

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

CONSTRUCCION, POR MEDIO DE INGENIERIA GENETICA, DE BACTERIAS
LACTICAS AMILOLITICAS PARA LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA.

126937

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

QUE PRESENTA

HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ,

BIOTECNOLOGIA

MÉXICO, D.F., 23 DE JUNIO DE 1992

La maestría en Biología Experimental de la UAM-Iztapalapa está en el padrón de posgrado de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), y cuenta con apoyo por medio del convenio de fortalecimiento del posgrado nacional No. 7.

126937

El presente trabajo se llevó a cabo
en los Deptos. de Biología Molecular
y Biotecnología del Instituto de
Investigaciones Biomédicas de la
Universidad Nacional Autónoma de México.

El presente trabajo fue financiado por
el Instituto Francés de Desarrollo en Cooperación (ORSTOM),
la Comunidad Económica Europea (CEE) y por
la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

A mi madre, la Señora Q. F. Oralia Márquez de González
por todo lo que me ha dado y no he sabido valorar

A mi padre, el señor Arq. Humberto González Cabrera

A mis hermanos María Oralia y Héctor René

**A Lore y a Sar
por todo el cariño de toda la vida**

A Héctor Márquez y familia

A Oralia Eshter González Hernández

hija te doy mi corazón

A Reyna, por toda la paciencia, cariño y valiosa ayuda
en la revisión de esta tesis,
con mucho amor.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora:

Dra. Juliette Morlon-Guyot, investigadora de la ORSTOM en México, por sus enseñanzas, formación y amistad, así como por la dirección y apoyo en la elaboración de esta tesis.

A mis asesores:

M. en C. Mariano García Garibay y Dra Rocio Ortiz Muñiz, por su apoyo, consejos y paciencia.

Al M. en C. Arturo L. Preciado López, Jefe del Depto. de Ciencias de la Salud, por todas las facilidades otorgadas

A mis compañeros y amigos de laboratorio:

Biol. Carlos Castillo, Biol. Rafael Cervantes, Gabriela Sánchez y Norma de Anda, por su ayuda, compañerismo, consejo y motivación en los momentos difíciles.

A mi alumna:

Yunuen López Gómez-Tagle, por sus valiosas críticas en los momentos precisos y su colaboración en la realización de esta tesis.

A todos los que en algún momento me escucharon y me ayudaron a salir avante,... GRACIAS.

Muy en especial, mi agradecimiento a la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz, Coordinadora de la Maestría en Biología Experimental, por su gran apoyo, paciencia y haberme cuidado durante toda mi estancia en la Maestría.

Indice de Materias

Resumen	1
Introducción	4
Generalidades de las bacterias lácticas	4
El intercambio de material genético en bacterias lácticas	6
Sistemas de transformación	9
Competencia natural	9
Competencia inducida artificialmente	10
Transformación de protoplastos	12
Transformación por electroporación	13
Desarrollo de vectores de clonación para bacterias lácticas	17
Clonación y expresión de genes heterólogos en las bacterias lácticas	21
Justificación	23
Objetivos	24
Materiales y métodos	25
Resultados y Discusión	32
Conclusiones	41
Dirección futura de la investigación	42
Literatura citada	43

Resumen

México posee una producción de leche insuficiente y necesita de su importación. Esta y sus derivados fermentados son, entonces, productos costosos y poco accesibles a gran parte de la población y, sobre todo, a la infantil. Una alternativa a esta producción deficiente, es la fabricación de alimentos provenientes de fermentaciones lácticas a partir de productos disponibles en grandes cantidades en el país, como son los productos amiláceos. Además, hasta la fecha, las fermentaciones tradicionales del maíz no han podido ser industrializadas por su alta variabilidad y lentitud del proceso. Las bacterias lácticas son usadas en la manufactura de una amplia gama de alimentos tanto tradicionales como industriales. Estas bacterias producen ácido láctico a partir de azúcares fermentables y permiten la conservación, mejoramiento nutricional y calidad organoléptica de los sustratos que fermentan. Las fermentaciones lácticas están implicadas en numerosos productos alimenticios, especialmente en los lácteos.

La investigación de la genética de estas bacterias comenzó aproximadamente hace 10 años y se ha demostrado que ellas contienen un gran número de plásmidos, muchos de los cuales tienen funciones importantes para la fermentación láctica. Actualmente, gracias a las técnicas disponibles para la clonación molecular es posible proyectar una estrategia que permita construir vectores genéticos para desarrollar una bacteria láctica amilolítica, eficiente y estable, que sea útil en la

producción industrial de sucedáneos de leche y otros derivados alimenticios tanto para consumo humano como animal.

Para este fin se desarrollaron dos estrategias de construcción de vectores que presentan el gen de alfa amilasa de *Bacillus licheniformis*. La primera utiliza al plásmido pGKV11, derivado de *Streptococcus*, que presenta el promotor de transcripción de *B. subtilis*, *SPO2*, la segunda, al plásmido pLZ12 derivado de *Lactobacillus*. Las construcciones se llevaron a cabo y se transformaron en 6 cepas de bacterias lácticas.

De la primera construcción se obtuvieron transformantes resistentes a cloranfenicol y con una actividad de alfa amilasa débil determinada por crecimiento en cajas de LCM con almidón y observando los halos de hidrólisis de las cepas *Lactobacillus casei* 102S, y *Streptococcus salivarius subsp.thermophilus* 19256. Sin embargo, no se pudo demostrar la presencia del plásmido dentro de las células.

De la segunda construcción se obtuvieron varias cepas resistentes a cloranfenicol pero ninguna presentó actividad de alfa amilasa. Al determinar la presencia de plásmidos dentro de las células, se observó que existían plásmidos diferentes, ninguno de los cuales presentó las características del plásmido recién construido. Estas modificaciones que llevaron a cabo las bacterias transformantes nos habla de una inestabilidad conformacional del plásmido en estas cepas.

Además de las construcciones referidas, se establecieron las condiciones de electroporación para las siguientes cepas de bacterias lácticas *Lactobacillus plantarum*

ATCC 8014, *Lactococcus lactis* ATCC 11454, *Lactococcus lactis* ATCC 11007, *Lactobacillus delbruekii* ATCC 9649, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 19258.

Introducción

Generalidades de las Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas (BL), son procariotes gram positivos, asporógenos, caracterizados por la producción de ácido láctico como un producto final. Esta producción, a partir de la utilización de los azúcares, es una conversión metabólica casi exclusiva en ellas. El grupo de las BL incluye a los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Sporolactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Lactococcus*. Pueden clasificarse, de acuerdo con el producto de su fermentación, en dos grupos: Homolácticas, que producen principalmente ácido láctico (80%) y Heterolácticas, que producen, además, bióxido de carbono y etanol (más del 25%) (Batt, 1986).

De todos los microorganismos, las BL son las más útiles a la sociedad, con excepción, tal vez, de las levaduras (Rose, 1982). Sus aplicaciones hacen posible la manufactura de miles de alimentos fermentados, especialmente en las que se usan en cultivos mixtos con otros tipos de bacterias, levaduras u hongos; también son benéficas al incrementar el sabor de los alimentos como en algunos tipos de quesos (Angier, 1986; Syine y Elliker, 1970); inhibiendo las bacterias que los descomponen, como en las leches fermentadas, (Elliker et al., 1964, Weber y Broich, 1986); así como también a los organismos que pudren a las semillas, como en los silos, (Dellaglio y Santi, 1984) y a los patógenos que pueden desarrollarse en estos productos (Daly, et al., 1972). Su posible utilidad en la salud intestinal se ha estudiado desde

hace una centuria (Syine, et al., 1972) y su papel esencial en la salud de los niños recién nacidos es aceptada por la comunidad médica pues son los primeros microorganismos colonizadores del tracto gastrointestinal infantil (Brown, 1977; Bullen y Tearle, 1976; Beerens et al., 1980; Yoshioka, et al., 1983). Otros beneficios para la salud son los relacionados con el control de los niveles sanguíneos de colesterol (Hepner et al., 1977; Grunewald, 1981), del cáncer, colaborando con la destoxificación de cancerígenos y procancerígenos (Ayebo, et al., 1981; Goldin y Gorbach, 1983), la inmunocompetencia (Simone, et al., 1986) y la producción de antibióticos, como las bacteriocinas (Shahani, et al., 1976), están recibiendo atención por parte de los investigadores. Las BL también han mostrado incrementar la calidad nutricional de ciertos alimentos, produciendo proteína unicelular a partir de alimentos ricos en almidón, por ejemplo (Friend y Shahani, 1984; Ro, et al., 1979).

Todas las BL tienen limitaciones o defectos que pueden ser mejoradas o eliminados respectivamente. La tecnología del DNA recombinante indudablemente puede contribuir significativamente para hacer estas bacterias más útiles en varias fermentaciones (Fuchs, 1983). Los mejoramientos o cambios benéficos que podrían abordarse usando la tecnología del DNA recombinante podrían incluir hacerlas: 1) resistentes a fagos, 2) resistentes a antibióticos, 3) permanentemente no-lisogénicas para que no sean fuente de virus, 4) superproductoras de nisina, 5) no-aglutinables, 6) mayores productoras de diacetilo, 7) mejores colonizadoras del tracto gastrointestinal, en el caso de ciertos

lactobacilos, 8) destoxificadoras mejoradas de procarcinógenos y carcinógenos 9) refractarias a la pérdida de plásmidos, 10) receptoras de genes que lleven información para síntesis de saborizantes y drogas y 11) rápidas en la coagulación de los quesos. Además de las anteriores, las propiedades más importantes para la industria lechera son la producción de ácido láctico, proteólisis de las proteínas de la leche (particularmente de la caseína), insensibilidad a bacteriófagos y propiedades misceláneas que determinan la calidad final del producto tal como la producción de saborizantes, bacteriocinas y nisina. Junto con estas y otras mejoras, se requiere mayor conocimiento de la expresión genética así como de los mecanismos de intercambio del material genético en BL (Sandine, 1987). Todas estas propiedades parecen estar codificadas, en muchas cepas, por plásmidos; esto significa que son rasgos inestables en los inóculos iniciales, también significa que genes relevantes pueden ser aislados de una forma relativamente fácil (Venema y Kok, 1987).

El intercambio de material genético en bacterias lácticas

Aunque el DNA fue descubierto en 1869 por Meisher, (Mirsky, 1968), y Avery y su grupo, en 1944, mostraron que los genes estaban compuestos de DNA y Watson y Crick propusieron su estructura de doble hélice en 1953, los estudios genéticos en bacterias tuvieron gran dificultad para iniciarse pues los conceptos genéticos no eran aplicables a los organismos que no se

reproducen sexualmente. Sin embargo, una década después, el código genético fue descifrado (Crick, 1966), iniciando el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, en la que se combinan de manera covalente dos o más moléculas de DNA de distinta procedencia para formar otra totalmente nueva. Hacia 1965, Hayes descubrió el primer plásmido bacteriano, el factor sexual F (Hayes, 1968). El descubrimiento de endonucleasas de restricción, que son las herramientas más poderosas en la clonación molecular, en la secuenciación de nucleótidos y en el mapeo genético, se realizó en 1970 (Smith y Wilcox). Después del descubrimiento del RNA mensajero (Jacob y Monod, 1961), siguió el de la transcriptasa reversa (Baltimore, 1970), la cual permite a los investigadores hacer una copia de hebra sencilla de DNA complementaria a una de RNA mensajero específico. El DNA complementario puede ser usado entonces para producir un DNA de doble cadena que puede servir para clonar genes originarios del RNA mensajero.

