transcurridas 2 a 4 semanas en refrigeración después de la aparición de la placa de lisis. La actividad de la β -galactosidasa clonada parece tener muy baja expresión en este vector durante su fase lítica. Esto se comprobó en cepas preferentemente lisogénicas y *lac Z* negativas en donde al ser infectadas y mantenidas en condiciones lisogénicas, la actividad de β -galactosidasa se identificó en cajas de medio mínimo y LB con X-gal e IPTG, entre 24 y 48 horas incubación.

La presencia de actividad de β -galactosidasa en cepas *E. coli* Y1089 infectadas con los fagos recombinantes indica que, a pesar de la sobreexpresión del represor *lacI* en *E. coli*, esta proteína represora no produce represión en el gen de la β -galactosidasa proveniente de *L. amylovorus*.

Análisis de los bacteriófagos β -galactosidasa positivos

De aquellos bacteriófagos que presentaron actividad en la placa de lisis y en cepas de *E. coli* lisogénicas, se eligieron aquellos que al amplificarse se obtenía un mayor número de bacteriófagos recombinantes que mantenían la actividad en el 100% de los fagos.

En 3 diferentes bacteriófagos recombinantes seleccionados, se determinó el tamaño aproximado de los insertos mediante la digestión del ADN con las enzimas Eco RI, BamHI, HindIII, SmaI y BglII (fotos 2 y 3). En algunos cortes con la misma enzima se encontraron fragmentos de tamaño similar entre los 3 bacteriófagos que presentaron

actividad positiva. Los fagos recombinantes presentaron insertos desde 4.7 a 11.12 kb (ver tabla 8). Los perfiles muestran bandas en común entre los tres diferentes fagos β -gal' y en hibridaciones se confirmó que contenían en común los fragmentos Eco RI de 2,060 pb (foto 5) y 3,280 pb (foto 6) de λ gt-9 β -gal'. Esto indica que hay semejanza en la región que se insertó en los bacteriófagos y que pueden contener el gen de β -galactosidasa.

TABLA 8. TAMAÑO DE INSERTOS EN LOS BACTERIÓFAGOS β -GALACTOSIDASA POSITIVOS.

Enzima de restricción	λ -gt-6 (pb)	λ -gt-8 (pb)	λ -gt-9 (pb)
HindIII	2,700 2,076	8,628	2,076
SmaI		10,478	2,659 3,090 823
BamHI	7,047	7,047	7,047
BglII	2,823	5,889 2,863 4,399	5,740 2,133 4,307
Eco RI	3,284 2,060	4,631 3,284	5,813 3,284 2,060
Tamaño aproximado	4,776-5827	8,628-10,478	11,127

Los digestiones del ADN de bacteriófagos β -gal' se separaron en gels de agarosa al 0.8 %, se producen además de los fragmentos que corresponden al inserto otros fragmentos que corresponden al ADN del bacteriófago. Estos últimos fragmentos son muy grandes en general y su resolución en el gel es baja, por lo que en ellos pueden encontrarse parte de la región clonada adyacente al sitio de clonación. Es por esto que se estima un tamaño aproximado de las regiones insertadas.

Para comprobar que estas regiones son semejantes entre sí, se generaron fragmentos del λ gt-9 β -gal' con enzimas de restricción que se utilizaron como sondas, para hibridar contra el ADN digerido de los otros dos bacteriófagos λ gt-6 β -gal' y λ gt-8 β -gal'. Esto se realizó para determinar la compatibilidad entre las regiones clonadas,

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

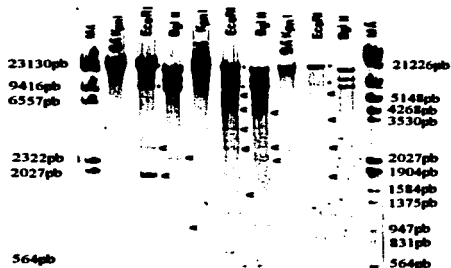


Foto 2. ADN de bacteriófagos (λ gt-9, λ gt-6, λ gt-9) con actividad de β -galactosidasa positiva digeridos con las enzimas de restricción Eco RI, Bgl II, y Kpn I. Se señalan las bandas que corresponden a los insertos (-) y los brazos de ADN de lambda cuando es digerido en el sitio único del vector Eco RI (+).

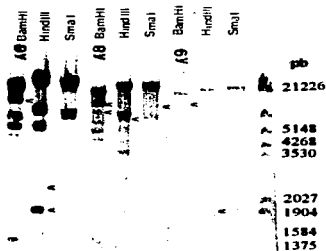


Foto 3. ADN de los bacteriófagos recombinantes digeridos con BamHI, HindIII, Sma I, donde se señalan las bandas que corresponden a los insertos (-).

determinándose que era posible que hubiera una región en común en los tres fagos recombinantes.

Con la sonda denominada como HindIII de 2.076 pb de λ gt-9 β -gal⁺ se obtuvieron hibridaciones no muy claras con el DNA de los bacteriofagos λ gt-6 β -gal⁺ y λ gt-8 β -gal⁺ y con el ADN cromosomal de *L. amylovorus* (ver foto 4). Con esta sonda no fue posible determinar si existía hibridación positiva, posiblemente correspondía a alguna región en la vecindad del gen de β -galactosidasa. Entonces se utilizaron otras sondas denominadas como EcoRI de 2.060 y 3.280 pb de λ gt-9 β -gal⁺ para encontrar mediante hibridación regiones complementarias que pudieran corresponder al gen de β -galactosidasa y seleccionar fragmentos grandes que al ser subclonados garanticen la integridad del gen.

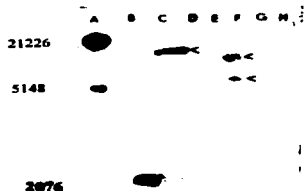


Foto 4. Hibridación realizada con la sonda denominada como fragmento HindIII-2076 de λ gt-9. A) Marcador de PM lambda EcoRI +HindIII. B) ADN de λ gt-9 digerido con HindIII. C) ADN de λ gt-8. D) ADN de λ gt-6. E, F, G y H) Digestiones del ADN cromosomal de *L. amylovorus* con Sma I, BglII, Alu I y BamHI respectivamente. Las bandas señaladas corresponden a hibridaciones positivas (<).

En cortes parciales con Eco RI del ADN de los otros bacteriófagos que corresponden a fragmentos grandes, se observó hibridación positiva con estas sondas (ver 5 y 6). No obstante se mostró una mejor hibridación y en un mayor número de bandas con la sonda Eco RI de 2,060 pb obtenida de λ gt-9- β -gal⁺. Se determinaron los sitios de restricción, con las enzimas Eco RI, BglII, SmaI y BamHI, del inserto que se encuentra clonado en λ gt-9- β -gal⁺, utilizando la estrategia de dobles digestiones se construyó un mapa de restricción (ver figura 6). Posteriormente cuando se obtuvo la sonda *Lac Z* PvuII de pUC19 se realizó la hibridación mostrada en la foto 7, donde se observa que existe hibridación con bandas obtenidas a partir de la digestión del ADN de λ gt-9- β -gal⁺.

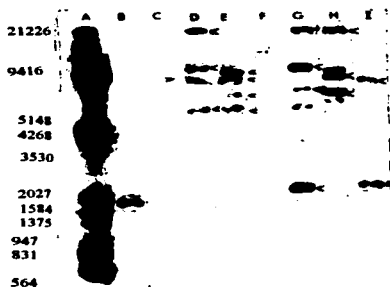


Foto 5. Hibridación con la sonda denominada como Eco RI 2060 de λ gt-9 con el ADN de los otros dos bacteriófagos λ recombinantes. A) Marcador de PM lambda EcoRI-HindIII. B) ADN de λ gt-9 digerido con Eco RI (control positivo.. D) ADN de λ gt-8 digerido con HindIII. E) Digestión con BamHI de λ gt-8. F) Digestión con Eco RI de λ gt-8. G) ADN de λ gt-6 digerido con HindIII. H) Digestión con Bam HI de λ gt-6. I) Digestión con Eco RI de λ gt-8. Se encuentran señaladas las bandas con hibridación positiva (*).

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

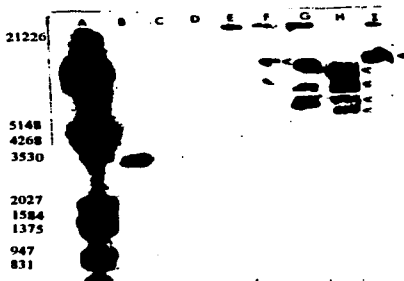


Foto 6. Hibridación con la sonda denominada como Eco RI 3200 de λ gt-9 con el ADN de los otros dos bacteriófagos λ recombinantes. A) Marcador de PM lambda Eco RI+HindIII. B) ADN de λ gt-9 digerido con Eco RI (control positivo). D) ADN de λ gt-8 digerido con HindIII. E) Digestión de λ gt-8 con Bam HI. F) Digestión de λ gt-8 con Eco RI. G) ADN de λ gt-6 digerido con HindIII. H) Digestión de λ gt-6 con BamHI. I) Digestión de λ gt-8 con Eco RI. Se encuentran señaladas las bandas con hibridación positiva (-).



Foto 7. Hibridación con la sonda de *Lac Z* fragmento obtenido por digestión con PvuII de pUC19. A) Marcador lambda con Eco RI +HindIII. B) ADN de λ gt-9 digerido con Eco RI; C) Digestión con BamHI y D) Digestión con HindIII. F, G y H) ADN cromosómico de *L. amylovorus* digerido con Eco RI, Bam HI y HindIII respectivamente. I) Sonda PvuII (control positivo). J) Resto del pUC 19 sin el fragmento que corresponde a la sonda (control negativo). Se encuentran señaladas las bandas con hibridación positiva (-).

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

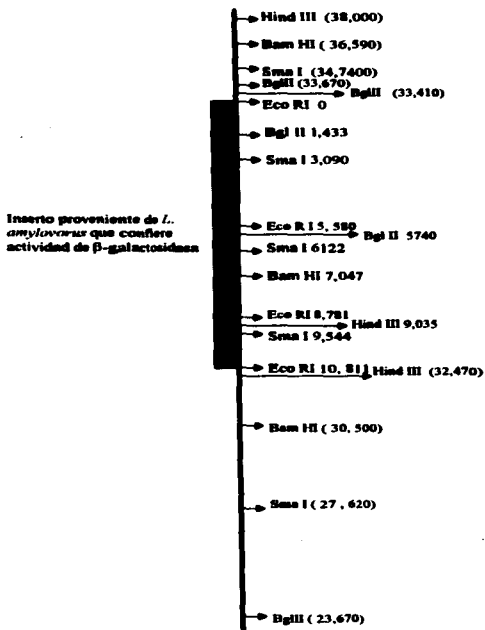


Fig. 6 Mapa de restricción del inserto en el bacteriófago recombinante λ gt-9 que le confiere la actividad de β -galactosidasa. Se muestran también las regiones adyacentes donde existen los sitios de restricción de las enzimas utilizadas para el mapeo, señalando entre paréntesis la posición en el genoma del bacteriófago λ gt-10.

Subclonación del gen.

La actividad de las colonias recombinantes en placas de LB con Xgal es muy parecida a la que se muestra en las colonias de *L. amylovorus* (ver foto B). La actividad de β -galactosidasa de las transformantes se parece a la que se reconoce en *L. amylovorus* cuando las colonias se tornan azul pálido en presencia de X-gal. Los fragmentos resultantes de la digestión parcial con Eco R1 (de 5,800 y 5,230) del ADN de λ gt-10- β -gal⁺ y correspondientes al inserto, fueron aislados por electroclución. Se eligieron los vectores: pKK223 por tener un promotor fuerte para la expresión, pBR322 y pHc79 por su capacidad para aceptar fragmentos mayores de 3,000 pb. Además el cósmido pHc79 ofrece la ventaja de ser empaquetado en cápsides de bacteriófagos e infectar con una alta eficiencia de transformación en *E. coli*. Solamente en las construcciones con pHc79 se obtuvieron transformantes (JM103) con actividad de β -galactosidasa después de 48 horas de incubación. Tanto la cepa *L. amylovorus* como las transformantes presentan la actividad en placas con X-gal sin IPTG, lo que sugiere para ambos casos que el IPTG no es inductor para esta β -galactosidasa.