El primer DNA recombinante fue producido en la Universidad de Stanford por Berg y colaboradores (Jackson et al., 1972). En 1973, Cohen y Boyer anunciaron el uso de plásmidos bacterianos autorreplicables como un método de amplificar ciertos productos génicos (Cohen et al., 1973), y posteriormente lo patentaron (Cohen y Boyer, 1978). A la fecha, más de 200 compañías comercializan productos derivados de esta tecnología y se estima que en los Estados Unidos de Norteamérica 10,000 laboratorios públicos, privados, universitarios y del gobierno están involucrados en este tipo de investigación (Sandine, 1987).

Los métodos para la manipulación de las BL se han desarrollado a tal punto que es posible clonar y expresar genes homólogos y heterólogos en estos microorganismos. Recientemente, se han revisado los avances en estos temas en estreptococos (De Vos, 1987) y lactobacilos (Chassy, 1987). Un factor esencial en el avance de estas nuevas tecnologías fue la aparición de sistemas de transformación para varias especies de BL. Sin un sistema de transformación eficiente no es posible el análisis genético ni la modificación de cepas, ya que no se puede introducir la información que nosotros necesitamos dentro de la célula de interés.

Los sistemas de transformación se conocen desde que Griffith en 1928 describió la transformación de *Streptococcus pneumoniae* antes de que el DNA fuera reconocido como material genético. Hasta la fecha se han hecho numerosas revisiones sobre el tema (Saunders et al., 1984; Venema, 1979; Smith et al., 1981; Stewart y Carlson, 1986). Generalmente se han dividido los sistemas de transformación un poco artificialmente en: 1) Competencia natural, 2) competencia artificialmente inducida, 3) sistemas dependientes de protoplastos y 4) electroporación.

Sistemas de transformación

a) Competencia natural

A la fecha, se han descrito sistemas de transformación natural en 15 generos: *Acromobacter*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Haemophilus*, *Halobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, y *Synechococcus* (Hopwood, 1981). El mecanismo por el cual la transformación ocurre se ha estudiado detalladamente en *B. subtilis*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* y *S. sanguis*.

Todos los sistemas de transformación bacteriana parecen seguir una secuencia común de eventos: 1) desarrollo de competencia para importar DNA, 2) unión del DNA, 3) entrada del DNA y 4) procesamiento intracelular del DNA que resultará en la integración, recombinación o establecimiento del estado de plásmido autónomo. Superficialmente, todos los eventos durante la transformación parecen similares para todas las bacterias, sin embargo, parece ser que existen diferencias en los mecanismos finos por lo que es muy difícil definir el sistema de transformación para una cepa no transformable en este momento.

La competencia natural está genéticamente determinada, no obstante, está controlada por el pH, la fase de crecimiento, la composición del medio de cultivo y la densidad celular en *S.pneumoniae* (Chen y Morrison, 1987). Existen algunas proteínas específicas involucradas en el desarrollo de competencia y parece

ser que existe un locus de control (Chandler y Morrison, 1987), identificado en *S.sanguis*, *S.mutans* y *B.subtilis*. Sin embargo, cada cepa desarrolla competencia bajo ciertas condiciones fisiológicas especiales. Mientras que los estreptococos desarrollan competencia en etapas tempranas del crecimiento, después de un cambio nutricional, las cepas de *Bacillus* la desarrollan en medios mínimos durante la fase estacionaria. En general parece que existe un complejo de proteínas que unen el DNA a las células, producen mellas en cadenas sencillas de DNA y las cadenas complementarias son degradadas. Finalmente, los fragmentos de DNA entran a las células. El mecanismo de tránsito de las cadenas sencillas a través de la pared celular y de la membrana no es claro. Se sabe que la cadena sencilla de DNA puede existir durante algún tiempo en el exterior de la célula en un complejo DNA-proteína resistente a nucleasas denominado el complejo de eclipse (Venema, 1979; Smith et al., 1981; Stewart y Carlson, 1986).

b) Competencia inducida artificialmente

Algunas cepas bacterianas como *Escherichia coli*, no expresan competencia natural. Sin embargo, Mandel e Higa observaron en 1970 que *E. coli* tratada con una solución de CaCl_2 , seguida de un choque calórico a 42C, se vuelve competente para tomar DNA del bacteriófago lambda. Estos métodos se han perfeccionado recientemente por la introducción de medios de cultivo especiales, tratamiento de las células con sales de rubidio,

hexamina de cobalto, ditiotreititol o dimetilsulfóxido para dar eficiencias de transformación de hasta 10^8 por ug de DNA. No se conoce el mecanismo por medio del cual *E.coli* importa el DNA transformante. Hay evidencia de que el proceso de ingesta es activo y que el sistema de transporte de la cobalamina (coenzima de la vitamina B12) puede estar involucrado (Hanahan, 1983). La transformación es eficiente con DNA superenrollado, circular de cadena doble o sencilla, el DNA lineal es mucho menos eficiente. No se requiere de ningún tipo de homología en la secuencia de bases. Se han aplicado variaciones de esta técnica a la transformación de varios géneros de bacterias gram negativas: *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Citrobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Haemophilus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Serratia* (Saunders et al., 1984). La única bacteria gram positiva que ha podido ser transformada por esta técnica es *Staphylococcus aureus* (Rudin, et al., 1974). Otras sales que han sido utilizadas para inducir competencia son las de estroncio, bario y magnesio, principalmente para *Salmonella* y *Pseudomonas* (Saunders et al., 1984). Otro compuesto utilizado para la generación de competencia es el polietilén glicol (PEG). Este método ha sido utilizado para la transformación de *Bacteroides fragilis* (Smith, 1985), *Bacillus brevis* (Takahashi et al., 1983), *Bacillus thuringiensis* (Heierson, et al., 1987), *Clostridium thermohydrosulfuricum* (Soutschek-Bouer et al., 1985) y *Streptococcus lactis* (Sanders y Nicholson, 1987). El mecanismo exacto de esta transformación no se ha determinado pero el PEG

interacciona con las membranas biológicas favoreciendo la fusión de unas con otras.

c) Transformación de protoplastos

Durante mucho tiempo se ha considerado a la gruesa capa de peptidoglicano que caracteriza a la pared de las bacterias gram positivas como una barrera potencial para la ingesta de DNA y así se explica la falta de éxito en la transformación de este tipo de bacterias, en comparación con las gram negativas. Para eliminar esta barrera se ha propuesto la transformación de protoplastos. La transfección de protoplastos de *Streptomyces* y *Bacillus* fue reportada hace aproximadamente 20 años pero no fue sino hasta 1978 que se describió la transformación de protoplastos de *Streptomyces* con DNA de plásmidos. Procedimientos similares se desarrollaron para *B. subtilis* y para *S. lactis*. Desde entonces se han desarrollado varios protocolos para adaptar y optimizar las eficiencias de transformación; sin embargo, muy pocos organismos han podido ser transformados mediante esta técnica y siempre con muy bajas eficiencias (Mercenier y Chassy, 1988). Entre los organismos que pudieron transformarse están: Varias cepas de *S. lactis*, *S. faecalis*, *S. thermophilus* (De Vos, 1987), *L. fermentum* (Iwata et al., 1986), *L. casei*, *L. reuteri* y *L. plantarum* (Cocconcelli et al., 1986). Las eficiencias de transformación de lactobacilos fueron usualmente muy bajas (5 transformantes/ μ g de DNA) y difíciles de reproducir. Hasta la fecha no se han podido determinar

mecanismos precisos de acción en la transformación de protoplastos de bacterias gram positivas.

d) Transformación por electroporación

Cuando las células vivas son expuestas a campos eléctricos se presentan cambios físicos y biológicos en ellas. Los primeros que investigaron estos cambios fueron Newmann y Rosenheck, en 1972 y Zimmermann y col. en 1973. Estudiaron los efectos de pulsos eléctricos en membranas celulares, en sus observaciones encontraron que las membranas de las células se polarizan cuando son sometidas a fuerzas de campo eléctrico débiles. Cuando los cambios en estos campos eléctricos inducen en el potencial de membrana un valor crítico, que se encuentra entre 200 y 400 mV, se producen áreas de desorganización local reversible y rompimientos transitorios haciendo la membrana permeable a moléculas y macromoléculas, sea en el sentido de influjo o eflujo de la célula. Además, la permeabilización de moléculas pequeñas requiere menor voltaje que el requerido para permeabilizar macromoléculas (Chassy et al., 1988). Así mismo, existe evidencia de que la matriz lipídica es el locus de permeabilización (Teissie y Tsong, 1986) y se ha postulado que las uniones lípido-proteína son los sitios de electropermeabilización. Ya que se ha postulado la formación de poros en las células eucariotas para explicar los efectos observados durante su exposición a campos eléctricos de fuerza crítica, el proceso para introducir macromoléculas tales como DNA

transformante se conoce como "electroporación" o electropermeabilización". Se han asociado otros eventos con la exposición de células a campos eléctricos. Por ejemplo, en *E. coli* se produce una síntesis de ATP cuando se le coloca en un campo eléctrico, debido al establecimiento de un gradiente electroquímico que está asociado a la cadena respiratoria. Por encima de un voltaje crítico la membrana celular se daña irreversiblemente, ya sea por que el estado de desorganización de la membrana es demasiado grande para repararlo o por excesiva pérdida de material intracelular (Chassy et al., 1988). La electroporación ha sido usada exitosamente para introducir DNA en una gran variedad de células eucariotas tanto animales como vegetales. Esta se lleva a cabo con pulsos de algunos milisegundos de unos cuantos cientos de volts por cm en amplitud. Estas condiciones proporcionan un gradiente de aproximadamente 1 V a través de células de 10 μm de diámetro o más. Para dar un pulso de la misma magnitud a una célula bacteriana hipotética de aprox. 1 μm de diámetro, se debe tener un campo de fuerza de 10,000 V/cm por períodos de 10ms. Tales voltajes no son fáciles de conseguir y hacen las fuentes de poder complejas y costosas. Actualmente existen algunas marcas de fuentes de poder que han demostrado tener éxito en la electrotransformación bacteriana (Chassy et al., 1988).

En la tabla 1, se presentan algunas cepas de bacterias electroporadas hasta la fecha. Actualmente se han publicado otros protocolos de electroporación mejorando las eficiencias y aumentando el número de células electroporadas. Como las

técnicas de transformación mencionadas con anterioridad, la electroporación es, en la actualidad, poco comprendida y todavía hay que jugar con las condiciones para cada cepa pero sin embargo ha demostrado tener un más amplio futuro en la transformación de cepas que en algún momento se les llamó intransformables.

Tabla 1. Transformación de Bacterias Mediante
Electropermeabilización

Organismo	Referencia
<i>Bacillus anthracis</i>	G. Dunny
<i>Bacillus cereus</i>	Luchansky, et al., 1988
<i>Bacillus subtilis</i>	B. Beliveau y J Trevors, B. Karan-Tamir y M. Zukowski J.F. Viret
<i>Bacillus licheniformis</i>	B. Karan-Tamir y M. Zukowski
<i>Bacillus thuringiensis</i>	G. Dunny
<i>Bordetella pertussis</i>	J. Miller
<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	J. Flickinger S. Bonnassi y M. Sicard
<i>Cambylobacter jejuni</i>	Miller, J. et al., 1988
<i>Campylobacter coli</i>	Miller, J. et al., 1988
<i>Clostridium perfringens</i>	Allen, S. et al., 1988
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	H. Wolff y E. Neumann
<i>Cyanobacteri spp</i>	A. Grossman
<i>Enterococcus faecalis</i>	Muriana, PM et al., 1988 Luchansky, JB et al., 1989 Fieldler, S y Wirth, R 1988
<i>Enterococcus faecium</i>	M. Solioz y A. Mercenier
<i>Erwinia stewartii</i>	D. Coplin
<i>Erwinia caratovora</i> subsp <i>caratovora</i>	M. Mount
<i>Erwinia herbicola</i>	M. Mount
<i>Escherichia coli</i>	Harlander SK, 1986 Dower, WJ, 1987 Fiedler, S y Wirth, 1988 Otras citas posteriores
<i>Hemophilus pleuropneumoniae</i>	G. Lalond et al.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	V. Piantanida y F. Bayliss
<i>Listeria monocytogenes</i>	D. Hoffman y F. Bayliss
<i>Lactobacillus spp</i>	Chassy, BM y Flickinger JL 1987 Otras citas posteriores
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	Luchansky et al.
<i>Leuconostoc cremoris</i>	W. de Vos
<i>Micobacterium leprae</i>	W. Jacobs
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	B. Giquel-Sanzay
<i>Myxococcus xanthus</i>	J. Rodriguez et al.
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Luchansky et al.1988
<i>Propionibacterium jensenii</i>	Luchansky et al.1988
<i>Pseudomonas putida</i>	Fieldler, S y Wirth, R 1988
<i>Rhizobium meliloti</i>	Dahlman, D y Harlander, S 1988 Taketo, A, 1988
<i>Salmonella thphimurium</i>	Dahlman, D y Harlander S, 1988 Otras citas posteriores
<i>Streptococcus spp</i>	Harlander SK, 1986 Otras citas posteriores
<i>Staphylococcus aureus</i>	M. Sicard y A. Mercenier

Tomado de Chassy, et al. 1988 modificado. Las citas sin fecha son comunicación personal.

Desarrollo de vectores de clonación para bacterias lácticas

Los vectores de clonación son vehículos genéticos que tienen como características principales: Un origen de replicación adecuado a su célula hospedera para que puedan preservarse en la descendencia, marcadores fenotípicos fáciles de seleccionar como resistencia a antibióticos o marcadores que supriman fenotipos auxotróficos y alguna otra información como promotores de transcripción, etc. Estos vehículos pueden ser virus, como el lambda o plásmidos.

Generalmente, se construyen tomando fragmentos de DNA conocidos, que presentan los marcadores genéticos adecuados, y se fusionan con plásmidos provenientes de la célula a transformar. Cuando los orígenes de replicación de la célula hospedera son muy diferentes de los de *E. coli* o de *B. subtilis*, se le puede adicionar un origen de replicación de alguno de estos géneros para poder amplificar el plásmido recién construido.

a) Plásmidos en bacterias lácticas

En algunas BL se han encontrado plásmidos, desde uno hasta diez diferentes por cepa, muchos de ellos permanecen crípticos pero se sabe que otros codifican para funciones importantes para las células, dentro de ellas están:

- Utilización de azúcares: Lactosa, sacarosa, galactosa, manosa, xilosa, o citrato.
- Actividad proteásica
- Resistencia a antibióticos
- Resistencia a fagos
- Producción de bacteriocinas

Aunque se han realizado numerosos estudios descriptivos sobre la cantidad y tamaño de los plásmidos, no existe todavía información sobre la estabilidad, la compatibilidad, la replicación, el número de copias y la repartición en las células hijas de éstos. Por ejemplo Chassy en 1985 encuentra que seis cepas de *L. casei* presentan diferente número de plásmidos y que entre ellos no existe homología DNA-DNA. Asimismo, Damiani et al., (1987), obtienen la secuencia nucleotídica de plásmidos de *L. acidophilus* y *L. plantarum* respectivamente. Estos plásmidos presentan un origen de replicación que tiene cierto grado de homología con el del factor sexual F.

Los vectores de clonación eficientes deben presentar las siguientes características (Chassy et al., 1988):

- Estabilidad (conformacional y segregacional)
- Marcadores fáciles de seleccionar
- Número adecuado de copias
- Intervalo amplio de huéspedes (broad host range)

Aunque todavía existe falta de información sobre la biología plasmídica básica necesaria para la construcción de vectores de clonación perfectamente adaptados a las bacterias lácticas, se han realizado ya algunos intentos de construirlos a partir de algunos plásmidos crípticos provenientes de ellas. Esta información está recopilada en la tabla 2.

Tabla 2.

Vectores de clonación adaptados a bacterias lácticas

Nombre	tamaño (kpb)	Características	Ref.
pGK12	4.4	Plasmido críptico de <i>S. cremoris</i> Wg2 + Cm ^R (de PC194 <i>S. aureus</i>) + Em ^R (de pE194 <i>S. aureus</i>), estable en <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> y en varias cepas de BL.	Kok, et al. (1984)
pGKV1	4.8	pWV01 Em ^R (pE194 cop6) + cat sin promotor + promotor del fago Sp02 de <i>B. subtilis</i>	Van der Vossen et al. (1985)
pGKV11	4.8	pGKV1 + sitio de clonage multiple. Se puede utilizar para la selección de secuencias regulatorias y clonage de genes en <i>B. subtilis</i> , <i>S. lactis</i> y otras BL.	Van der Vossen et al. (1985)
pSA3	10.2	pACY184 (Cm ^R , Tc ^R , <i>E. coli</i>) pGB305 (Em ^R , <i>S. sanguis</i>) estable en <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>streptococci</i> y <i>lactobacilli</i> (?)	Dao y Ferreti 1985)
pNZ12	4.1	replicón de pSH71 (<i>S. lactis</i>) pC194 (CAT), pUB110 (Km ^R , <i>S. aureus</i>) estable en <i>E. coli</i> , estreptococos y <i>L. casei</i> .	De Vos (1986)
pLZ12	3.75	pNZ12 + sitio de clonage multiple en Km	De Vos (1986)
pLP825	7.6	plásmido críptico de <i>L. plantarum</i> +pHV60 (Ap ^R , Cm ^R , Tc ^R)	Leer (1989)
familia pIL	4.6- 133.2	pHV1301 (derivado de pAMB1 <i>S. lactis</i> Em ^R) Estable en alto o bajo número de copias en <i>S. lactis</i> , pueden mantener la clonación de fragmentos grandes de DNA.	Simon y Chopin (1988)

Clonación y expresión de genes heterólogos en las bacterias lácticas.

Pocos son los genes heterólogos que se han podido clonar en las BL excepto por un número de marcadores de resistencia a antibióticos usados en diferentes vehículos de clonación (De Vos, 1987). Entre los genes heterólogos que se han podido clonar en BL se encuentran: El gen de la proquimosina bovina (Simons, et al., 1989); el gen de lisozima de clara de huevo en *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, (Van de Guchte et al. 1989); el plásmido pE194 de *Staphylococcus aureus*, integrado y amplificado en el cromosoma de *Lc. lactis* spp. *lactis* (Chopin, et al., 1989); el gen de endoglucanasa de *Clostridium thermocellum* en *Lactobacillus plantarum* (Bates et al. 1989); genes de alfa-amilasa y endoglucanasa en *Lactobacillus plantarum*, los cuales fueron inestables cuando se encontraban como parte de un plásmido por lo que fueron, posteriormente, integrados en el cromosoma (Sheirlinck et al. 1989); genes de celulasa y xilanasas de varias cepas de *Clostridium* en *L. plantarum* (Sheirlinck et al. 1990); el gen de lipasa de *Staphylococcus hycus* en *Lactobacillus curvatus* Lc2C (Vogel et al. 1990); el gen de endoglucanasa de *Bacillus subtilis* en *Lactobacillus acidophilus* (Baik y Pack, 1990); y el gen de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* en varias cepas de *Lactobacillus* (Cocconcelli et al., 1991). Esta falta de resultados positivos es de particular interés

ya que indica que hacen falta estudios sobre la expresión genética tanto de genes heterólogos en bacterias lácticas.

Justificación

México posee una insuficiente producción de leche y necesita de su importación. La leche y sus derivados fermentados son, entonces, productos costosos y poco accesibles a una parte importante de la población y, sobre todo, a la infantil. Una alternativa a la producción lechera deficiente es la fabricación de alimentos provenientes de fermentaciones lácticas a partir de productos disponibles en grandes cantidades en el país, como los productos amiláceos, por ejemplo, las fermentaciones tradicionales del maíz ("pozol", "sancho", "atole agrio"), originarias de las épocas prehispánicas, que se continúan utilizando actualmente en muchas regiones rurales para conservar los alimentos derivados de estos granos. Sin embargo, estas fermentaciones tradicionales no han podido ser industrializadas por su alta variabilidad y la lentitud del proceso. Por lo que resulta interesante estudiar, en todos los niveles, a las bacterias responsables de la fermentación láctica de productos amiláceos tales como el maíz, la soya y el arroz.

Con esta base, nuestro proyecto propone la construcción, por medio de la tecnología del DNA recombinante, de una bacteria láctica amilolítica eficiente y estable que pueda ser utilizada en la producción de sucedáneos de leche y derivados, y en la conservación de alimentos tales como embutidos adicionados con almidón.

Objetivo general

Incorporar la capacidad amilolítica a cepas de bacterias homolácticas mediante la construcción de vectores que contengan el gen de alfa-amilasa para que puedan ser utilizadas en fermentaciones alimentarias a nivel industrial utilizando almidón como fuente de carbono.

Objetivos específicos

1. Caracterización de 7 cepas de BL:
 - 1.1. Determinar la posible producción de alfa-amilasa (actividad amilolítica).

2. Construcción, a partir de los plásmidos "lanzadera" previamente reportados pLZ12 (De Vos, 1986) y el pGKV11 (Van der Vossen, et al., 1985), y el gene de alfa-amilasa clonado de *Bacillus licheniformis* en el plásmido pJ07 (Joyet, 1984) de un plásmido híbrido que pueda replicarse en BL y que le confiera la capacidad de sintetizar alfa-amilasa.

3. Transformación de las BL por electroporación (Chassy y Flickinger, 1987; Aukrust y Nes, 1988; Somkuty y Steinberg, 1988).

Materiales y métodos

Se utilizaron siete cepas de bacterias lácticas, seis provenientes de la American Type Culture Collection (ATCC) (12301 Parklawn Drive. rockville, Mariland 20852 USA), y una amablemente proporcionada por el Dr. Bruce Chassy de la Universidad Estatal de Illinois en Champan-Urbana, éstas se enlistan en la Tabla 3. Las cepas se conservaron en cultivos de toda la noche en medio de cultivo de leche descremada al 10% y se resembraron en Medio de Acarreo para Lactobacilos (LCM), (Efthymiou y Hansen, 1962), antes de hacer cualquier técnica.