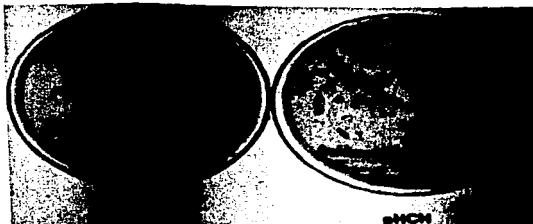


Foto B. Actividad de β -galactosidasa en la cepa de *E. coli* JM103 transformada de pHc79 y pHc11, construcciones obtenidas mediante la subclonación de la β -galactosidasa de *L. amylovorus*. El medio contiene LB, agar y únicamente X-gal. No fue adicionado ninguno de los inductores conocidos para β -galactosidasa.

Se obtuvieron 14 transformantes β -galactosidasa positivas contruidas en el sitio HindIII de pHC79 y 13 transformantes construidas en el sitio Eco RI de pHC79. Se extrajeron en preparaciones a pequeña escala los cósmidos de algunas de estas transformantes para verificar si tenían inserto. Se necesitó modificar la extracción del cósmido debido a que con el protocolo original de lisis alcalina, no se obtenía ADN de las transformantes con actividad, aunque si se obtiene el vector original (pHC79). Los cósmidos denominados como pHCE y pHCH, extraídos con el protocolo modificado, podían ser digeridos con enzimas de restricción aunque en ocasiones presentaban digestiones parciales (ver foto 9 y 10). Con estas extracciones a partir de las transformantes con actividad, se corroboró la existencia del cósmido y la presencia de inserto en éste. Para comprobar que estas 2 construcciones son las portadoras del gen de β -galactosidasa y responsables de la actividad en las cepas transformadas se procedió de la siguiente manera:

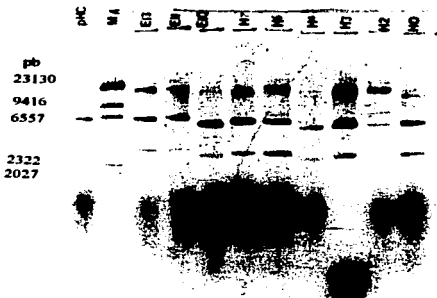


Foto 9. Minipreparaciones de ADN obtenidas de las construcciones que confieren actividad de β -galactosidasa en cepas de *E. coli*.

El ADN obtenido de los transformantes se utilizó para transformar por segunda ocasión las cepas de *E. coli* JM 101, 103 y 105, apareciendo en éstas la actividad de β -galactosidasa después de la transformación, similar a la expresada en *L. amylovorus* manifestada por la aparición de colonias con un color azul pálido.

Se utilizaron los plásmidos pHCH y pHCE para ser analizados por restricción (ver foto 10) y se obtuvo el mapa de restricción de pHCE mediante dobles digestiones para localizar los sitios de corte (ver figura 7). Es claro en las digestiones que aparecieron fragmentos con sitios de corte, que para pHC79 son únicos, o que no existen, como en el caso de la enzima de restricción *Sma* I. Estos sitios correspondieron al nuevo fragmento insertado. Se observó un inserto de aproximadamente 5,231pb, con sitios similares a los encontrados en el mapa de restricción de λ gt-9- β -gal⁺. Al comparar los mapas de restricción de λ gt-9- β -gal⁺ y de pHCE encontramos que existe similitud en los sitios de restricción. Sin embargo, el tamaño del vector indicaba que a pesar del inserto, el tamaño era menor al esperado. Era posible que en estas construcciones faltara una región que correspondiese al vector pHC79.

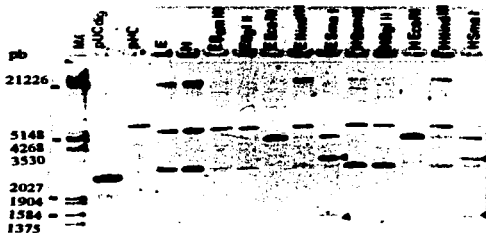


Foto 10. Digestiones de las construcciones pHCH y pHCE donde se muestra la existencia de sitios para *Sma*I, el vector pHC79 no tiene ningún sitio de restricción para *Sma*I. Se señalan aquellas bandas con que corresponden exclusivamente al fragmento clonado en pHC79 y que confieren actividad de β -galactosidasa (<).

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

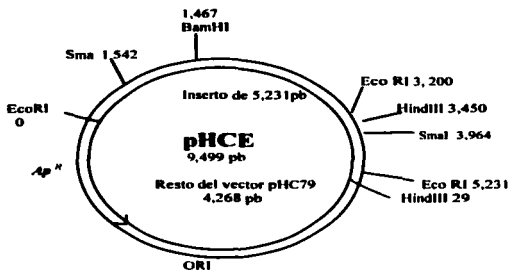


Fig. 7 Mapa de restricción del inserto clonado en el sitio Eco RI del vector pHCE79 y denominado como pHCE. La región del gen *ac* y *COS* del pHCE79 han sido eliminados de esta construcción por lo que sólo se muestran 4, 268 pb del vector original.

Con el fin de comprobar que el fragmento clonado en pHCE79 corresponde a una β -galactosidasa y probar la posible similitud del gen *lacZ* de *E. coli* con el gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus*. Las construcciones y el ADN cromosomal de *L. amylovorus* se hibridaron con el fragmento del gen *lacZ* de pUC19 (obtenido por la digestión con HindIII y NdeI). Se obtuvieron resultados positivos en la hibridación de la sonda de *lacZ* de pUC19 con las construcciones pHCE11 y pHCE, así como con un fragmento obtenido de la digestión del ADN cromosomal de *L. amylovorus* con BamHI (ver fotos 11 y 12).

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.



Foto 11. Hibridación con la sonda de *lac Z* fragmento HindIII-NdeI del pUC 19. Se aprecia hibridación entre las construcciones pMCH y pMCE (H y E) así como también con el ADN cromosomal de *L. amylovorus* (CV) digerido con EcoRI y con Bam HI. Se encuentran señaladas las bandas que presentaron hibridación positiva (-).

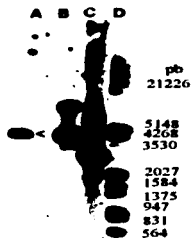


Foto 12. Hibridación confirmatoria con la sonda *lac Z* HindIII-NdeI, donde de nuevo vuelve a hibridar con un fragmento de aproximadamente 5 k.p.b. de la digestión del ADN cromosomal de *L. amylovorus*. A) ADN cromosomal de *L. amylovorus* digerido con BamHI. B) pBR322. C) pUC 19. D) Lambda EcoRI-HindIII. Se encuentra señalada la banda de *L. amylovorus* que presentó hibridación positiva (-).

Dado que era posible que la sonda contuviese aun un fragmento de pBR322 que pudiese hibridar con parte del vector pHC79, se utilizó otra sonda que exclusivamente correspondía a un fragmento interno de *lac Z* (digestión Pvu II). La sonda *Lac Z* se hibridó con las construcciones λ gt-9 β -gal⁺, pHCH, pHCE, y ADN cromosomal de *L. amylovorus*: En el caso de la hibridación con el ADN digerido de λ gt-9 β -gal⁺ existen regiones complementarias que permiten observar una banda que hibrida con la sonda *Lac Z* de *E. coli*. También en el ADN cromosomal de *L. amylovorus* digerido con HindIII se presenta una hibridación débil con la misma sonda (foto 7). Cuando se hibridó con la sonda *Lac Z* Pvu II de pUC19 se obtuvieron bandas de hibridación con el ADN de λ gt-9 β -gal⁺ en las digestiones con Eco RI, una banda de 2,060 y con HindIII en una banda de aproximadamente 5,000 pb (ver foto 7) que no había sido detectada anteriormente en los geles de agarosa, ya que sólo se apreciaba bien una banda de 2,076 pb. Esta banda de 5000 pb bien puede corresponder a la región del inserto estimado en 11,127 pb. al digerir con otras enzimas. Sin embargo en las hibridaciones realizadas con las construcciones pHCH y pHCE no se presenta señal de hibridación con la sonda *Lac Z* PvuII, a pesar de la actividad de β -galactosidasa que continúan confirmando estas construcciones (foto 13).



Foto 13. Hibridación de la sonda de *lac Z*, fragmento obtenido por digestión del pUC 19 con PvuII, con las construcciones pHCH y pHCE. A) pUC 19. B) pBR322. C) pHC79. D) pLJ513 (plásmido de *Streptomyces*). E) Construcción pHCH. F) Construcción pHCE. G) Marcador de PM lambda EcoRI +HindIII. Se encuentran señaladas las bandas que presentaron hibridación positiva (<).

Se observa una débil hibridación con los plásmidos pHCH y pBR322 (controles negativos), no así con el plásmido pIJ513, que puede deberse a una pequeña región complementaria entre la sonda *lac Z* PvuII y los plásmidos. La sonda proviene del pUC19, el cual forma parte de la misma familia que pHG79 y pBR322, por lo que comparten regiones en común.

Para comprobar en las construcciones pHCH y pHCE la pérdida de una región correspondiente al vector pHG79, se realizaron hibridaciones con sondas que corresponden a las regiones de resistencia a tetraciclina (Tc^R) y al sitio de reconocimiento para empaquetamiento (*Cos*) de pHG79. Se encontró que las construcciones pHCE y pHCH no hibridan con la sonda correspondiente a Tc , mientras que sí lo hacen el control positivo, y el vector pHG79. Cuando se utilizó la sonda de 500 pb que corresponde a la región de *Cos*, esta hibridó con los plásmidos pHCH79 y pBR322, así como con pUC19 (foto 14), lo que significa que hay una región en común de pBR322 (plásmido parental de los dos anteriores). En cambio el plásmido pIJ513 de *Streptomyces* no muestra ninguna señal de hibridación. Las construcciones pHCE y pHCH no tienen signos de hibridación alguna por lo que se supone que esta región de 500 pb *COS* y posiblemente el gen de Tc^R de 1025 pb han sido eliminados de la construcción en las recombinantes, las que representan una pérdida de aproximadamente 1525 pb del vector original, por lo que restan 4834 pb en las construcciones. Esto concuerda con el mapa de restricción, que presenta una región de 4268 pb del vector original, por lo que se puede suponer que la pérdida fue mayor a los 1525 pb comprobados por hibridación. Se conservan únicamente los genes de resistencia a ampicilina y el sitio de origen de replicación (ver foto 14). Esto concuerda con el fenotipo presentado en las transformantes ya que no presentan resistencia a tetraciclina, pero sí a ampicilina. Las construcciones que se extrajeron fueron sometidas a un segundo empaquetamiento, sin resultados en la infección debido a la pérdida de la región *COS* que sirve de reconocimiento a las proteínas empaquetadoras.

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

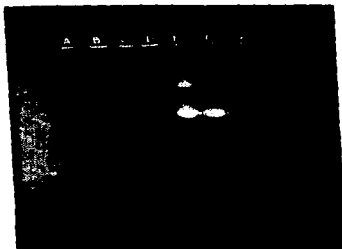


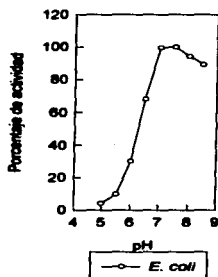
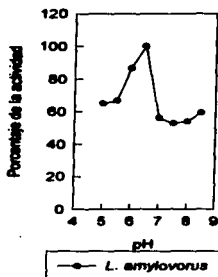
Foto 14 Hibridación con la sonda COS del fragmento obtenido por digestión con *Sma* IAI contra las construcciones pHCH y pHCE. A) Marcador de Φ M1 lambda EcoRI. B) construcción pHCE. C) Construcción pHCH. D) pJ513 (control negativo). E) pH79. F) pBR322. G) pUC19.

Este mismo material se utilizó para transformar a bacterias *E. coli* JM103 competentes por cloruro de calcio para obtener un fenotipo β -galactosidasa positivo.