Las determinaciones de actividad amilolítica se realizaron en placas de LCM, para las bacterias lácticas o medio Luria-Bertani (Maniatis et al., 1982), para *E. coli*, ambos con 0.5-1% de almidón soluble y se determinaron halos de hidrólisis de almidón adicionando una solución de yodo de Lugol.

Tabla 3. Bacterias lácticas utilizadas en éste trabajo.

<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 11454
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 11007
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 393
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 8014
<i>Lactobacillus delbruekii</i> subsp. <i>delbruekii</i>	ATCC 9649
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	ATCC 19258
<i>Lactobacillus casei</i> 393 (pLZ15, lac ⁻ = 102 S)	

La obtención de los plásmidos de *Escherichia coli* se llevó a cabo mediante la técnica de lisis alcalina (Maniatis et al., 1982), mientras que la de los plásmidos silvestres de bacterias lácticas se realizó mediante la técnica descrita por Chassy y Guiffrida (1980), modificada en el laboratorio y que se describen brevemente a continuación.

Para la lisis alcalina, las células se crecieron toda la noche, se cosecharon y lavaron con amortiguador salino (STE). Se resuspendieron en 20ml de una solución amortiguadora de Tris 25mM, EDTA 50mM para evitar la acción de las nucleasas por el secuestro de Mg^{+2} , y con 5mg/ml de lisozima para digerir la pared celular bacteriana y se incubó durante 5 minutos a 0C. Se le adicionaron 40ml de una solución de hidróxido de sodio 2% y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%, para llevar a cabo la lisis alcalina y se dejó reposar durante 10 minutos. Para neutralizar la suspensión se le agregaron 30ml de una solución de acetato de potasio 5M pH 8. Esta solución provoca la precipitación de las proteínas y del SDS, permaneciendo en solución los ácidos nucleicos. Estos últimos se precipitan adicionando 50ml de isopropanol, que favorece la precipitación de material genético plasmídico. Por último, se purifica el DNA plasmídico del RNA mediante RNasa y se realiza una desproteínización fina mediante extracciones con fenol y cloroformo. El material preparado mediante esta técnica fue sensible al corte con enzimas de restricción y pudo ser usado para transformaciones tanto por el sistema tradicional como por electropermeabilización.

La preparación de plásmidos de BL presenta diferencias con la de *E. coli*. Estas consisten en que, para las BL, es necesaria la formación inicial de protoplastos, en virtud de que presentan una pared bacteriana muy gruesa que impide romperlas fácilmente por lo que después de cosecharlas y lavarlas con STE, se resuspendió el botón en 1/40 del volumen original del medio de cultivo en amortiguador de Tris 20mM. Se le agregó 1/20 del volumen original de una solución de polietilén glicol de peso molecular 20,000 al 24% y se le agregó lisozima hasta alcanzar una concentración de 20ug/ml. Se incubó en esta solución una hora a 0C al cabo de los que se centrifugó y decantó la solución de PEG-lisozima teniendo cuidado de eliminar la mayor parte de esta solución pues interfiere con la precipitación posterior de los ácidos nucleicos. El botón de esferoplastos se resuspendió en 1/10 del volumen original de solución amortiguadora de Tris 25mM y EDTA 50mM y se siguió la técnica de lisis alcalina de *E. coli*.

Las construcciones de los nuevos plásmidos se llevaron a cabo mediante las técnicas de clonación descritas en Maniatis et al. (1982), utilizando como materias primas los plásmidos pLZ12 (De Vos, 1986), y el pGKV11 (Van der Vossen, et al., 1985) y el gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, clonado previamente en el plásmido pJ07 (Joyet, 1984) y reclonado en el laboratorio en el plásmido pUC9, llamado pUCamy. Las estrategias de clonación se muestran en las figuras 1 y 2, respectivamente. La primera estrategia se

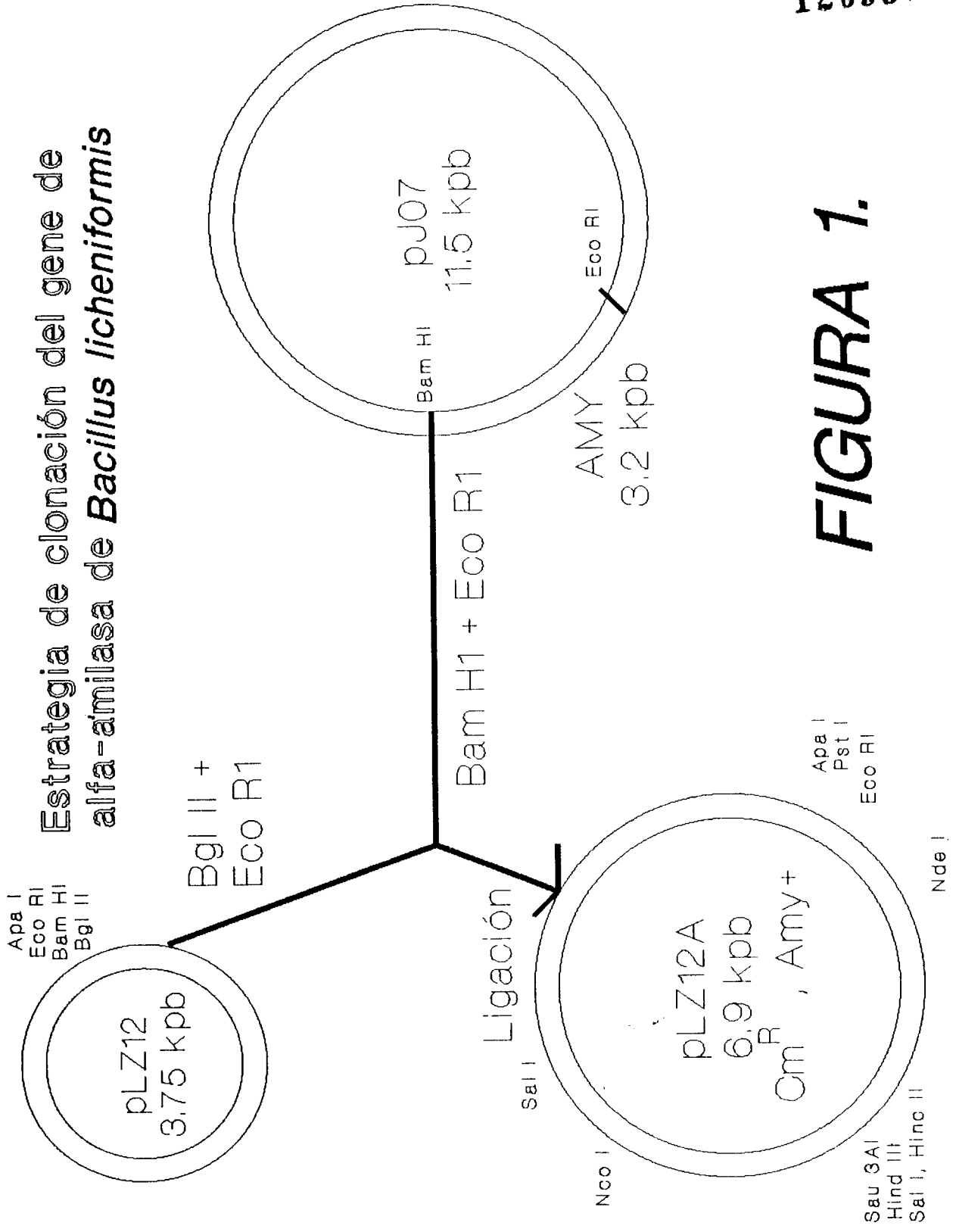
basa en que el gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis* se encuentra flanqueado por los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción (ER) Bam HI y Eco RI, quedando comprendido el gen completo incluyendo su región regulatoria. Por otro lado, el vector de clonación pLZ12 presenta una pequeña región de policlonación que presenta un sitio para cada una de las ER EcoRI y BglI; este último genera un sitio compatible de unión con un corte de la ER Bam HI. Al unirse los sitios generados por las ER anteriores, se pierde el sitio de reconocimiento para ambas enzimas, quedando solamente un sitio para la enzima Sau 3A. El plásmido resultante presenta el gen alfa-amilasa junto con su región reguladora, una región que proporciona resistencia a cloranfenicol y tiene un tamaño de 6.9 kilopares de bases (kpb).

La segunda estrategia aprovecha el hecho de que este gen de alfa-amilasa presenta un sitio Nde I justo en la región de inicio de traducción por lo que se decidió colocarlo en el vector de clonación pGKV11 que cuenta con una región de policlonación colocada en seguida del promotor de *Bacillus subtilis* SPO2 (Williams, 1981), y que ha probado ser activo en estreptococos (van der Vossen 1985). Para esto, el gen de alfa amilasa se cortó con la ER Nde I y, posteriormente, se trató con exonucleasa 5' de garbanzo (Mung Bean) para generar un extremo romo. En seguida se cortó el fragmento con Hind III y se incertó en el plásmido pGKV11 cortado con las ER SmaI, que genera un extremo romo y Hind III con lo cual se

obtiene una "inserción dirigida" en el vector de clonación, que tiene el promotor de transcripción SPO2 al inicio del gen de alfa-amilasa. El plásmido resultante presenta una región que le proporciona resistencia a eritromicina, el gen de alfa-amilasa sin su región regulatoria pero dirigida su transcripción por el promotor SPO2 y un tamaño de 7.9kpb.

La electroporación de bacterias lácticas se realizó mediante la técnica descrita por Chassy y Flickinger 1987 y las de *E. coli* por la descrita en el manual de usuario del electroporador Gen Pulser de Biorad. Brevemente, las células de *E. coli* se crecieron en LB con agitación o, en el caso de las BL, en LCM hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-1. Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron con el mismo volumen de una solución amortiguadora de HEPES 1mM, cloruro de magnesio 1mM y sacarosa 300mM (MEP). Posteriormente se lavaron cuatro veces más con 1 ml de MEP. Por último se resuspendieron en 400ul de MEP. Se colocaron 50 ul de la suspensión celular en celdas para electroporación y se les agregó, justo antes de electroporar, 1ul de solución de DNA plasmídico con una concentración de 1ug/ul. Se les dió un pulso de electroporación diferente según la cepa al cabo de la que se les agregó 450ul de medio de cultivo. Se incubó durante 1 hora y se sembró en cajas con medio de cultivo adecuado y con el antibiótico correspondiente. Todas las técnicas se describen más ampliamente en el Anexo 1.

**Estrategia de clonación del gene de
alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis***



126937

FIGURA 1.

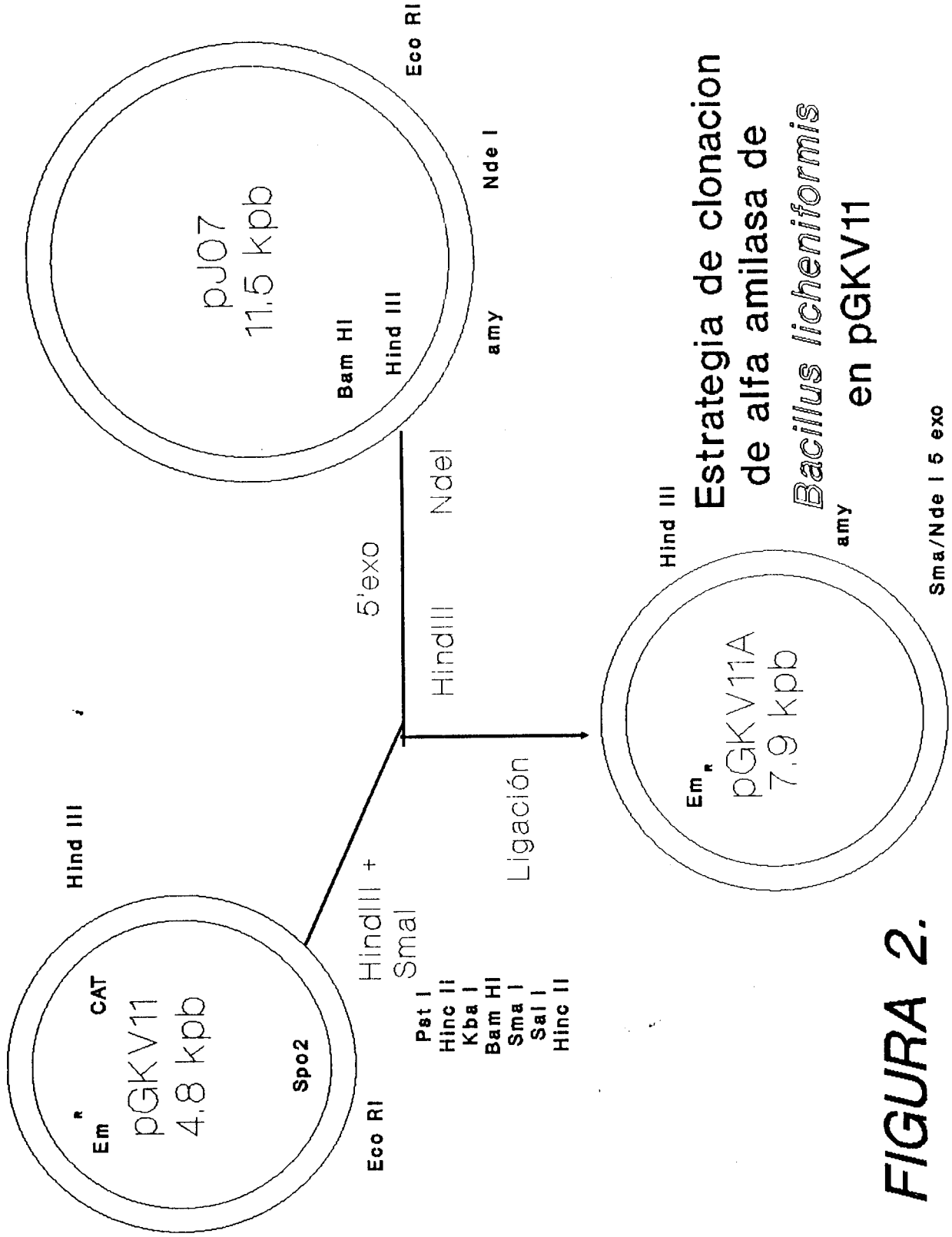


FIGURA 2.

Resultados y Discusión

Las 7 cepas de BL se hicieron crecer en LCM con 1% de almidón encontrándose que ninguna presentó crecimiento significativo después de 4 días de cultivo a 37C. Tampoco presentaron halos de hidrólisis del almidón por lo que se concluye que ninguna de las cepas presenta actividad amilolítica.

Las condiciones de electroporación para las cepas de bacterias lácticas que se utilizaron en el presente estudio no fueron encontradas en la literatura, por lo que se procedió a determinarlas haciendo un barrido del voltaje y la resistencia en paralelo necesarias para la electroporación.

Las condiciones de electroporación encontradas para las cepas de BL se encuentran en la Tabla 4. En ella podemos observar que varían entre 6 y 10Kv/cm para *L. plantarum* y *Lc. lactis*, respectivamente; 100 o 200 ohms de resistencia en paralelo y como medio de cultivo LCM normal o adicionado con 1% de glicina; esta última, con el fin de modificar los enlaces cruzados del peptidoglicano de la pared celular bacteriana y hacerla más sensible a la electroporación; para el mismo fin, se pueden usar L-treonina o L-lisina (Chassy et al., 1988). En este caso la glicina demostró ser efectiva en *L.*

plantarum, *Lc. lactis* 11454 y 11007 y *S. salivarius subsp. thermophilus*. Con esas condiciones se obtuvieron entre 20 y 165 transformantes por ug de DNA, teniendo como control positivo a la cepa de *Lactobacillus casei* 102S con la que se obtuvieron aproximadamente 10^4 transformantes por ug de DNA.

Tabla 4. Condiciones de electroporación para bacterias lácticas *

Cepa	Kv/cm	ohms	M. cultivo	transf/ μ g DNA
<i>L. plantarum</i>	6	100	LCM-gli-sac	165
<i>Lc. lactis</i> 11454	10	200	LCM-gli-sac	30
<i>L. casei</i> 102S	6	200	LCM	5000
<i>L. delbruekii</i>	9	200	LCM	100
<i>L. lactis</i> 11007	6	200	LCM-gli-sac	93
<i>S. termophilus</i>	8	100	LCM-gli-sac	20

1. Medio de cultivo para lactobacilos con glicina al 1% y sacarosa 0.5M.

LCM. Medio de cultivo para lactobacilos

* Promedio de dos experimentos

Los resultados con todas las cepas son bajos; sin embargo, el control positivo se encuentra en el intervalo reportado previamente (Chassy, 1987), además los valores de transformación para algunas cepas de BL son muy bajos también (Chassy et al., 1988). Esta eficiencia de transformación, aunque baja, fue considerada suficiente para probar la transformación de las cepas con las nuevas construcciones.

La construcción del plásmido pLZ12-amy a partir del vector de clonación pLZ12 (De Vos, 1986), de 3.75kpb y el gen de alfa-amilasa, de 3.2kpb, clonado de *Bacillus licheniformis* en el plásmido pJ07 (Joyet, 1984), se llevó a cabo obteniéndose un plásmido de 6.92 kilopares de bases. Este plásmido fue amplificado en *E. coli* para obtener una mayor cantidad de DNA, en esta cepa se obtuvo una actividad amilolítica fuerte que se muestra en la figura 3. En la Figura 4 se muestra un electroferograma de este plásmido junto con su patrón de restricción. Se puede observar que el plásmido linearizado con las ER Eco RI (carril 1) y Hind III (carril 2), corresponde aproximadamente a 6.8kpb comparado con el marcador de peso molecular (carril 8) y, además, la suma de los tamaños aparentes de los fragmentos de las digestiones dobles (carril 3 y 4) es el mismo. En el caso de la digestión Eco RI + Hind III (carril 3), el plásmido presenta 2 fragmentos ya que sólo se encuentra un sitio para cada una de estas ER. En el caso de la digestión con Pst I, se generan 2 fragmentos y con Nco I sóloamente 1 por lo que al digerir con ambas, se generan 3 fragmentos ya que el vector de



Figura 3. *Escherichia coli* MC1061 transformada con el plásmido pLZ12-amy crecida en cajas con medio de cultivo Luria Bertani más almidón y revelados los halos de hidrólisis mediante yodo de Lugol.

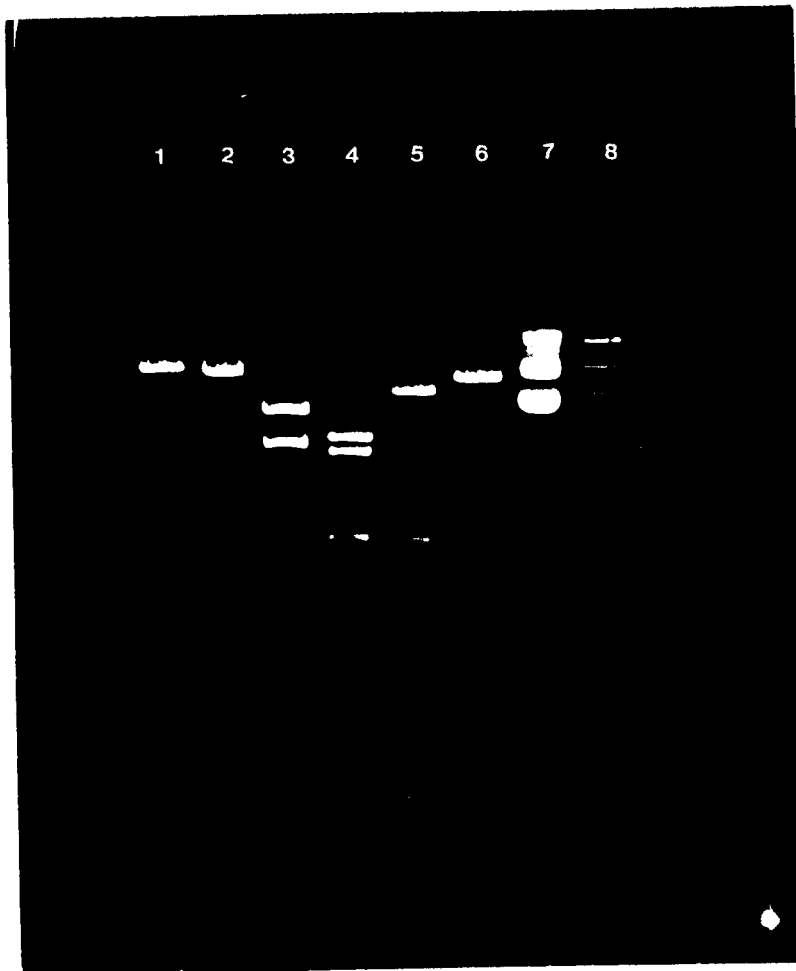


Figura 4. Electroferograma que muestra el patrón de restricción de pLZ12-amy, cortado en digestiones sencillas y dobles.

1. pLZ12-amy/Eco RI,
2. pLZ12-amy/Hind III,
3. pLZ12-amy/Eco RI + Hind III,
4. pLZ12-amy/Pst I +Nco I,
5. pLZ12-amy/Pst I,
6. pLZ12-amy/Nco I,
7. pLZ12-amy control,
8. Lambda/Hind III.