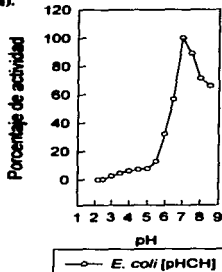
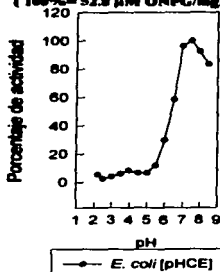
Caracterización de la β -galactosidasa clonada.

Se continuó en la caracterización de la β -galactosidasa que se extrajo de las transformantes, así como la de *E. coli* de las cepas HB101 y JM103 [pUC19]. No fue posible obtener un extracto enzimático con actividad de la cepa HB101, a pesar de ser inducida con IPTG y lactosa, por esto se optó por utilizar la cepa JM103 transformada con el vector pUC19 que le confiere sobreexpresión de la β -galactosidasa. De esta cepa se obtuvieron los extractos con actividad que se utilizaron en la caracterización. La β -galactosidasa de *E. coli* presentó un pH óptimo de 7-7.5; en el caso de *L. amylovorus* éste se presenta en 6.5. En cambio las β -galactosidasas de las transformantes pHCH y pHCE registraron un pH óptimo entre 7 y 7.5. (ver gráficas 1-4)

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.



Gráficos 1 y 2. Se muestra el pH óptimo experimental de la β -galactosidasa con los extractos de proteínas intracelulares de *E. coli* [pUC19] (100% = 1246 μ M ONPG/mg/min) y de *L. amylovorus* (100% = 52.8 μ M ONPG/mg/min).



Gráficos 3 y 4. Se presenta el pH óptimo de las cepas transformadas con las construcciones pHCH y pHCE que les confieren actividad de β -galactosidasa proveniente de *L. amylovorus*. El 100% de actividad es equivalente a 712 μ M ONPG/mg/min en la construcción pHCE y de 1154 μ M ONPG/mg/min en pHCH.

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

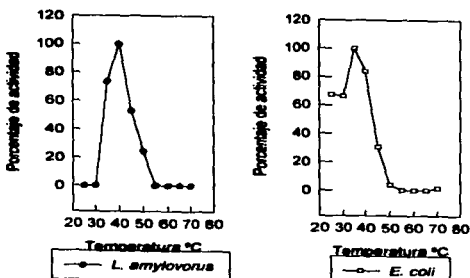
En lo que se refiere a la temperatura óptima, la β -galactosidasa de *E. coli* tiene un 100% de actividad a 35°C, la cual desciende a un 30% cuando se encuentra a 45°C, y a 50°C ya no hay actividad. En cambio en *L. amylovorus* se encontró que la β -galactosidasa tiene un 100% de actividad a 40°C y sigue mostrando 30% de actividad a 50°C. Ambas transformantes tienen la misma temperatura óptima para la actividad de la β -galactosidasa clonada (proveniente de *L. amylovorus*), ésta es de 45°C teniendo entre 70 a 85% de la actividad a 50°C. Tanto la β -galactosidasa de *L. amylovorus* como la de las transformantes muestran tener menor termolabilidad que la β -galactosidasa de *E. coli*. En ambas se mantiene una actividad residual de la enzima en una temperatura de 50°C, lo cual resultó significativo, tomando en cuenta que en la enzima de *E. coli* se abate su actividad en la misma temperatura. Aunque existen diferencias entre la β -galactosidasa de *L. amylovorus* y la de las transformantes. Esto puede deberse a la poca actividad que mostraba el extracto de *L. amylovorus* y que posiblemente no sea representativa para acercarse a los parámetros reales de esta enzima (ver gráficas 5-8). Los datos de la actividad que se obtuvieron en los extractos a pH de 7 y a 37°C se muestran en la tabla 9. Se aprecia que la actividad obtenida en los extractos de *L. amylovorus* fue muy baja en comparación de las transformantes y *E. coli*.

TABLA 9. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA

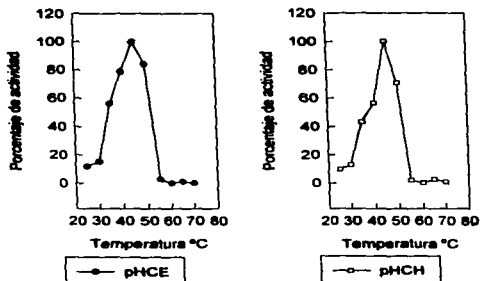
	μ M/mg proteína	Actividad específica	mg. proteína
<i>L. amylovorus</i>	1284.70	21.41	0.071
<i>E. coli</i> [pUC19]	109,337	1822	0.18
<i>E. coli</i> [pHCH]	65,018	1083	0.04548
<i>E. coli</i> [pHCE]	130,769	2179	0.022

El ensayo de actividad fue llevado cabo inmediatamente después de la extracción, en amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7, a 37°C, y 0.05M de ONPG.

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.



Gráficas 5 y 6. Se muestra la temperatura óptima para la actividad de β -galactosidasa en los extractos de *E. coli* y *L. amylovorus*. Se observa que la enzima de *E. coli* no muestra actividad a 50°C en cambio la de *L. amylovorus* aun mantiene el 30 % de su actividad. El 100% de actividad es equivalente a $27.8 \mu\text{M ONPG/mg/min}$ en *L. amylovorus* y de $1246 \mu\text{M ONPG/mg/min}$ en *E. coli*[pUC19] .



Gráficas 7 y 8. Se muestra la temperatura óptima de la β -galactosidasa para las copias JM163 transformadas con las construcciones pHCH y pHCE. El 100% de actividad es equivalente a $1.110 \mu\text{M ONPG/mg/min}$ en la construcción pHCE y de $1.450 \mu\text{M ONPG/mg/min}$ en pHCH.

En cuanto los valores obtenidos para la Km y la Vmax que se muestran en la tabla 10, se aprecia que las transformantes mantienen valores muy cercanos entre sí y muy diferentes a los obtenidas en *E. coli* y *L. amylovorus* en forma experimental son 10 veces menores o mayores. Hay que notar que *E. coli* muestra valores experimentales distintos a la Km de 2.1mM ONPG/mg a pH 6.8 a 40°C en la copa ML (Boger y col, 1959). Cabe recordar que se está utilizando una copa en la que se está sobreexpresando la β -galactosidasa, y que en este caso se hicieron las determinaciones en extractos no purificados, pero en condiciones idénticas para las distintas muestras.

Asimismo estos resultados muestran que las construcciones expresados en *E. coli*, tiene una expresión mayor que en *L. amylovorus*. Esto puede deberse a que se está expresando por medio de algún promotor del plásmido, así que no es sujeto a regulación por el represor *lac I* de *E. coli*. Esto permitió en cierto grado tener una caracterización de esta proteína, que a pesar de que se extrajo de *L. amylovorus*, los valores bajos de actividad no dan credibilidad a los parámetros obtenidos. En cambio es muy significativo que en ambas transformantes se obtuviesen valores tan parecidos, aun siendo un extracto sin purificar.

TABLA 10. PARAMETROS CINÉTICOS DE LA β -GALACTOSIDASA DE *E. COLI* Y *L. AMYLOVORUS*

	V max. (mg/prot)	Km (mM)
<i>E. coli</i> JM103 [pUC19]	1078.74	26.8691
<i>L. amylovorus</i>	10.01602	0.1962
<i>E. coli</i> JM103[pHCH]	4321.52	2.06
<i>E. coli</i> JM103[pHCE]	6360.91	2.238

Se realizó la medición de la actividad enzimática en diferentes concentraciones del sustrato ONPG y el tiempo utilizado para los ensayos fue de 60 minutos en lugar de los 30 minutos.

Determinación del perfil de proteínas intracelular de las transformantes.

Además de las diferencias establecidas en la actividad de la β -galactosidasa clonada de *L. amylovorus* y la de *E. coli*, se realizó una caracterización electroforética para

establecer diferencias en el perfil que presentan las proteínas intracelulares en las cepas transformadas y sin transformar, en la detección *in situ* de la enzima de las transformantes y de *E. coli* y en la determinación del PM. Estos estudios permitieron reconocer la enzima clonada de *L. amylovorus* de la de *E. coli*. Para esto, se extrajeron los extractos enzimáticos de la misma forma que en la caracterización de la actividad. Se cargaron las muestras enzimáticas en SDS-PAGE al 10 % y 7.5% de poliacrilamida, resultando de mejor resolución para separar las proteínas mayores de 100 kDa los gels al 7.5%, rango donde se encontró la actividad de la β -galactosidasa. Se analizaron al mismo tiempo muestras de *E. coli* y de las transformantes que portaban las construcciones pHCH y pHCE. Se modifica el patrón en las transformantes aumentando la intensidad de algunas bandas de 77, 43, 34, 26 y 22 kDa de PM aproximadamente y mostraba bandas de alto peso molecular (ver foto 15). De las extracciones en *L. amylovorus* se obtuvo una cantidad similar de proteína como la que se extrajo de las transformantes, pero con una actividad de β -galactosidasa muy baja, por lo que al analizar en gel, existía menor cantidad de proteína en las bandas de alto peso molecular entre las cuales pudiese encontrarse la β -galactosidasa no se apreció ninguna banda de actividad pero si se observaron algunas bandas de proteínas con alto PM (foto 17, carril F).

Detección de la actividad *in situ*.

Para obtener la actividad en los gels de poliacrilamida se utilizó BSA (albúmina sérica bovina) como agente protector de la enzima. Se cargaron muestras hervidas y sin hervir en gels idénticos de SDS-PAGE que posteriormente eran renaturalizados. La enzima se inactivó en las muestras hervidas ya que no presentó bandas de actividad, por lo que es una enzima termolábil, y en el gel de muestras sin hervir se obtuvieron bandas de actividad en las muestras provenientes de las transformantes (ver foto 16). Se detectaron en SDS-PAGE renaturalizados, la aparición de bandas con actividad de β -galactosidasa correspondientes a los extractos de las cepas transformadas de *E. coli* JM103 por cada construcción (ver foto 17) pero no se apreció banda de actividad en el extracto de la cepa de *E. coli* HB101 *lac Z'*. Se calculó un tamaño que corresponde a 133.05kDa. Se continuó trabajando en otros gels para obtener en el mismo gel la

Clonación y expresión del gen de β -galactosidas de *L. amylovorus* en *E. coli*.

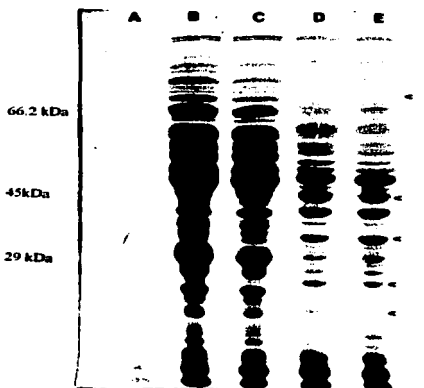


Foto 15. SDS-PAGE con poliacrilamida al 10% donde se observa el perfil de las proteínas intracelulares de la cepa JM103, transformada con las construcciones pHCH y pHCE. Se señalan 3 zonas (<) notablemente diferentes del perfil de la cepa sin transformar, correspondientes a pesos moleculares de 77, 43, 34, 26 y 22 kDa. A) marcadores de P.M. B) Extracto de *E. coli* JM103. C) Extracto de *E. coli* HB101. D) Extracto de *E. coli* JM103(pHCE). E) Extracto de *E. coli* JM103 (pHCH).

actividad *in situ* de la β -galactosidas de *E. coli*, *L. amylovorus* y de las transformantes, aunque se utilizó la cepa HB101 inducida con IPTG no se obtuvieron extractos que dieran bandas de actividad en el gel, se utilizó entonces la cepa JM103 transformada con el plásmido pUC19 que le confiere el fenotipo de β -galactosidas positivo sin resultado.

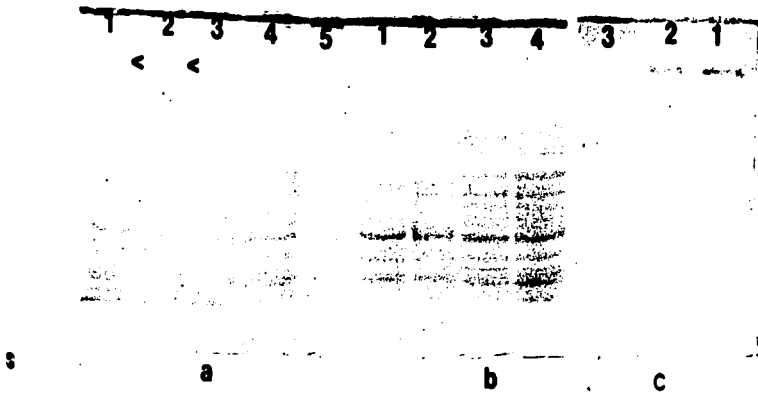


Foto 14. SDS-PAGE con poliacrilamida al 10% con BSA. A) muestras sin hervir. B) muestras hervidas, c) gel de actividad de β -galactosidas con muestras sin hervir. 1) *E. coli* pBCE. 2) *E. coli* pBCE. 3) *E. coli* HB101. 4) *E. coli* JM103. 5) marcador de PM. Se encuentran señaladas las bandas de proteinas que corresponden a las bandas de actividad de β -galactosidas

Ornación y expresión del gen de β -galactosidas de *L. amylovorus* en *E. coli*.

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

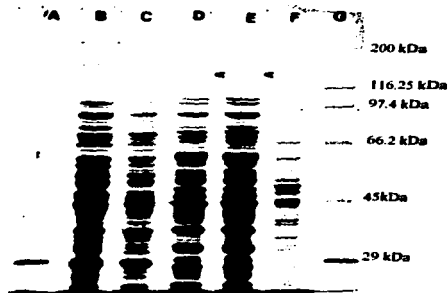


Foto 17. SDS-PAGE con poliacrilamida al 7.5% donde se indican con mayor resolución las bandas de proteínas que corresponden a la actividad de β -galactosidas. Estas bandas tienen un peso aproximado de 133.85 kDa para ambas construcciones. A) marcador de PM, B) *E. coli* JM103, C) *E. coli* HB101, D) pHCE, E) pHCH, F) *L. amylovorus*, G) marcador de PM.

Se probaron estas muestras en un gel nativo en caso que la presencia de SDS afectará la actividad de la enzima de *E. coli* y para separar por su carga, en caso de ser parecido el tamaño de las β -galactosidas de *E. coli* y las transformantes. En los geles nativos sin SDS se identificaron *in situ* las bandas de actividad de β -galactosidasa de las transformantes, pero no fue posible calcular el tamaño de las proteínas ya que presenta otro patrón de migración y los marcadores de peso molecular migran de forma diferente (ver foto 18). Tampoco se observó actividad en las muestras de HB101. Se probaron entonces muestras de β -galactosidasa que usualmente se utilizan como marcadores de PM (SIGMA) en su forma de monómero, fueron resuspendidas en amortiguador de fosfatos a pH 7 esperando que en esta muestra se agregaran los monómeros para

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

formar el tetrámero activo. En posteriores electrofóresis con SDS-PAGE renaturalizados, las muestras de β -galactosidasa de *E. coli* si presentaron una banda de actividad arriba de el último marcador de PM de 200kDa, que puede corresponder al multímero de 465 kDa. En el gel donde se revelaron las bandas de proteínas, casi no se observa la banda que correspondió a la banda de actividad de *E. coli*, pero si se observa que la mayor cantidad de proteína de la muestra forma la banda que corresponde al monómero inactivo. Se requiere muy poca proteína de *E. coli* en forma de tetrámero para formar la banda de actividad. Al comparar con las bandas de actividad de las transformantes estas tienen una β -galactosidasa activa menor que el tetrámero activo de *E. coli*, asimismo, el monómero de *E. coli* es menor y no presenta actividad (foto 19 y 20).

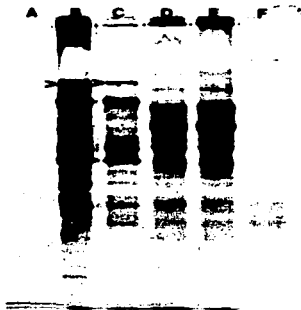


Foto 18. Gel nativo de poliacrilamida al 7.5% donde se aprecian las bandas de actividad de las construcciones, pero no así en *E. coli*. A) *L. amylovorus*. B) pHCII. C) pICE. D) HB101. E) JM103. F) marcador de peso molecular.

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

En el SDS-PAGE se observa que las bandas que presentan actividad de ambos transformantes son de mayor peso molecular (133.05 kDa) que la del monómero (116 kDa) de *E. coli* (ver fotos 19 y 20). Hay que recordar que la β -galactosidasa sólo produce actividad en *E. coli* cuando se encuentra en forma de multímero, el monómero, que también se cargó en los geles, no presenta actividad en la proteína de 116 kDa. Para el caso de *L. amylovorus* no se posible obtener la actividad *in situ* debido a la baja cantidad de proteína que podía ser extraída y la muy baja actividad de la β -galactosidasa que presentaba en relación con la cantidad de proteína.

Aunque se aumentó la cantidad de proteína en el gel en la medida posible sin afectar la migración de las proteínas, no fue posible obtener un gel donde se revelara la actividad de β -galactosidasa extraída de *L. amylovorus*.

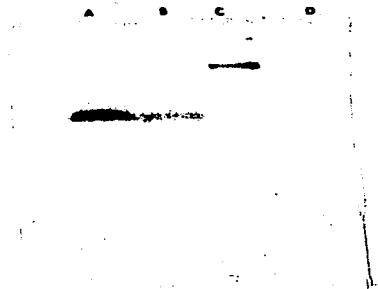


Foto 19. Zincograma obtenido para la actividad de β -galactosidasa tanto para las construcciones como de *E. coli*. Existe una gran diferencia en el FM de la β -galactosidasa de *E. coli* y de la enzima clonada en las construcciones pHCH y pHCE. A) pHCH. B) pHCE. C) β -galactosidasa de *E. coli* (Sigma). D) marcador de FM.

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

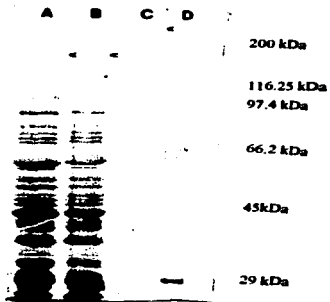


Foto 20. SDS-PAGE de poliacrilamida al 7.5 % de proteínas, donde se señalan bandas que corresponden a la actividad de β -galactosidasa detectada en el autoradiograma las cuales corresponden en peso molecular a 172.0 kDa en *E. coli* y de 133.05 kDa en las construcciones pHCH y pHCE.

Discusión

L. amylovorus ha sido considerado una cepa interesante por su capacidad para fermentar almidón hasta ácido láctico. Sin embargo, el primer reporte presentado acerca de las cepas de esta especie, indica que solamente algunas crecen en forma muy lenta en lactosa. Esta capacidad mínima de fermentar la lactosa por parte de la cepa B4540, se ha demostrado por su lento crecimiento al ser cultivada con lactosa como única fuente de carbono durante este trabajo. Anteriormente se había dicho que esta cepa B 4540 era incapaz de producir ácido láctico fermentando la lactosa (Nakamura, 1981). Se ha encontrado niveles altos de actividad de β -galactosidasa en diferentes cepas de lactobacilos como *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *L. helveticus* que presentan crecimiento con lactosa en 24 hrs, y se considera un crecimiento lento el de aquellas cepas (*L. helveticus* NCD01373 y NCD01846) que requieren de 48 horas (Collins y Thompson, 1992). La cepa de *L. amylovorus* B4540 resultó ser la más frecuentemente encontrada, aunque también se han aislado cepas de *L. amylovorus* en otras fuentes como heces de cerdo, humano y del intestino delgado (Fujisawa, 1992). También Fujisawa reporta que 7 de 8 cepas de *L. amylovorus* son capaces de fermentar lactosa. En este trabajo se ha constatado esta capacidad, no en función del ácido láctico producido, sino en la capacidad de crecer en lactosa y demostrar actividad de una β -galactosidasa en *L. amylovorus*.

Se han reportado al menos 5 especies de *Lactobacillus* que contienen β -galactosidasa, y que han sido clonadas en *E. coli* o en otra bacteria láctica. Existe gran interés por el desarrollo de vectores de clonación con marcadores de grado alimenticio para el ser humano, como es el trabajo presentado por Hashiba y col. (1992) que desarrollaron un vector denominado como pBG10 que contiene el gen de β -galactosidasa de *L. bulgaricus* y el de α -amilasa de *B. licheniformis* para ser expresado en *L. helveticus*. Por esto la clonación de la β -galactosidasa de *L. amylovorus* que se realizó con este trabajo puede continuar con la construcción de vectores para *Lactobacillus*.

Clonación en λ -gt10.

Para la clonación se utilizó el vector λ -gt 10 donde presentaron mayor estabilidad los insertos de *L. amylovorus* que en λ -gt11. Se observó que la eficiencia de fagos recombinantes construidos en lambda gt11 disminuían en cada paso de amplificación, esto significaba que durante su multiplicación los fagos perdían el inserto (Oviedo, 1994). En los fagos recombinantes construidos en lambda gt10 se observó una expresión de la β -galactosidasa muy baja en fase lítica, de manera que el tiempo de incubación era prolongado. Este resultado permite suponer que la expresión del inserto era controlada por el promotor del gen *cI* (represor de la transcripción de los genes tardíos) el cual se expresa inmediatamente tras la infección, pero que es regulado por la proteína Cro, que se acumula rápidamente, y se detiene la transcripción de los genes tempranos y medios, para iniciar la transcripción de los genes tardíos (fase lítica).

La expresión del inserto en lambda está limitada por la corta etapa lisogénica en la que se mantiene la transcripción de *cI* cuando es incubado a 42°C antes de la inducción de la fase lítica. Entonces cuando se incubó a 37°C para prolongar esta fase lisogénica fue posible obtener colonias infectadas que presentaban actividad de β -galactosidasa. Aunque esta actividad es baja en comparación a la de *E. coli*, esto puede deberse a que la expresión esta condicionada por los promotores del fago lambda y al número de copias, es decir, debido a que λ -gt10 presenta regiones de autoinmunidad y sólo se encuentra un fago por bacteria. Se han reportado trabajos de expresión en lambda donde se utilizan fagos que permiten la infección de 15 a 20 fagos por bacteria (Padukone y col., 1992).

En los bacteriófagos donde se detectó la actividad de β -galactosidasa se determinó que existían regiones en común comprobadas mediante hibridación, además al hibridar el fragmento del gen *lac Z* que corresponde al péptido α de *E. coli*, del pUC 19, se obtuvieron hibridaciones positivas, lo que nos indicó la posible similitud con el gen de *L. amylovorus*. En las hibridaciones que se realizaron en el ADN cromosomal de *L.*

amylovorus también se obtuvieron resultados positivos. En ambas preparaciones de ADN de *L. amylovorus* y del bacteriófago recombinante no puede existir interferencia por parte del ADN del vector pUC19 del cual se preparó la sonda y los cuales no contienen parte del plásmido parental pBR322, como es el caso de las construcciones pHCII y pHCCE.

Cuando se utilizó la sonda *lac Z*-PuvII para tener exclusivamente una región interior del gen, se presentó hibridación positiva con el fago recombinante, pero con el ADN de *L. amylovorus* sólo se presentó una señal débil de hibridación. Posiblemente debido a que la sonda anterior era de menor tamaño (236 pb) y esto aumentaba la afinidad de la sonda por el ADN. Al utilizarse la segunda sonda, de tamaño mayor (322 pb), es posible que esta afinidad disminuya debido al proceso de lavados con alta astringencia después de la hibridación.

Subclonación en pHC79.