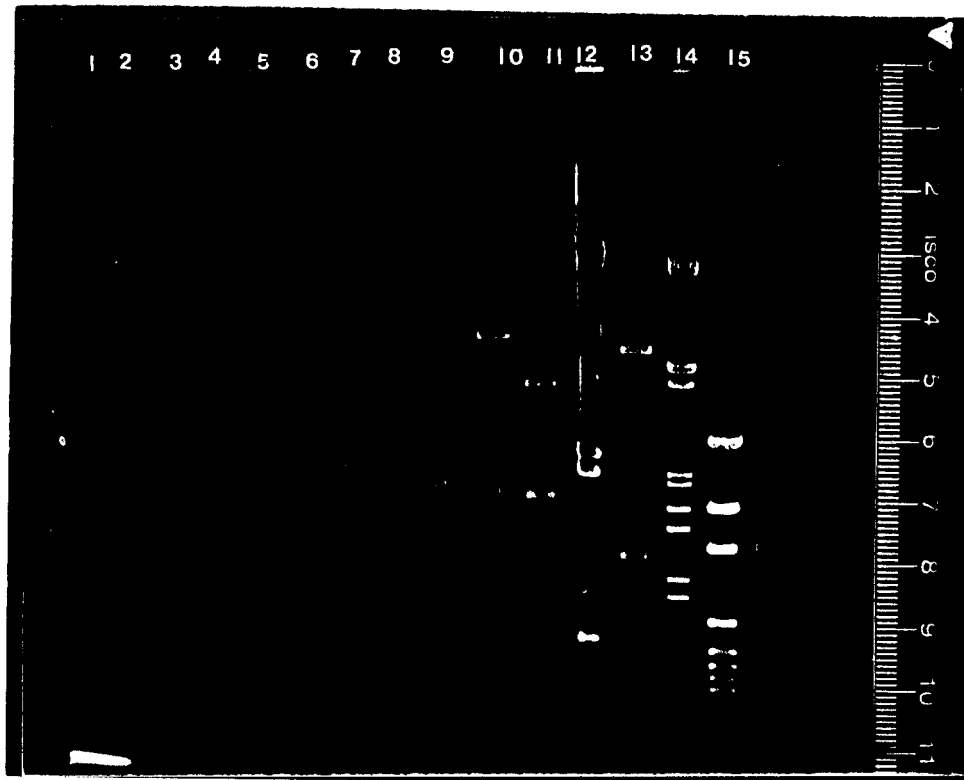


Figura 5. Electroferogramma que muestra el patrón de restricción de los plásmidos obtenidos de bacterias lácticas después de haberlas transformado con pLZ12-amy.

1. *L. casei* 4646/Pst I, 2. *L. casei* 4646/Hind III, 3. *L. casei* 4646/Pst I + Hind III, 4. *Lc. lactis* 11007/Hind III, 5. *Lc. lactis* 11007/Hind III, 6. *Lc. lactis* 11007/Hind III + Pst I, 7. *L. casei* 102S/Pst I, 8. *L. casei* 102S/Hind III, 9. *L. casei* 102S/Hind III + Pst I, 10. pLZ12-amy/Hind III, 11. pLZ12-amy/Hind III + Pst I, 12. Lambda/Hind III, 13. pLZ12-amy/Pst I, 14. Lambda/Eco RI + Hind III, 15. pGEM/Eco RI + Hind III.

clonación presenta un sitio de reconocimiento para la ER PstI y uno para Nco I y el gen de alfa-amilasa presenta otro sitio para Pst I.

Al transformar con el pLZ12-amy a las BL se encontró que sólo se transformaron las cepas *L. casei* 102S, *L. thermophilus* 19258, *Lc. lactis* 11007 y *L. casei* 4646, seleccionadas por su resistencia a cloranfenicol. Sin embargo, no se encontró ninguna clona amilasa positiva. Se obtuvieron plásmidos de las cepas 4646, 11007 y 102S y se cortaron con las enzimas de restricción Hind III y Pst I tanto por separado como conjuntamente y el electroferograma obtenido se muestra en la figura 5. En éste se puede observar que los plásmidos que se encontraron no corresponden al peso molecular del pLZ12 ni a pLZ12-amy, y se generan varios fragmentos ninguno de los cuales presenta un tamaño similar a los producidos a partir de pLZ12-amy obtenido de *E. coli*, estos resultados parecen indicar que dicha construcción presenta inestabilidad conformacional dentro de las BL de la misma forma como ya se ha descrito para *Streptomyces lividans* (Kiese, et al., 1982), y para *Bacillus subtilis* (Alonso y Trautner, 1985), en donde se han documentado deleciones tanto pequeñas como extensas. Para *B. subtilis*, además, se han realizado estudios en los que se demuestra que plásmidos que contienen insertos homólogos o heterólogos de DNA se heredan de una manera inestable aun en cepas Rec⁻ (Han y Dubnau, 1985). No obstante lo anterior, para descartar que las BL transformadas recibieron el plásmido y, sin embargo, sólo

expresaron la resistencia al cloranfenicol pero no habían podido expresar la actividad amilolítica, se transformó *E. coli* MC1061 con el supuesto pLZ12-amy obtenido de las BL, no encontrándose ninguna clona que expresara actividad amilolítica, aunque sí se encontraron algunas transformantes con resistencia al cloranfenicol.

La segunda construcción, el plásmido pGKV11-amy, no pudo ser amplificada en *E. coli* ya que tiene un origen de replicación específico de *B. subtilis* (Van der Vossen et al., 1985) pero tampoco pudo ser amplificado en *Bacillus* pues, una vez adicionado el gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis*, éste presenta una región de homología alta con el cromosoma de la cepa receptora y, como se mencionó anteriormente, esto puede ocasionar recombinaciones y pérdidas de la zona de homología. Además, estas posibles recombinantes no son fáciles de identificar de las no recombinantes ya que presentarían el mismo fenotipo de resistencia a cloranfenicol y amilasa positivas. Por estas razones, se trató de clonar el nuevo plásmido pGKV11-amy directamente en las cepas de bacterias lácticas encontrándose clonas amilasa positivas solamente en las cepas 102S y 19258. Aunque no se cuantificó específicamente, estas cepas amilasa positivas crecen más lentamente que las mismas cepas sin plásmido o con el plásmido original, es decir, sin el gen de alfa-amilasa insertado. Esta gran diferencia en la velocidad de crecimiento parece indicar que el vector recién clonado más el gen de alfa-amilasa son una carga fisiológica muy pesada

para la célula. Este proceso de disminución de la velocidad de crecimiento de las células que tienen un plásmido activo dentro de ellas es uno de los problemas que se han presentado dentro de la producción de proteínas industriales por medio de ingeniería genética y ha sido abordado desde diferentes puntos de vista por otros autores, ya sea diseñando estrategias para controlar el alto número de copias de plásmido por célula (Seo y Bailey, 1985; Ryan y Parulekar, 1991), o el momento y la fuerza con que se expresa el gen clonado en la cepa (Betenbaugh y Beaty 1988), ya que en esta construcción se le quitó la región reguladora al gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis* y se reemplazó con el promotor SPO2 de *B. subtilis* que ha demostrado ser un promotor fuerte y constitutivo en BL (Van der Vossen et al., 1985).

Conclusiones

126937

Se lograron determinar las condiciones de electroporación de 5 cepas de BL obteniéndose frecuencias bajas de transformación que oscilan entre 20 y 165 transformantes por μg de DNA plasmídico.

Se lograron construir los dos plásmidos propuestos en los objetivos. El pLZ12-amy se amplificó en *E. coli*, caracterizándose su mapa de restricción y demostrándose que la construcción es correcta. Esta nueva construcción se utilizó para transformar varias cepas de BL lográndose transformar *L. casei* 102S, *L. thermophilus* 19258, *Lc. lactis* 11007 y *L. casei* 4646, determinado lo anterior por la resistencia que presentaron a cloramfenicol. Se obtuvo DNA de las cepas 4646, 11007 y 102 S y se demostró que los plásmidos obtenidos no eran similares a los que se obtienen de *E. coli* y que presentan un tamaño de 6.8 kpb.

La construcción del plásmido pGKV11 se comprobó sólomente por la transformación del material en BL ya que no fue posible amplificarlo en *B. subtilis*. Las BL que fueron transformadas con este plásmido fueron *L. casei* 102S y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* 19258 que presentaron resistencia a eritromicina y una actividad amilolítica débil. Una característica de estas transformantes es que crecen lento, en comparación con las cepas sin plásmido o las que contienen el plásmido pGKV11. Esta disminución en la velocidad de crecimiento puede deberse a una sobrecarga

metabólica de la célula al incorporársele un promotor fuerte y constitutivo.

Dirección futura de la investigación

El trabajo presentado abre más preguntas de las que responde. En primer lugar, la baja tasa de transformación por electroporación hizo difícil encontrar suficientes transformantes para analizar más a fondo los tipos de deleciones sufridas por el plásmido pLZ12-amy por lo que se tienen que buscar mejores condiciones de electroporación para encontrar más transformantes y poder analizarlos convenientemente. Con el fin de amplificar y, posteriormente, analizar al plásmido pGKV11-amy, es necesario obtener una cepa de *Bacillus subtilis* no amilolítica, pues parece ser que el número de copias que logra alcanzar dentro de BL es muy bajo.

Anexo. 1. Técnicas utilizadas en la presente tesis.

Preparación de plásmidos sin gradiente de cloruro de cesio

1. La técnica es para 250ml de medio de cultivo ya sea crecido toda la noche o amplificado.

2. Centrifugar 10 minutos a 7,000rpm en rotor GSA. Lavar 1 ó 2 veces con STE.

3. Resuspender en 20 ml de Tris-HCl 25mM pH 8 y EDTA 50mM. Si las células presentan dificultad para lisarse agregar lisozima a una concentración final de 5-20mg/ml e incubar entre 10 y 30 minutos en hielo.

4. Adicionar 40ml de NaOH 0.2M - SDS 1%. Agitar por inversión. Incubar en hielo 10 minutos. En este momento el lisado se vuelve viscoso y claro.

5. Agregar 30ml de Acetato de potasio 5M (Acetato de potasio 3M y ácido acético 2M pH 8). Mezclar por inversión. Incubar en hielo 5 minutos.

6. Centrifugar 15 minutos a 10,000rpm, coleccionar el sobrenadante en una botella de centrifuga de 250ml.

7. Agregar 0.6 vol de Isopropanol (aprox. 50ml). Incubar a temperatura ambiente 2 minutos. Centrifugar 15 minutos a 10,000rpm. Descartar el sobrenadante.

8. Disolver en 5ml de TE 8 y agregar 2.5ml de acetato de amonio 7.5 M. Incubar en hielo 20 minutos. Pasar a un tubo de centrifuga de 40 ml.

9. Centrifugar 15 minutos a 10,000rpm. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 2 vol (aprox. 15 ml) de etanol absoluto. Mezclar e incubar 2 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 15 min a 10,000rpm.

10. Disolver el botón en 750 ul de TE 8, adicionar 15ul de RNasa A 1mg/ml (20ug/ml final) e incubar 1 hr a 65½C

11. Extraer con fenol-cloroforno tres veces. Adicionar 1/10 de vol de acetato de sodio 3M.

12. Precipitar con 2 volúmenes de etanol absoluto, incubar 2 minutos y centrifugar 10 minutos a 10,000rpm a 4½C. Lavar con etanol al 70%.

13. Disolver en 1 ml de TE8. Para cuantificar espectrofotométricamente diluir 1 --> 100.

126937

Defosforilación de extremos 5' de DNA con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP).

1. Digerir el DNA (19-20ug) con 2 ó 3 veces exceso de la enzima de restricción deseada. Tomar una alícuota (aprox. 0.3 ug), y analizar el grado de digestión por electroforesis (EF), en gel de agarosa al 0.8%. Si la digestión es incompleta, adicionar más enzima y continuar hasta lograr la hidrólisis total.