La subclonación de los fragmentos obtenidos a partir del fago recombinante, se intentó en los vectores pKK223 por tratarse de un vector de expresión, pBR322 y pHC79 que pueden aceptar insertos mayores de 3.000 pb. además que el cósmido pHC79 puede empaquetarse y obtenerse un mayor número de transformantes. En pKK223 no fue posible obtener ligaciones que rindieran una alta eficiencia en recombinantes, y en pBR322 aunque se obtenía un gran número de recombinantes no se detectaron colonias con actividad. En el vector pHC79 si se encontraron varias colonias con actividad, al menos en las construcciones realizadas en el sitio Eco RI y HindIII, las que se realizaron en el sitio Bam HI no resultaron en recombinantes con actividad de β -galactosidasa. El vector utilizado es derivado directo del pBR322 al cual ha sido insertado un fragmento BgIII de 1.65 kb de Charon 4A que contiene el sitio COS de reconocimiento durante el empaquetamiento. En el pBR322 fue necesario crear un sitio BgIII no existente, mediante la inserción de un fragmento de λ de 0.65 kb de la región cro-cII (Schwarz y col., 1978). Durante la construcción se reporta la delección de un fragmento Sau 3A (200 pb) de pBR322 (Hohn y col., 1980). Al ser determinado el

mapa de restricción de la construcción parecía haber perdido parte de la región del ADN del vector, que tiene un tamaño en la construcción de 4,268. Posiblemente la pérdida pueda corresponder al segmento correspondiente a λ que contiene el sitio COS (fragmento BgIII), o bien pueda corresponder también a parte del ADN del pBR322 en la región que corresponde a la resistencia a tetraciclinas.

El cósmido pHc79 de 6.4 kb contiene la resistencia a ampicilina y tetraciclinas del pBR322 así como el sitio *ori* y un fragmento necesario para su replicación. Se han reportado en pBR322 rearrreglos intramoleculares, por deleciones o combinaciones de los insertos clonados. Uno de los rearrreglos más importantes que ocurrieron en recombinantes HindIII sin resistencia a tetraciclinas, involucra secuencias aparentemente no homólogas, donde se han determinado inserciones, duplicaciones y deleciones. También se ha observado la fusión del gen de Tc^R a los promotores de los plásmidos recientemente replicados, donde la proteína Rec A no es necesaria para este tipo de rearrreglos (Rodríguez y Donhardt, 1988).

Otros estudios de clonación en pBR322 reportan pérdidas que ocurren entre el sitio BamHI y una región entre 1666 y 1670 de pBR322, se especula que este sitio es recombinacionalmente activo por la acción de Bam HI que produce sitios nucleotídicos. Así también se ha demostrado con ADN eucariótico la participación de la proteína RecE en rearrreglos intramoleculares cuando existen secuencias repetidas (Rodríguez y Donhardt, 1988).

En el mapa de restricción de pHCE se muestran sitios para las enzimas de restricción EcoRI, BgIII, HindIII, Sma I y BamHI. Algunos de esos sitios son parecidos al fragmento clonado en el fago λ -gt-9, como el fragmento HindIII-SmaI, BgIII-EcoRI y es posible la existencia de otro sitio Sma I que no fue bien definido en el mapa de restricción. Aparentemente se tiene clonado el fragmento Eco RI de 5,580 a 10,811 pb indicado en el mapa de restricción del λ -gt-9, que incluye las dos regiones que han sido utilizadas como sondas Eco RI-2060 y 3284. También se determinó que hace falta el

sitio de restricción que corresponde a BamHI y que se encuentra dentro del gen de resistencia a tetraciclina.

Aunque el pHC79 es un cósmido capaz de aceptar insertos de 40 kb, es posible clonar en este un fragmento menor de 20 kb, según el reporte indica que la eficiencia de empaquetamiento no se reduce drásticamente, como se esperaba, pero sí indica que es necesario transformar por otros medios una vez recuperado el ADN con insertos menores sobre todo si en la infección se utilizó una cepa Rec A⁺ (Honhn y col., 1980). Estas cepas expresaron el gen sin necesidad de adicionar IPTG, como ocurre en *L. amylovorus* y otras bacterias lácticas. Se demostró su capacidad para conferir la actividad de β -galactosidasa en una segunda transformación con el material obtenido de minipreparaciones de las recombinantes β -galactosidasa positivas que contenían un inserto de aproximadamente 5,231 pb.

Mediante las hibridaciones se comprobó la ausencia del gen de resistencia a tetraciclina, el cual se ha señalado como una región susceptible de ser perdida en las recombinantes. Así también aunque no se demostró la estabilidad del fragmento que corresponde a la región COS y de la cual una gran parte no es leída durante la transcripción, se demostró que las construcciones obtenidas en este trabajo perdían el sitio COS del pHC79 y sea esta, otra región susceptible de ser eliminada en las construcciones realizadas con pHC79. Sin embargo se ha mostrado que el inserto que confiere actividad se ha mantenido funcional a pesar de las pérdidas en la construcción. En subsecuentes resiembras se ha observado que la construcción vuelve a ser eliminada generando un plásmido pequeño de aproximadamente 4,000 pb y con un inserto aproximadamente de 1,800 pb que aun le confiere la actividad de β -galactosidasa. Es posible que puedan existir secuencias repetidas como se han reportado para otros genes de β -galactosidasa de bacterias lácticas que puedan estar induciendo estos arreglos intramoleculares o bien el propio material clonado pueda sufrir deleciones espontáneas como ocurre en el gen de β -galactosidasa de *L. bulgaricus* con la pérdida de fragmentos desde 30 pb hasta 933pb (Mollet, 1990). La reducción del tamaño del inserto sin pérdida de la actividad de β -

galactosidas bien puede corresponder al tipo de genes denominados como *lac L* y *lac M*, que pueden encontrarse sobrepuestos, como ocurre en *L. lactis* con 16 pb, *L. sake* con 15 pb y *L. plantarum* con 434 pb (David, 1992; Oba y col., 1995; Mayo, 1994).

Comparación con otras β -galactosidas clonadas

De las 7 β -galactosidas que han sido clonadas de bacterias lácticas, 5 corresponden al tipo de genes *lac L* y *lac M*, incluyendo la de *L. casei*. Algunas se encuentran en el cromosoma y otras en plásmidos, y tienen un tamaño mínimo de 3,000 pb. Con el mapa de restricción obtenida en pHCE se estima un fragmento de aproximadamente 5,400 pb, de los cuales se requieren 3,600 pb para codificar la β -galactosidasa de aproximadamente 133.05 kDa. Aún no se define si se trata de un gen del tipo *lac Z* o *lac L-M* y si es posible la existencia de regiones sobrepuestas y de secuencias repetidas del tipo IS, como se presentan en otras bacterias lácticas. En *L. bulgaricus* el gen de β -galactosidasa se encuentra flanqueado por secuencias repetidas de 12 pb, antes del promotor y después del gen, esta secuencia repetida también se encuentra en el gen de transporte de lactosa de *S. thermophilus*. (Leong-Morghenthaler, 1991).

Es posible que estas secuencias repetidas puedan ser un factor que induzca la recombinación y/o provoque desestabilidad para producir deleciones en las construcciones pHCE y pHCH.

Una de las aplicaciones más interesantes para los genes del tipo *lac L-M*, sería la construcción de vectores de complementación, tal como ocurre en *E. coli*, mantener en cepas hospederas la expresión del polipéptido mayor (*lac L*) que no manifiesta actividad de β -galactosidas. Construir vectores con el gen *lac M* para producir el polipéptido menor, que al combinarse en un heterómero se constituye entonces la β -galactosidasa activa. Este tipo de vector sería muy útil para los estudios que se realizan en bacterias lácticas.

Es probable que la β -galactosidasa de *L. amylovorus* pueda corresponder a este tipo de genes (*lac L-M*), dado que la mayoría de bacterias lácticas que los presentan son del género *Lactobacillus*.

Similitud con otros genes de β -galactosidasa.

Se dudaba de la organización modular de los genes de β -galactosidasa, recientemente se ha visto que éstos bien pueden hallarse controlados por el mismo circuito regulador para la permeasa, así como para los genes que metabolizan la galactosa. Se han realizado también comparaciones de secuencia entre genes de β -galactosidasa de bacterias lácticas y otras bacterias. Se ha observado una similitud casi del 100% entre *L. lactis* y *L. casei*, y tiene alta similitud el gen *lac Z* de *S. thermophilus* y *C. acetobutlicum*. En el caso de la comparación de *L. lactis*, *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* con el gen *lac Z* de *E. coli* se tiene una homología del 22 al 27 %. Se menciona esto precisamente porque en las hibridaciones realizadas en este trabajo utilizando la sonda de *lac Z* de pUC 19 se obtuvieron hibridaciones positivas con el ADN cromosomal de *L. amylovorus* y el fago recombinante λ -gt-9. Esto demuestra que existe un grado de similitud suficiente para ser detectado el gen en hibridaciones con la sonda NdeI-HindIII. En el caso de la otra sonda PvuII utilizada, se excluye un segmento que mantiene una alta similitud con el gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus*. Los extremos amino y carboxilo terminales de las β -galactosidasas son las regiones que mantienen un mayor grado de similitud. En este caso la sonda NdeI-HindIII contiene este fragmento que correspondería al amino terminal de la β -galactosidasa.

Expresión de β -galactosidasas en pHCE.

La actividad enzimática de las construcciones se presentan altas en comparación a la de *L. amylovorus* (tabla 9). Este fenómeno bien se puede deber al número de copias del gen en la bacteria. Se ha reportado que para el vector pHCT9 contiene un replicon ColE1, que en teoría produce 50 copias por célula. En cuanto a las construcciones obtenidas en pHCT9 pueden presentarse en un número de 5 copias por célula (Hohn, 1980). Otro factor que puede influir en la expresión de β -galactosidasa en las construcciones es el promotor que se utiliza para su expresión.

La región de 1-80 de pBR322 y por tanto también en pHC79 contiene los promotores para el gen tetA y el promotor para el represor del gen (tetR). Ambos pueden ser bloqueados en el operador de Tc^R. Se indica el sitio 17 pb 5' como el promotor P2 que controla la transcripción del gen de Tc^R y el sitio 9 pb 3' del comienzo de la transcripción del promotor P1 del represor de Tc^R. La transcripción de P1 sigue la orientación contraria a donde se halla el gen de Tc^R, afectando también la transcripción del gen de resistencia de ampicilina. Este último tiene también una región promotora propia denominada como P3 entre los sitios 4155 a 4344, con la misma orientación para el inicio de la transcripción hacia el gen de Ap^R. De los tres promotores mencionados, P2 es más débil que los otros dos en su expresión. En cuanto a la expresión del gen se puede deducir que éste se expresa bajo el promotor P1 del represor para la resistencia de tetraciclina, por que los insertos se encuentran en los sitios HindIII y Eco RI abajo del promotor mencionado. Se ha encontrado que la expresión de genes de β -galactosidasas provenientes de *Lactobacillus* y clonados en *Lactococcus* presentan mayor estabilidad que el gen *lac Z* de *E. coli* clonado en *Lactococcus* (Hemme y col., 1994). Hay que notar que la expresión del gen de β -galactosidasa en *E. coli* se presenta en una forma estable, independiente de inducción y que no obedece a represión por parte del gen *lac I* de *E. coli*, aunque éste se encuentre sobre expresado en la cepa Y1089. Se reporta que las cepas que portan un gen de β -galactosidasa proveniente de otra bacteria láctica presentan buena actividad para degradar lactosa, cuando se comparan con cepas de *L. lactis* aisladas de productos no lácteos (Farrow y Garvie, 1978). El crecimiento de estas transformantes es más lento que el de las cepas nativas en medios lácteos. En cambio, las transformantes obtenidas en este trabajo manifiestan igual crecimiento que la cepa sin transformar, lo que resultó ventajoso para la caracterización de esta β -galactosidasa. La cepa de origen (*L. amylovorus*) presenta un crecimiento lento, una producción baja de β -galactosidasa y fermentación lenta de lactosa hacia ácido láctico. Este punto puede ser interesante para la aplicación en la producción de productos lácteos, en particular cuando no se requiere

una rápida o alta acidificación del producto (las cepas de *Leuconostoc* que producen aromas son inhibidas por la acidez del medio), o cuando la producción de aromas es el principal criterio para la selección de las cepas.

Se ha observado que para el caso de *L. amylovorus*, la expresión de la β -galactosidasa es muy baja y que se ha mejorado esta expresión en las construcciones obtenidas. Se observó que la capacidad de crecimiento en lactosa es menor a la que se presenta cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono.

En la clonación de la β -galactosidasa de *S. thermophilus* resulta una construcción con un inserto de 3.4 kb La actividad de β -galactosidasa en esta clona es inestable, después de resiembra la clona se torna negativa en su actividad sin cambios detectables en el inserto. Además en este mismo trabajo se reportan dos construcciones denominadas pRH161 y pRH173 con deleciones no especificadas en el vector pBR322, de estas la última construcción continua presentando actividad de β -galactosidasa (Herman, 1986) Se comprobó que en el caso de las construcciones pHCE y pHCH no se pierde el fenotipo de actividad de β -galactosidasa positivo, a pesar de las pérdidas que se presentan en el vector.

Caracterización de la β -galactosidasa.

Al comparar los perfiles de proteínas intracelulares de las cepas transformadas con el pHCE y pHCH, se encontraron nuevas bandas que corresponden a pesos de aproximadamente 77,34, 26 y 22 kDa. Dentro de las proteínas que pueden ser identificadas en el perfil de proteínas intracelulares de una cepa transformada con pBR322 se encuentran la β -lactamasa (30 kDa) y las proteínas que confieren resistencia a tetraciclina (26, 18, y 14 Kda). De éstas algunas corresponden a las bandas identificadas. Se reporta que el fragmento de lambda no tiene expresión en pH79 (Hohn y col., 1980).

En cuanto a la aparición de dos bandas de actividad en pHCE, es posible que la segunda banda pueda corresponder o bien a un multímero o también a una isoenzima, ya que en

algunos organismos se encuentra reportado otro tipo de β -galactosidasas (Trimbur y col., 1994) o β -galactosidasas que al ser caracterizadas bioquímicamente se observó que hidrolizan ONPG pero no la lactosa y que pueden ser inducidas por lactosa pero no por IPTG, como la β -galactosidasa (BGase-III) de *Klebsiella* y *ehgO* en *E. coli* (Hall y Reeve, 1977).

En *S. thermophilus* se ha detectado actividad en el monómero de 105 Kda y proponen un multímero para esta β -galactosidasa (Herman, 1986) del tipo tetrámero, como en *E. coli*. También se encuentran reportados como heterómeros aquellas β -galactosidasas que provienen de genes del tipo *lac M* y *lac L*. Las cuales suelen presentar β -galactosidasas de menor tamaño a los reportados para otros organismos, y las provenientes de los genes del tipo *lac Z*.

La temperatura óptima entre 50 y 55°C que ha sido reportada para preparaciones de β -galactosidasas de *B. coagulans* es muy parecida al de la construcción pHCE en este estudio, así como para *S. thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* y *L. thermophilus*.

La actividad de la enzima sobre los 50 °C es importante dado que otras enzimas como la de *K. fragilis* y de otras bacterias, entre ellas la de *E. coli*, han sido reportadas como termolábiles (Ramana 1981). La β -galactosidasa de *L. lactis* es menos resistente al calor y a la urea que la enzima de *E. coli* y su peso molecular se estima en 500 kDa aproximadamente(De Vos y Simons, 1988). Esto indica que la β -galactosidasa de *L. amylovorus* muestra ser ligeramente mas estable al calor que la de *E. coli* y en algunos casos también entre las β -galactosidasas de bacterias lácticas y, puede ser considerada como termofílica.

El pH óptimo neutral de la β -galactosidasa en la construcción pHCE hace posible su uso para hidrólisis de la lactosa en leche y productos lácteos que tienen un pH neutral.

Comparación con β -galactosidasas de bacterias lácticas.

En *S. thermophilus* la inducción de los genes *lac* y *gal* es efectuada por galactosa y análogos de galactosa pero no por lactosa y la glucosa reprime la síntesis, por lo que se

sugiere que existe control por represión de catabolito. Los genes de *L. lactis* y *L. casei* son inducidos durante su crecimiento en lactosa y galactosa.

En *L. amylovorus* se encontró que no es necesaria la presencia de IPTG o lactosa para que se manifieste actividad de β -galactosidasa, y tampoco se registra un incremento en la actividad por la presencia de éstos. En las construcciones obtenidas la síntesis de enzima tampoco se vio afectada por la presencia de IPTG o lactosa, por lo que en *L. amylovorus* se tiene una expresión constitutiva de la β -galactosidasa.

Se ha observado que la β -galactosidasa en *L. bulgaricus* es expresada constitutivamente y que no necesita ser inducida por IPTG (Molly y Delley, 1990). En este ejemplo la enzima muestra una estructura oligomérica y aunque se desconoce su composición, no es tetramérica como en el caso de *E. coli*. (Schmidt y col., 1989). En *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* la glucosa resulta ser un sustrato pobre en relación a los disacáridos lactosa y sacarosa. Cuando tiene glucosa como única fuente de carbono la fase log de crecimiento se extiende y la tasa de crecimiento es más baja. Esto nos indica la presencia de permeasa específica para cierto tipo de azúcares (Poolman, 1993). Es posible que esto sea una limitante para *L. amylovorus*, donde puede existir un transporte ineficiente de lactosa hacia la célula y por esto presentó valores bajos de actividad. Se obtuvo al menos un 50 % de la actividad de la enzima en las transformantes comparada con la producida en *E. coli*, en ambos casos la entrada de lactosa es permitida por la permeasa de *E. coli*. Esto puede ser probado con la clonación de la permeasa de *E. coli* o de otras bacterias lácticas (*lac S*) en *L. amylovorus*, donde hasta ahora no se han realizado intentos de transformación en esta cepa, en la que se han descartado la presencia de plásmidos que puedan interferir con la clonación de un gen.

En *Bacillus subtilis*, se ha observado que el gen *Lac I* (permeasa) es parcial o completamente eliminado en las construcciones. Esta observación ha sido explicada como un efecto tóxico por los altos niveles de la permeasa en hospederos gram positivos. (De Vos y Simons, 1988). Es posible que las bacterias lácticas resulten mejores cepas hospederas de genes heterólogos al compartir sistemas muy parecidos

como el de lactosa y ofrecer cierto grado de similitud entre los genes de β -galactosidasa de esta y en bacterias lácticas.

La movilidad electroforética mostrada (133.05 kDa) fue diferente a la de la β -galactosidasa de *E. coli*, resultando ser de menor tamaño al tetrámero activo (465 kDa) y mayor al monómero (116 kDa) sin actividad. Se mostró que existía diferencia en cuanto a la movilidad del gen en condiciones nativas, en comparación con el SDS-PAGE. En cuanto a la forma activa de la enzima de 133.05 kDa, se desconoce si existe un monómero de menor tamaño con el cual se conforme un multímero activo.

En *S. thermophilus*, la β -galactosidasa muestra la misma movilidad electroforética en SDS-PAGE y en condiciones no desnaturizantes. (De Vos y Simons, 1988). Al mostrar actividad en geles reanaturalizados la β -galactosidasa de *L. amylovorus*, se demuestra que el SDS y el β -mercaptoetanol no afectan de forma irreversible a la actividad de la β -galactosidasa. Además se presentan distintas movilidades electroforéticas entre los SDS PAGE y los geles nativos.

Gracias a la clonación del gen de *L. amylovorus* en *E. coli* fue posible realizar una caracterización del gen, dado que la cepa de origen tiene una muy baja producción de enzima. Este tipo de caracterizaciones nos ayudan a diferenciar entre β -galactosidasas de bacterias lácticas con organización del tipo operón y con alta conservación en sus secuencias de aminoácidos. Han sugerido De Vos y Simons (1994) la adquisición reciente y la transferencia horizontal de los genes del sistema Lac en bacterias lácticas, un mismo origen común y una reciente adquisición de forma horizontal.

La introducción de genes bien caracterizados en los vectores existentes de clonación puede resultar en sistemas de selección de grado alimenticio que pueden ser aceptables para aplicaciones en la industria de alimentos y tecnología de lacteos.

Por sus características bioquímicas en su actividad es posible encontrar nuevas aplicaciones en el área de investigación y la industria de alimentos para esta β -galactosidasa. Este tipo de genes para metabolizar lactosa provenientes de bacterias lácticas *stípicas* pueden servir como modelo para el estudio de la organización, expresión y regulación de genes en bacterias lácticas.

Conclusiones.

- La β -galactosidasa de *L. amylovorus* presenta actividad aun en ausencia de IPTG o lactosa como inductores. Ahora puede ser considerada una cepa que es capaz de fermentar lactosa y presentar crecimiento con lactosa como única fuente de carbono.
- Se tiene clonado en el bacteriófago λ -gt-9 el fragmento de 10,811 pb que contiene al gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus*. Este está controlado en su expresión por el promotor del gen cI (represor para los genes tardíos de lambda). Se obtuvieron 2 diferentes construcciones con el cósmido pHCT9 que contienen al gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus*. La construcción pHCE ha sido mapeado por enzimas de restricción y muestra un inserto de 5484 pb, con sitios de restricción similares a una región del inserto encontrado en λ -gt-9.
- Se determinó que las construcciones obtenidas en pHCT9 presentaban deleciones correspondientes a la región que contiene el sitio COS y al gen de resistencia de tetraciclina.
- El gen de β -galactosidasa de *E. coli* hibridó con el ADN cromosomal de *L. amylovorus* y con las construcciones en λ -gt-9 demostrando la existencia de similitud con el gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus*.
- Se diferenció claramente la β -galactosidasa de *L. amylovorus* de la *E. coli* en geles de poliacrilamida, donde se observaron las bandas de actividad *in situ*. La β -galactosidasa de *L. amylovorus* tiene un peso molecular de aproximadamente 133.05 kDa y la de *E. coli* es de 465 kDa.
- La hibridación del fragmento Eco RI de λ -gt-9 con supuestos controles negativos como pHCT9 y pBR322 hacen suponer que existe reconocimiento de regiones complementarias.
- En las construcciones del gen de β -galactosidasa éste se expresa independientemente del represor para β -galactosidasa de *E. coli* cepas JM donde se tiene una deleción en el gen *lac Z*, pero no en el represor. También se expresa la β -galactosidasa de *L. amylovorus* en cepas Y 1089 con sobre expresión del represor *Lac I* que reprime a *lac Z* de *E. coli*.

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

- Se obtuvieron diferentes construcciones con el vector pHC79 que confieren actividad de β -galactosidasa proveniente de *L. amylovorus* en *E. coli* Lac⁻ en transformaciones subsecuentes y que mantienen el fenotipo después de varias resiembras.
- El gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* resulta ser reconocido por los factores de transcripción y traducción del hospedero heterólogo (*E. coli*) para su expresión.
- Tanto en *L. amylovorus* como en las construcciones en el hospedero heterólogo, el gen de β -galactosidasa no es inducido por IPTG, lo que sugiere la conservación del mecanismo de regulación.
- La producción de la enzima a partir del hospedero heterólogo facilitó la obtención de la misma para estudios de caracterización. Se obtuvieron un pH óptimo, para la β -galactosidasa producida en las transformantes con las construcciones, de 7, y una temperatura óptima de 45° C.
- Los parámetros cinéticos de Km y Vmax, resultaron distintos entre las β -galactosidasas de *L. amylovorus* (producidas en pHCE y pHCH) y *E. coli*. La β -galactosidasa de *L. amylovorus* tiene una Km por el ONPG menor a la de *E. coli* (26 mM), tanto en la cepa original (0.19 mM) como en las cepas transformadas con las construcciones (2-2.2 mM) en condiciones experimentales idénticas.
- La expresión en el hospedero gram negativo demostró que el gen de la β -galactosidasa de *L. amylovorus* puede ser utilizado en la construcción de vectores transbordadores entre gram-positivos y negativos.

Bibliografía.