2. Cuando la digestión es completa, extraer la muestra con fenol-cloroformo y precipitar con 2 volúmenes de etanol, incubando por 5 min. a $0\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. Recobrar el DNA por centrifugación a 12,000rpm por 10 min. a $4\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$ en una microfuga. Redisolverlo en 90ul de Tris-Cl 10mM pH 8.3). Remover una alícuota del DNA (200ng) y guardarlo a $-20\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$.

3. Agregar al DNA que queda, 10ul de amortiguador para desfosforilación 10X y una cantidad apropiada de fosforilasa de intestino de ternera (CIP) e incubar como sigue:

Para:

Extremos cohesivos.- 1 unidad/100 pmoles de DNA 30 min. a $37\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$.

Extremos razos.- 1 unidad/2pmoles de DNA 15 min a $37\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. Luego adicionar otra alícuota de CIP e incubar 45 min más a $55\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$.

4. Adicionar SDS y EDTA (pH8), a una concentración final de 0.5% y 5mM respectivamente. Mezclar bien y adicionar proteinasa K a una concentración final de 100ug/ml. Incubar 30 min a $56\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$.

5. Enfriar a temperatura ambiente lentamente y extraer con fenol, fenol-cloroformo, cloroformo y éter. Agregar 1/10 del vol de Acetato de Sodio 5M (pH7) y 2.5 volúmenes de Etanol absoluto. Lavar con etanol al 70%. Secar al vacío y redisolver el DNA precipitado en TE a una concentración final de 100ug/ml. Guardar en alícuotas a $-20\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$.

NOTAS.

A. Utilizar acetato de sodio 3M pH7, pues el EDTA puede precipitarse a pH mas ácido.

B. Al preparar vectores para clonación direccional, evitar el uso de sitios de restricción que estén directamente adyacentes uno del otro en un sitio de policlonación. Después que uno de estos sitios ha sido cortado, el segundo sitio puede estar colocado a sólo unas pocas bases del final de la molécula de DNA lineal. Esto es muy cerca para permitir un rompimiento eficiente para muchas enzimas de restricción. Es importante asegurarse que ambas enzimas de restricción han digerido el vector completamente. Esto se puede hacer de la siguiente manera:

Digerir el vector con una de las 2 enzimas de restricción. Cuando se usen enzimas que trabajan óptimamente en amortiguadores de diferente fuerza iónica, usar el amortiguador de menor fuerza iónica primero. Al final de la digestión, revisar una alícuota del DNA en EF en gel. Si todo el DNA plasmídico ha sido convertido de su forma circular a la lineal, ajustar la concentración de sal apropiadamente y adicionar la segunda enzima. Al mismo tiempo colocar una reacción piloto separada que contenga el plásmido circular y sólo la segunda de las 2 enzimas de restricción. Cuando todo el DNA en la reacción piloto se ha convertido a su forma lineal (determinado por EF), purificar el segmento grande del DNA plasmídico por EF y electroelución.

Ligación de prueba y transformación.

La mejor manera de saber cuándo una defosforilación ha tenido éxito, es hacer una serie de ligaciones de prueba y transformaciones como sigue:

1. Colocar las siguientes ligaciones:

Ligación A.- 200ng de plásmido defosforilado.

Ligación B.- 200ng de plásmido defosforilado + 200ng del fragmento de DNA extraño que tenga extremos compatibles y fosforilados.

Ligación C. 200ng de plásmido linearizado no tratado con CIP.

2. A cada ligación de prueba agregar

Amortiguador de ligación 10X	1ul
ATP 10mM	1ul
H ₂ O	10ul

3. Adicionar 0.5 unidades Weiss de ligasa de DNA de fago T4 a cada ligación.

4. Transformar células competentes de *E.coli* con 0.0, 0.01, 0.1 y 1.0 ul de cada una de las ligaciones. Como control positivo, transformar *E.coli* con una solución estándar que contenga una cantidad conocida de plásmido circular cerrado. Plaquear 1, 10 y 50ul de cada mezcla de transformación en placas con el antibiótico adecuado. Después de incubar a 37½C durante 16 hrs, contar el número de colonias en cada placa. La defosforilación debe reducir la eficiencia de transformación al menos en un factor de 50 (ligación A vs lig. C). La ligación de DNA extraño a un DNA plasmídico lineal defosforilado debe incrementar la frecuencia de transformación por un factor de al menos 5 (ligación B vs A).

NOTA.

Es indispensable incluir dos controles en cada transformación.

--Una reacción de transformación falsa en que no se recibe ningún DNA (Control negativo).

--Una transformación en que se recibe una cantidad conocida de DNA plasmídico circular covalentemente cerrado (control positivo).

Obtención de plásmidos de bacterias lácticas.

1. Empezar con un cultivo estático de 16-18 horas inoculado de un precultivo fresco en LCM.
2. Leer la absorbancia (A) 600nm (usualmente en una dilución 1/10)
3. Cosechar por centrifugación y lavar con amortiguador T.
4. Resuspender completamente el botón en amortiguador T (1/40 del volumen original)
5. Adicionar PEG (1/20 del volumen del cultivo original) y mezclar bien.
6. Adicionar lisozima disuelta en T (calcular la cantidad de lisozima que dará 100ug para cada unidad de A-600 del cultivo original).
7. Incubar a 37½C por 20-60 minutos según la cepa.
8. Cosechar por centrifugación a 5,000rpm por 5 min. Decantar y remover toda la solución de PEG con papel absorbente pues interfiere con la precipitación del DNA. Los esferoplastos frecuentemente se aglutinan y son difíciles de resuspender, esto es un buen signo.
9. Resuspender completamente el botón celular en 0.1 del volumen de cultivo original de TE 25-50 pH 8.
10. Seguir con la técnica de lisis de *E. coli* en el punto 3 adecuando los volúmenes a la cantidad de medio de cultivo del cual se empezó la presente técnica.

Soluciones

T - 0.02M Tris-HCl, pH 8.2

PEG - Polietilen glicol 20M (carbowax 20,000) 24%

TE - Tris-HCl 10mM pH 8.0 - EDTA 1mM

TE 25-50 Tris-HCl 25mM pH 8.0 - EDTA 50mM

Medio de Luria-Bertani (LB)

g/l

Triptona10
 Extracto de levadura... 5
 NaCl.....10
 Agua destilada.....cbp 1l

Lactobacillus carrying medium (LCM)

g/l

Tripticasa.....10
 Extracto de levadura... 5
 Triptosa..... 3
 K_2HPO_4 3
 KH_2PO_4 3
 Citrato de amonio..... 2
 Tween 80.....1
 Acetato de sodio.....1
 Cisteina.....0.2
 Solución salina.....5ml
 Agua destilada.....cbp 1000ml

Solución salina para LCM

g

$MgSO_4 \cdot H_2O$14.5
 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$4.68
 $MnSO_4 \cdot 2H_2O$2.4
 agua destilada.....cbp 100ml

Al LCM base se le tienen que agregar como fuente carbonada azúcares a una concentración de 20g/l de medio a partir de soluciones concentradas esterilizadas de manera independiente. Para usarlo con almidón, éste se adiciona al 1% antes de esterilizar.

Solución amortiguadora Tris-EDTA-Salino

Tris-HCl pH7.5 10mM
 NaCl 10mM
 EDTA 1mM

Solución amortiguadora para electroforesis TAE
(50X)

Tris base	242 g
Acido acético glacial	57.1ml
EDTA 2H ₂ O	37.2g
pH	8.5

La solución de trabajo es 1.0-0.5X

Electroporación bacteriana

Para *E.coli*:

1. Partir de un precultivo fresco.
2. Inocular 10 ml de LB con 1 ml del precultivo y crecer las células hasta una densidad óptica a 600nm de 0.75-1.0.
3. Cosechar en centrífuga clínica y lavar con 10 ml de medio de electroporación (MEP).
4. Resuspender en 1 ml de MEP y lavar 4 veces más en microfuga centrifugando cada vez a 10,000rpm durante 30-40 segundos.
5. Resuspender en 200ul de MEP si se creció en cultivo estático y en 1ml si se agitó.
6. Colocar 50ul de la suspensión celular lavada en celdas de electroporación estériles (Lavarlas con NaOH 0.1M y posteriormente con etanol 70% si no son nuevas).
7. Adicionar 1ug de DNA que se encuentre en 1ul de TE o agua justo antes de electroporar.
8. Electroporar según las condiciones óptimas de la cepa.
9. Agregar 450 ul de LCM o medio SOC e incubar 1 hora a 37½C.
10. Sembrar en medio de cultivo con el antibiótico específico las diluciones 10⁰, 10⁻¹, 10⁻².
11. Hacer cuenta viable para determinar el porcentaje de muerte celular.

Condiciones de electroporación para algunas cepas

	Pulse controler (ohms)	Gen pulser (Kv)	Capacitancia (mF)
<i>E.coli</i>	200	2.5	25
<i>L.casei</i>	200	1.2	25
<i>L.bulgaricus</i>	200	0.85	25

Medio de Electroporación

HEPES..... 1mM
 MgCl₂..... 1mM
 Sacarosa.....300mM.

Literatura citada

- Alonso JC y Trautner TA. (1985). Generation of deletions though a *cis*-acting mutation in plasmid pC194. *Mol. Gen. Genet.* 198,432.
- Angier, N. (1986) A stupid cell with all the answers. *Discover* 7,70-83.
- Aukrust T y Nes, IF. (1988) Transformation of *Lactobacillus plantarum* with the plasmid pTV1 by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 52,127-132.
- Avery OT, MacLeod CM and McCarty M. (1944) Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J. Exp. Med.* 79,137-158.
- Ayebo AD, Shahani KM y Dam R. (1981) Antitumor component(s) of yogurt, fractionation. *J. Dairy Sci.* 64,2318-2323.
- Bacterial electro-transformation and pulse controller instruction manual (catalog No. 165-2098) (versión 1.0) Bio-Rad Laboratories, 1414 Harbour Way South, Richmond, CA 94804 USA.
- Baik B y Pack MY. (1990) Expression of *Bacillus subtilis* endoglucanase gen in *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnol. Lett.* 12,919-924.
- Baltimore D. (1970) RNA dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* 226,1209-1211.
- Bates EEM, Gilbert HJ, Hazlewood GP, Huckle J, Laurie JL y Mann SP. (1989) Expression of a *Clostridium thermocellum*

- endoglucanase gene in *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 55,2095-2097.
- Batt CA. (1986) Genetic engineering of *Lactobacillus*. Food Technol. 40,95-98.
- Beerens H, Romond C y Neut C. (1980) Influence of breast feeding on the bifid flora of newborn intestine. Am. J. Clin. Nutr. 33,2434-2439.
- Betenbaugh MJ, Beaty C y Dhurjati P. (1988) Effects of plasmid amplification and recombinant gene expression on the growth kinetics of recombinant *E. coli*. Biotechnol. Bioengin. 33,1425-1433.
- Brown JP. (1977) Role of gut flora in nutrition and health: a review of recent advances in bacteriological techniques, metabolism and factors affecting flora composition. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 8,229-336.
- Bullen CL y Tearle PV. (1976) *Bifidobacteria* in the intestinal tract of infants: an in vitro study. J. Med. Microbiol. 9,335-344.
- Chandler MS y Morrison DA. (1987). Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: Molecular cloning of *com A* competence control. J. Bacteriol. 169, 2005-2011.
- Chassy BM. (1985) Prospects for improving economically significant *Lactobacillus* strains by genetic technology. Trends Biotechnol. 3,273-275.
- Chassy BM. (1987) Prospects for the genetic manipulation of lactobacilli. FEMS Microbiol. Lett. 46,297-312.