- Archibald, F.S. 1986. Manganese; its acquisition by a function in the lactic acid bacteria. CRC Crit. Rev. Micro. Biol. 13: 6-10.
- Bansal, O.B. and Das, R.H. 1989 A simple and rapid method for the isolation of plasmid and lambda phage DNAs. Nucl. Acid. Res. 17, 23: 10129.
- Bardowski, J., Ehrlich, S.D. and Chopin, A. 1992. Tryptophan biosynthesis genes in *Lactococcus lactis subs lactis*. J. Bacteriol. 174 : 6563-6570.
- Batish, V. K., Grover, S. and Leal, R. 1989 Screening lactic starter cultures for antifungal activity. Cult. Dairy Prod. J. 24: 21-25.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res. 7: 1513-1521.
- Bisset, D.L. and Anderson, R.L. 1974. Lactose and D-Galactose metabolism in group N streptococci: presence of enzymes for both the D-galactose-1-phosphate and D-Tagatose-6-phosphate pathways. J. Bacteriol. 117: 318-320.
- Bogdanov, I.G. and P.G. Dalev. 1975. Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. FEBS Lett. 57: 259-261.
- Boger, P.D., Lardy, H. and Myrback, K. 1959. The enzymes. Academic Press Inc. New York. Vol 1:634-695.
- Bohannon, M.J. 1985. Application of biotechnology to lactobacilli involved in starch fermentations. University of Minnesota, St. Paul. M.S. Tesis, 1-91.
- Brosius, J. 1984. Plasmid vectors for the selection of promoters. Gene. 930: 151-159.
- Burgess-Casseler, A. and S. Imam. 1991. Partial purification and comparative characterization of α -amylase secreted by *Lactobacillus amylovorus*. Curr. Microbiol. 23: 207-213.
- Castillo, C.A., Gómez, M.S., Gasparian, S. and J. Morlon-Guyot. 1993. Comparison of amylolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* and of *Lactobacillus amylophilus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40, 23: 266- 269.

- Chasey, B.M. Gibson, E. and Giuffrida, A. 1976. Evidence for extrachromosomal elements in lactobacilli. *J. Bacteriol.* 127: 1576-1578.
- Chasey, B.M. and Thompson, J. 1983. Regulation and characterization of the galactose phosphoenolpyruvate dependent phosphotransferase system in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* 154: 1204-1214.
- Chopin, A., Chopin, M. C., Molle-Batt, A. and Langella, P. 1984. Two plasmid-determined restriction systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* 11: 260-263.
- Collins, M.A. and Thompson J.K. 1992. Lactose metabolism and lactase gene sequence homologies amongst lactobacilli. *J. of Appl. Bacteriol.* 73: 237-242.
- Dosscheel, M.A. 1989. Bacteria for use as food preservatives. *Food technol.* 43, 1: 164-166.
- David, S. Stevens, H. Van Riel M. S. and De Vos W.M. 1992. *Leuconostoc lactis* β -galactosidase is encoded by two overlapping genes. *J. Bacteriol.* 174:4475-4481.
- Davies, F.L. and Gasson, M.J. 1981. Reviews of the progress of dairy science genetics of lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.* 48: 363-376.
- De Vos W. M. and Simons, G. 1988. Molecular cloning of lactose genes in dairy lactic streptococci. The phospho- β -galactosidase and β -galactosidase genes and their expression products. *Biochemie* 70: 461-473.
- De Vos, W.M. and Vaughan, E. E. 1994. Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 217-237.
- De Vos, W.M. Vos, P. Simons, G. and David S. 1989. Gene organization and expression in mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 72: 3398-3405.
- Delorme, C. Ehrlich, S.D. and Renault, P. 1992. Histidine biosynthesis genes in *Lactococcus lactis subs lactis*. *J. Bacteriol.* 174.: 6571-6579.
- Dickson, R.C. and Markin, J.S. 1979. Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from yeast *Kluyveromyces fragilis*. *J. Bacteriol.* 137 (1):51-61.
- Easer, F.C., Lund, C. and J. Clemmensen. 1983. Antileukemic effect in mice from fermentation products of *Lactobacillus bulgaricus*. *Milchwissenschaft.* 38: 257-260.

- Farrow, J.A.E. and Garvie, E.I. (1978) . Strains of *Lactococcus lactis* wich contain β -galactosidase. Journal of Dairy Research 46: 121-125.
- Fiber, L. Scheckermann, C. and Wagner, F. 1995. Purification and characterization of a thermotolerant beta-galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1497-1501.
- Flissimona, A. Hols, P. Jore,J. Leer, R.J. O'Connell, M. and J. Delcour. 1994 Development of an amylolytic *Lactobacillus plantarum* silage strain expressing the *Lactobacillus amylovorus* alfa-amylase gene. Ap Environ. Microbiol. 60,10: 3529-3535.
- Fox, P.F. Food Enzymology. 1991. Elsevier applied Science. NewYork. Vol. 2:335-336.
- Frazier, W.C. and D.C. Westhoff. 1989. Food Microbiology. Mc Graw Hill. New York. p. 45-50.
- Fujisawa T. Beano, Y. Yaeshima, T. and Mitsuoka, T. 1992. Taxonomic Study of the *Lactobacillus acidophilus* group with recognition of *Lactobacillus gallinarum* s nov. and *Lactobacillus johnsonii* s nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson y col., 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura, 1981). Intern. J. Syst. Bacteriol. 42,3: 487-491.
- Gaeson, M.J. 1993. Progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 3-20.
- Germoud, J.E. Lapierre, L. Dellef, M. and Molly B. 1995. A new mobile genetic element in *Lactobacillus delbrueckii subs bulgaricus*. Mol. Gen. Genet. 248: 407-416.
- Godon, J.J. Chopin, M.C. and Ehrlich , S. D. 1992. Branched-chain amino acid biosynthesis genes in *Lactococcus lactis subs lactis*. J. Bacteriol. 174: 6580-6589.
- Greenberg, N.A. and Mahoney, R.R. 1982. Production and characterization of β -D-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. J. Food Sci. 47: 1824-1829.
- Hall, B.G. and Reeve, E.C. 1977. A third β -galactosidase in a strain of *Klebsiella* that possesses two *lac* genes. J. Bacteriol. 132: 219-223.
- Hammes, W. P. 1990. Bacterial starter cultures in food production. Food Technol. 4, 1: 383-397.

- Hancock, K.R. Rockman, E. Young C. A. , Pearce, L., Maddox, I.S. and D.B. Scott. 1991. Expression and nucleotide sequence of the *Clostridium acetobutylicum* beta-galactosidase gene cloned in *Escherichia coli*. J. Bacteriol 173:10, 3084-3095.
- Hashiba, H. Takiguchi, R. Jyoho, K. and Aoyama K. 1992. Establishment of a host-vector system in *Lactobacillus helveticus* with beta-galactosidase activity as a selection marker. Biosci. Biotech. Biochem. 56,2: 190-194.
- Hemme, D. Galer, W. Winters, D.A. Foucaud, C. and Vogel, R.F. 1994. Expression of *Lactobacillus casei* ATCC393 β -galactosidase encoded by plasmid pLZ15 in *Lactococcus lactis* CNRZ1123. 19: 345-348.
- Hensel, R. Mayr, V. Stetter K.O. and Kadnler O. 1977 Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria I. Purification and kinetic of the allosteric L-lactic acid dehydrogenase from *Lactobacillus casei ss casei* and *Lactobacillus curvatus*. Arch. Microbiol. 112: 81-93.
- Herman, R.E. and McKay L.L.. 1986. Cloning and expression of the β -galactosidase gene from *Streptococcus thermophilus* in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 52, 1: 45-50.
- Hohn, B. and Collins, J. 1980. A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. Gene. 11: 291-298.
- Hohn, B. and Murray K. 1977. Packaging recombinant DNA molecules in to bacteriophage particles in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 8: 3259-3263.
- Hosono, H. Ryoichi, T. Kenichi, J. and Kenji A. 1992 Establishment of a host-vector system in *Lactobacillus helveticus* with β -galactosidase activity as a selection marker. Biosci. Biotech. Biochem. 56, 2: 190-194.
- Hughes, B.F. and McKay, L.L. 1992. Deriving phage insensitive lactococci using a food grade vector encoding phage an nisin resistance. J. Dairy Sci. 75: 914-923.
- Huysh, T.V. Young. R.A. and Davis, R.W. 1985. in DNA cloning . Vol. 1 . IRL Press. 49-78.

- Imam, H.S., Bergues- Cassler, A., Cote, G.L., Gordon, S.H. and F.L. Baker. 1991. A study of corn starch granule digestion by an unusually high molecular weight alfa amylase secreted by *Lactobacillus amylovorus*. Curr. Microbiol. 22: 365-370.
- Iest, I. and Dreyfus, M. 1995. The stability of *Escherichia coli* Lac z mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. EMBO J. 14: 3252-3261.
- Jacob, F. and Monod, J. 1961. J. Mol. Biol. 3:318
- Jero, J.P. and De Parais. 1993. Studies on the alfa amylase of *Lactobacillus amylovorus* as model for heterologous protein secretion by lactobacilli. FEMS Microbiol. Rev. 12: 26-38.
- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria . Antonie Van Leeuwenhoek. J.Microbiol. Serol. 49: 209-224.
- Kandler, O. and N. Weiss. 1986. Genus *Lactobacillus*. Bergey's manual of Systematic bacteriology. De. P.H.A. Sneath Williams and Wilkins Co. Baltimore. Vol. 2 :1209.
- Kilars, A and K.M. Shahani. 1976. Lactase activity of cultured and acidified dairy products. J. Dairy Sci. 59: 2031-2035.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227: 680-685.
- Lawrence, C. R. and Thomas , T.D. 1976. J. Dairy res. 43: 141-193
- Le Bourgeois, P. Lautier, M. Mata, M. and Ritzenthaler, P. 1992. Physical and genetic map of the chromosome of *lactococcus lactis subs lactis* IL 1403. J. Bacteriol 174:, 6752-6762.
- Lee-Wickner, L. J. and Chassy B.M. 1984. Production and regeneration of *Lactobacillus casei* protoplast. Appl. Environ. Microbiol. 48: 994-1000.
- Leong-Moergenthaler, P. Zwahlen, M.C. and Hottinger, H. 1991. Lactose Metabolism in *Lactobacillus bulgaricus*: analysis of the primary structure and expression of the genes involved. J. Bacteriol. 173: 1951-1957.
- Levin, R.E. and Mahoney, R.R.1981. Purification and characterization of β -galactosidase from a strain of *Bacillus coagulans*. Antonie van Leeuwenhoek. 47: 53-64.

- Leib, A.E. Mei, R.T. Reuben, E.H. Andree, V.F. 1988. The use of limited proteolysis to probe interdomain and active site regions of β -galactosidase (*E. coli*). *J. Biol. Chem.* 263, 4: 1848-1854.
- Loebl, W.F. and Magasanik, B. 1964. The relation of catabolite repression to the induction system for beta galactosidase in *Escherichia coli*. *J.Mol. Biol.* 8: 417-426.
- Lewry, G.H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L. and Randau, R.J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 1620-1629.
- Mandelst, T. Fritsch, E.F. and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. cold Spring harbor, New York.
- Mann, G.V. 1977 (a) Hypocholesterolemic effect of milk. *Lancet.* 2: 556 (letter to editor).
- Mann, G.V. 1977 (b). A factor in yogurt which lowers serum cholesterol in man. *Atherosclerosis.* 26: 335-340.
- Maya, B. Gonzalez, B. Arca, P. and Suarez, J.E. 1994. Cloning and expression of the plasmid encoded beta-D- galactosidase gene from a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 122 (1-2): 145-151.
- McKay, L.L. Baldwin, A. 1990. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microb. Rev.* 87: 3-14.
- McKay, L.L. Miller, A. Sandine, W.E. and ENiker, P.R. 1970 . Mechanisms of lactose utilization by lactic acid streptococci. Enzymatic and genetic analysis. *J. Bacteriol.* 102: 804-809.
- Mercenier, A. Pouwels, P.H. and Chassy, B.M. 1993. Genetic engineering of lactobacilli, *Leuconostocs* and *Streptococcus thermophilus*. En Gasson, M.J. and de Vos W.M. Genetics and Biotechnology of lactic acid bacteria. Ed. Blackie Academic and professional. London. 252-293.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 47-55
- Mollet, B. and Delley, M. 1990. Spontaneous deletion formation within the β -galactosidase gene de *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 172; 10: 5670-5676.

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

- Moen, K. Yeast, S. Palembella, A. L. Mainzer, S.E. and Schmidt B.F. 1994. Two histidines are essential for the activity of the β -galactosidase from *Lactobacillus Delbrueckii subs bulgaricus*. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 201:3: 1167-1174.
- Mansfer, Z. Nakaniishi, K. Matsuno, R. y Kamikubo, T. 1984. Purification and properties of β -galactosidases from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.* 48, 12: 3053-3061.
- Nakamura, L. K. and C.D. Crowell. 1979. *Lactobacillus amylophilus*, a new starch-hydrolyzing species from swine waste corn fermentation. *Dev. Ind. Microbiol.* 20: 531-540.
- Nakamura, L.K. 1981. *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 31, 1: 56-63
- Nakazawa, Y. and Haseeno, A. 1992. Functions of fermented milk. Ed. Elsevier Science Publisher LTD. England.
- O'Sullivan, D.J. and Klasehammer, T.R. 1993. Rapid miniprep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* ss *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2730-2733
- Obot, M. Meding, E.R. Vogel, R.F. and Hammes, W.P. 1995. Two genes encoding the β -galactosidase of *Lactobacillus sake*. *Microbiology* 1141, 3059-3066.
- Ohtsuka, K. Tanoh, A. Ozaw, O. Kanematsu, T. Uchida, T. y Shink, R. 1990. Purification and properties of a partial β -D-galactosidase with high galactosyl transfer activity from *Cryptococcus laurentii* OKN4. *J. Ferment. Bioeng.* 70,5: 301-307.
- Orberg, P.K. and Sandine W.E. 1984. Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* s *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1129-1133.
- Oviedo, N.A. 1994. Construcción de una librería genómica de *Lactobacillus amylovorus*. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Padukone, N. Perretti, S.W. and Ollis, D.F. 1992. Analysis of productivity in lysis deficient lambda expression systems. *Biotechnol. and Bioeng.* 40, 6: 697-704.
- Palmer, J. 1981. Understanding enzymes. Ellis Horwood Limited. New York. 67-68.
- Fedrique, M. and Castillo, F.J. 1982. Regulation of beta-D-galactosidase synthesis in *Candida pseudotropicalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1497-1501.

- Poolman, B. 1993. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12: 125-148.
- Primi, L., Sandino, W.E. and EMiker, P.R. 1972. Lactose hydrolisis enzymes of *Lactobacillus* species. *Appl. Microbiol.* 24: 51-57.
- Prosser, J.E., Stacker, E. and Bourne, J.R. 1987. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hidrolisis and their importance in a whey hydrolysis process. Part II: Experimentol. *Biotechnol. Bioeng.* 30: 1026-1031.
- Pridmore, R.D., Molly R.M. and Hottelinger, H. 1991. Cloning, sequencing and expression of the *Lactococcus lactis* NCDD2054 *Lac Z* gene. Annual Meeting of the American Society of Microbiology. Abstrac O-73. E.E.U.U.
- Ramona, M.V. and Dutta, S.M. 1981. Purification and propierties of beta galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.* 46: 1419-1423.
- Rauch, P.J.G. and De Vos, W.M. 1992. Transcriptional regulation of the Th5276 located *Lactococcus lactis* sucrose operon and characterization of the *sac a* gene encoding sucrose 6 phosphate hydrolase. *Gene.* 121: 55-61.
- Roddy, S.G. and K.M. Shahani. 1971. Isolation of an antibiotic from *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 54:748.
- Rosaat P., Gallardin, C. and H. Heslot. 1988. Role of malolactic fermentation in lactic acid bacteria. *Biochemie.* 70:375-379.
- Rodriguez, R.L. and Denhardt, D.T. 1988. Vectors. a survey of molecular cloning vectors and their uses. Butterworths. Boston . E.U.A. 577 p.
- Rose, A.H. 1982. Fermented foods. Academic Press. New York.
- Rowland, L.R. and F. Grasso. 1975 Degradation of nitrosamines by intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.* 29:7-12.
- Roy, D., Berger, J.L. and Reuter, G. 1994. Caracterización of dairy-related *Bifidobacterium* sp based on their beta-galactosidase electrophoretic patterns. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 55-70.

- Rutger, J.R. Saskia, S. and Willem M.V. 1991. Molecular cloning characterization and nucleotide sequence of the tagatose-6-phosphate pathway gene cluster of the lactose operon of *Lactococcus lactis*. J. Biol. Chem. 266, 1: 7176-7181.
- Sabine, D.B. 1963. An antibiotic like effect to *Lactobacillus acidophilus*. Nature. 199:811.
- Sanchez, L. and Castillo F.J. 1980. Producción, extracción y caracterización parcial β -D-galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* crecida en suero de leche. Acta Científica Venezolana. 31: 154-159.
- Seardevi, V. 1982. The genus *Bifidobacterium*. 1951-1961 in Starr, M.P. Stolp, H. Trüper, H.G. Balows, A. and Schlegel H.G. (eds.) The Prokaryotes. Springer, Berlin.
- Schmidt, B.F. Adams, R.M. Requadt, C. Power, S. and Mainzer S.E: 1989. Expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus bulgaricus* β -galactosidase gene cloned in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 171:2: 625-635.
- Schroeder, C.J. Robert, C. Leuzen, G. McKay, L.L. and Mercenier A. 1991. Analysis of the lac Z sequences from two *Streptococcus thermophilus* strains: comparison with the *Escherichia coli* and *Lactobacillus bulgaricus* β -galactosidase sequences. Journal of General Microbiology. 137: 369-380.
- Schwarz, E. Scherer, G. Hobom, C. and Kösel, H. 1978. Nucleotide sequence of cro-cII and part of the O gene in phage lambda DNA. Nature, 272: 410-414.
- Shahani, K.M., Vakh, J.R. and A. Kihara. 1976. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *L. bulgaricus*. Cult. Dairy Prod. J. 11:14-17.
- Simone, C. , De Bianchi, S.B., Negri, R. , Ferrazi, M. Baldinelli, L. and R. Vesely, 1986. The adjuvant effect of yogurt on production of gamma interferon by Con A stimulated humana peripheral blood lymphocytes. Nutr. Re Int. 33: 419-433.
- Sribir, S. an S.L. Chakrabarty. 1984. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. J. Ferment. Technol. 62, 5: 407-413.
- Sribir, S. and S.L. Chakrabarty. 1987. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* D-39 isolated from vegetable wastes: characteristics of immobilized enzyme and whole cell. Enzyme Microbiol. Technol. 9: 112-116.

- Stackebrand, E. Fowler, V.M.J. and Woese, C.R. 1983. A phylogenetic analysis of lactobacilli, *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc mesenteroides*. *System. Appl. Microbiol.* 4: 326-337.
- Starr, M.P. Stalp, H. Trüper, H.G. Balows, A. and Schlegel H.G.. 1981. *The prokaryotes*. Springer verlag berlin Heidelberg. New York. Vol. 2 : 1653- 1679.
- Steele, L.L. and G. Úalá. 1992. Impact of lactic acid bacteria on cheese flavor development. *Food technol.* 46, 11: 128-135.
- Stokes, H.W. Bette F.W. and Hall B.G. 1985. Sequence of the *cbgA* gene of *Escherichia coli* comparison with the *lacZ* gene *Mol. Biol. Evol.* 2: 469-477.
- Tanaka, Y. Kagamiishi, A. Kiuchi, A. Horiuchi, T. 1975. Purification and properties of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem. (Tokyo)* 77: 241-247.
- Thompson, J. 1980. Galactose transport systems in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 136: 683-691.
- Thompson, J. 1987. Regulation of sugar transport and metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* 46: 221-231.
- Trimbur, D.E. Gutshall, K.R. Prema, P. and Branchley, J.E. 1994. Characterization of a psychrotrophic *Arthrobacter* gene and its cold active β -galactosidase. *Appl. Environ Microbiol.* 60: 4544-4552.
- Tsang, C. and Montville A. 1993. Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: causes and consequences. *Biotechnol. Prog.* 9: 113-121.
- Tulloch, D.L. Finch, L.R. Hillier, A.J. and Davidson, B.E. 1991. Physical map of the chromosomal of *Lactococcus lactis subs lactis* DL11 and location of six putative rRNA operons. *J. Bacteriol.* 173: 2768-2775.
- Ullman, A. Jacob, F. and Monod, J. 1967. Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 24: 339-343.

- Ullman, A. Ferris, D. Jacob, F. and Monod, J. 1965. Identification par complementation in vitro y purification d'un segment peptidique de la β -galactosidase d'*Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 12: 918-923.
- Van de Guchte, M., Kok, J. and G. Venema. 1991. Distance dependant translation coupling and interference in *L. lactis*. Mol. Gen. Genet. 227:65-71.
- Venema, G. and J. Kok. 1987. Improving dairy starter cultures. Trends Biotechnol. 5: 144-149.
- Wallenfels, K. and Malhotra, O.P. 1961. Galactosidases. Adv. Carbohydr. Chem. 16: 239-298.
- Wallenfels, K. and Weil, R. 1972. Beta-galactosidase. The Enzymes. Vol. VII, Academic Press.
- Widmer F. and Leuba J.L. 1979. Beta-galactosidase from *Aspergillus niger* separation and characterization of three multiple forms. Eur. J. Biochem. 100: 559-567.
- Wood, B.J. 1992. The lactic acid bacteria in health and disease. De. Elsevier Applied Science. England. p.46.
- Yamamoto, K.R. and B.M. Alberts. 1970. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its applications to large scale virus purification. Virology. 40: 734-744.
- Zwahlen, M.C. and Mollet, B. 1993. Characterization of the *lacZ* gene and discovery of a novel IS element (ISL2) in *Lactobacillus helveticus*. FEMS Microbiol. Rev. 12: Abstract P27 B9.

Apendice

Abreviaturas

ADN	ácido desoxiribonucleico
AMP	adenosina monofosfato
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
bp	pares de bases
CAP	proteína activadora por catabolito
GRAS	organismo considerado en general como seguro
hRA	alta frecuencia de lisogenia
IPTG	isopropiltiogalactósido
IS	secuencia de inserción
ISL	secuencias de inserción largas
ISR	secuencia invertida repetida
kb	kilopares de bases
kDa	kilodaltones
K_m	constante de Michaelis
LDB	lactato deshidrogenasa
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ORF	marco de lectura abierto
ONPG	orto-nitro-fenil- β -D galactopiranosido
ONPG-P	orto-nitro-fenil- β -D galactopiranosido-fosfato
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEP	fosfoenol piruvato
PM	peso molecular
PTS	sistema fosfotransferasa de transporte
rpm	revoluciones por minuto
SBS	dodecilfosfato de sodio
UDP	uridina difosfato
V_{max}	velocidad máxima
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

Medios utilizados

Medio de Luria (LB)

1 litro.

Bactotripton 10 g
Extracto de levadura 5 g
Cloruro de sodio 5 g

Medio NZ-amine (1 lt)

NZ-amine 10 g
Cloruro de sodio 5 g
Extracto de levadura 5 g
Casaminoácidos 1 g
Sulfato de magnesio 2 g

Medio LCM (1 lt)

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3.98 g
Tripton 10 g
Extracto de levadura 5 g
Tripton 3 g
 KH_2PO_4 3 g
Acetato de sodio 1 g
Citrato de Amonio 1 g
Solución salina 1 ml
Tween 80 1 ml
Glucosa 40% 20 ml

Solución salina (100 ml)

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 4 g
 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.68 g
 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 2.06 g
Ácido ascórbico 0.1 g

Al añadir treonina al medio, se hace en una concentración de 40 mM. Para preparar medio sólido se le agregan 15 g de agar para cada litro de medio, para top agar se agrega sólo 7.5 g de agar o agarosa cuando se va a extraer el ADN del bacteriófago.

Clonación y expresión del gen de β -galactosidasa de *L. amylovorus* en *E. coli*.

Amortiguadores y soluciones.

SM (1 lit)

50 mM Tris-HCl pH 7.5
100mM Na Cl
8 mM Mg SO₄
0.01 % gelatina (5 ml de una solución al 2%)

GTE

20mM Tris-HCl, pH 8
50 mM glucosa
10 mM EDTA

Amortiguador de lisis

10mM Tris-HCl, pH 7.6
0.8 M guanidina isotiocianato
40 mM Na Cl
2 mM EDTA
0.4% Laurilsarcosina
28 mM β mercaptoetanol
4 M Acetato de amonio

PEG/ NaCl

20% peso/ volumen polietilenglicol (PM 8,000)
2M NaCl
Se lleva al volumen total con amortiguador SM y se guarda a 4°C.