- Chassy BM y Flickinger JL. (1987) Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. FEMS Microbiol. Lett. 44,173-177.
- Chassy BM y Guiffrida A. (1980) A method for the lysis of gram-positive asporogenous bacteria with lysozyme. Appl. Environ. Microbiol. 39,153-158.
- Chassy BM, Mercenier A y Flickinger J. (1988) Transformation of bacteria by electroporation. Trends Biotechnol. 6,303-309.
- Chen JD y Morrison, DA. (1987) Microbiological modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. J. Gen. 133, 1959-1967.
- Chopin MC, Chopin A, Rouault A y Galleron N. (1989) Insertion and amplification of foreign genes in the *Lactococcus lactis* subsp *lactis* chromosome. Appl. Environ. Microbiol. 55,1769-1774.
- Cocconcelli PS, Morelli L, Vescovo M, y Botazzi V. (1986) Intergeneric protoplast fusion in lactic acid bacteria FEMS Microbiol. Lett. 35,211-214.
- Cocconcelli PS, Gasson MJ, Morelli L y Botazzi V. (1991) Single-stranded DNA plasmid, vector construction and cloning of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase in *Lactobacillus*. Res. Microbiol. 142,643-652.
- Cohen S, Chang H, Boyer H. y Helling R. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69,3240-3244.

- Cohen SN y Boyer HW. (1978) Process for producing biologically functional molecular chimeras. US. Patent No. 4237224.
- Crick FHC. (1966) The genetic code, yesterday, today and tomorrow. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31,3-9.
- Daly C, Syine WE y Elliker PR. (1972) Interaction of food starter cultures and food-borne pathogens: *Streptococcus diacetylactis* versus food pathogens. J. Milk Food Technol. 35,349-457.
- Damiani G, Romangnoli F, Ferretti L, Morelli L, Bottazzi V y Sgaramella V. (1987) Sequence and functional analysis of a divergent promoter from a cryptic plasmid of *Lactobacillus acidophilus* 168S. Plasmid 17,69-72.
- Dao ML y Ferreti JJ. (1985) *Streptococcus-Escherichia coli* shuttle vector pSA3 and its use in the cloning of streptococcal genes. Appl. Environ. Microbiol. 49,115-119.
- De Vos WM. (1986) Gene cloning in the lactic streptococci. Neth. Milk Dairy J. 40,141-154.
- De Vos WM. (1987) Gene cloning and expression in lactic streptococci. FEMS Microbiol. Lett. 46,281-295.
- Dellaglio F y Santi E. (1984) Role of lactic acid bacteria during the forages preservation. Microbiol. Alim. Nutr. 2,109-121.
- Efthymiou C y Hansen CA. (1962). An antigenic analysis of *Lactobacillus acidophilus*. J. Infect. Diseases. 110,258-267.

- Elliker PR, Syine WE, Hauser BA y Moseley WK. (1964) Influence of culturing cottage cheese dressing with different organisms on flavor and keeping quality. J. Dairy Sci. 47,680-685.
- Friend BA y Shahani KM. (1984) Nutritional and therapeutic aspects of lactobacilli. J. Appl. Nutr. 36,125-153.
- Fuchs A. (1983) Symposium on lactic acid bacteria foods: genetics, metabolism and applications. Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. 49,209-352.
- Goldin BR y Gorbach SL. (1983) The effect of oral administration of *Lactobacillus* and antibiotics on intestinal bacterial activity and chemical induction of large bowel tumor. Develop. Ind. Microbiol. 25,139-150.
- Griffith F. (1928) The significance of pneumococcal types J. Hyg. 27,113-159.
- Grunewald KK. (1981) Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented with *Lactobacillus acidophilus*. J. Food Sci. 47,2708-2709.
- Hahn J y Dubnau D. (1985). Analysis of plasmid deletional instability in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 162,1014.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580.
- Hayes W. (1968). The genetics of bacteria and their viruses, 2nd ed. Blackwell, Oxford.pp325-380.
- Heierson A, Landen R, Lovgren A, Dalhammar G y Boman HG. (1987) Transformation of vegetative cells of *Bacillus*

- thuringiensis* by plasmid DNA. J. Bacteriol. 169, 1147-1152.
- Hepner G, Fried R, Jeor SS y Fusetti L. (1977) Hypochloresterolemic effect of yogurt and milk Am. J. Clin. Nutr. 32,19-24.
- Hopwood DA. (1981) Genetic studies with bacterial protoplast. Annu. Rev. Microbiol. 35,237-272.
- Iwata M, Mada M y Ishiwa H. (1986) Protoplast fusion of *Lactobacillus fermentum*. Appl. Envirom Microbiol, 52,392-393.
- Jackson D, Symons R y Berg P. (1972) Biochemical mehtod for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70,3240-3244.
- Jacob F y Monod J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3,318-356.
- Joyet P, Guérineau M y Heslot H. (1984) Cloning of a thermoestable alfa-amylase gen from *Bacillus licheniformis* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Lett. 21,353-358.
- Kiese T, Hopwood DA, Writh HM y Thopson CJ. (1982) pIJ101, a multicopy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectos. Mol. Gen Genet. 185,223.
- Kok J, Van Der Vossen JMBM y Venema G. (1984). Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which

- also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 48,726-731.
- Leer R. (1989) Comunicación personal.
- Luchansky JB, Muriana PM y Klaenhammer TR. (1988) Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *enterococcus*, and *Prompionibacterium*. Mol. Microbiol. 2, 637-648.
- Mandel M, e Higa A (1970) J. Mol. Biol. 53,159-162.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (1982). Molecular Cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. New York.
- Mercenier A, y Chassy M. (1988) Strategies for the development of bacterial transformation systems. Biochimie 70,503-517.
- Mirsky A. (1968) The discovery of DNA. Sci. Am. 236,78-84.
- Newmann, E and Rosenheck, K (1972). J. Membr. Biol. 1010,279-290.
- Ro SL, Woodburn M y Sandine WE. (1979). Vitamin B12 and ascorbic acid in Kimchi inoculated with *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* J. Food Sci. 44,873-876.
- Rose, AH (1982) Fermented foods. Academic Press, New York pp. 350-368.
- Rudin L, Sjostrom JE, Lindberg M y Philipson L. (1974) Factors affecting competence for transformation in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 118, 155-164.

- Ryan W y Parulekar SJ. (1991). Recombinant protein synthesis and plasmid instability in continuous cultures of *Escherichia coli* JM103 harboring a high number plasmid. *Biotechnol. Bioeng.* 37,415-429.
- Sanders ME y Nicholson MA. (1987) A method for genetic transformation of nonprotoplasted *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1730-1736.
- Sandine WE. (1987) Looking backward and forward at the practical applications of genetic researches on lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 46,205-220.
- Saunders JF, Docherty A y Humphreys GO. (1984) *Methods Microbiol.* 17,61-95.
- Scheirlinck T, Mahillon J, Joos H, Dhaese P y Michiels F. (1989) Integration and expression of alfa-amylase and endoglucanase genes in the *Lactobacillus plantarum* chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* 55,2130-2137.
- Seo J y Bailey JE. (1985) Effects of recombiant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioengin.* 27,1668-1674.
- Shahani KM, Vakil JR y Kilara A. (1976) Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophylus* and *bulgaricus* I. Cultural conditions for the production of antibiosis. *Cult. Dairy Prod. J.* 11,14-17.
- Simon D y Chopin A. (1988) Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie* 70:559-566.

126937

- Simone C, De Bianchi SB, Negri R, Ferrazzi M, Baldinelli L y Vesely R. (1986) The adjuvant effect of yogurt on production of gamma interferon by con-A-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Nutr. Rep. Int.* 33,419-433.
- Simons G, Rutten G, Hornes M y de Vos W. (1989) Production of bovine prochymosin by lactic acid bacteria. pp.183-187
- Smith CJ (1985) Polyethylene glycol-facilitate transformation of *Bacteroides fragilis* with plasmid DNA *J. Bacteriol.* 164,466-469.
- Smith HO, Daner DB y Deich RA. (1981) Genetic transformation. *Annu. Rev. Biochem.* 50,41-68.
- Smith HO y Wilcox KW. (1970) A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*, I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* 51,379-391.
- Somkuty GA y Steinberg H. (1988) Genetic transformation of *Streptococcus thermophilus* by electroporation. *Biochimie* 70,579-585.
- Soutschek-Bauer E, Harl L y Staudenbauer WL. (1985) Transformation of *Clostridium thermohydrosulfuricum* DSM 568 with plasmid DNA. *Biotech. Lett.* 7, 705-710.
- Stewart GJ y Carlson CA. (1986) The biology of natural transformation. *Annu. Rev. Microbiol.* 40,1959-1967.
- Syine WE, Muralidhara KS, Elliker PR y Engly DC (1972) Lactic acid in food y health: a review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain

- enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. *J. Milk Food Technol.* 35,691-702.
- Syine WE y Elliker PR. (1970). Microbial induced flavors in fermented foods. *Agr. Food Chem.* 18,557-562.
- Takahashi W, Yamagata R, Yamaguchi, Tsukagoshi N y Udaka S. (1983) Genetic transformation of *Bacillus brevis* 47, a protein-secreting bacterium, by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 156,1130-1134.
- Teissie J y Tsong TY (1986) Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles. *Biochemistry* 20 1548-1554.
- Van de Guchte M, Van der Vossen JMBM, Kok J y Venema G. (1989) Construction of a Lactococcal expression vector: Expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55,224-228.
- Van der Vossen JMBM, Kok J y Venema G. (1985) Construction of cloning, promoter-screening, and terminator-screening shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50,540-542.
- Venema G. (1979) Bacterial transformation. *Adv. Microb. Physiol.* 19,245-331.
- Venema G y Kok J. (1987) Improving dairy starter cultures. *Trends. in Biotechnol.* 5,144-149.
- Vogel RF, Gaier W y Hammes WP. (1990) Expression of the lipase gene from *Staphylococcus hycus* in *Lactobacillus curvatus* Lc2-c. *FEMS Microbiol. Lett.* 69,289-292.

- Watson JD y Crick FHC. (1953) Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 171,737-738.
- Weber GH y Broich WA. (1986) Self life extension of cultured dairy foods *Cult. Dairy Prod. J.* 21,19-23.
- Williams DM, Duval EJ y Lovet PS. 1981. Cloning restriction fragments that promote expression of a gen in *Bacillus subtilis* *J. Bacteriol.* 146:1162-1165.
- Yoshioka H, Iseki Ki y Fujita K. (1983) Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in brest-fed and bottle-fed infants. *Pediatric* 72,317-321.
- Zimmermann, U, Schultz J y Pilwat G (1973) *Biophys, J.* 13, 1005-1013.