

EXPRESION DE GENES QUE CONTROLAN LA ENZIMA α -ACETOLACTATO
DESCARBOXILASA EN SACCHAROMYCES

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor en
Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

ANTONIO SAID NAVARRO

05-0205769

Director de Tesis: Dr. Guido Pincheira Vega

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

ANTONIO SAID NAVARRO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de defensa de Tesis rendido el 8 de Noviembre de 1994.

Director de tesis

Dr. Guido Pincheira V.

Comisión de Evaluación de Tesis

Dra. Margarita Carú M.

Dra. Liliana Cardemil O.

Dr. Alejandro Venegas E.

Dr. Alberto Veloso M.



Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Genética,
del Dpto. de Ciencias Ecológicas de la Facultad de
Ciencias, Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr.
Guido Pincheira Vega y fue financiada parcialmente por la
Cía. Cervecerías Unidas, S.A., Santiago, Chile.

A mi esposa por su apoyo, estímulo
y colaboración
A mis hijos por su
comprensión y paciencia

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas:

Al Dr. Guido Pincheira por haber permitido la realización de esta tesis bajo su dirección, y por su constante apoyo durante la realización de ésta.

Al Dr. Sone Hidetaka por haberme facilitado material genético necesario para el logro de algunos de los objetivos planteados.

Al Dr. Antonio Jiménez por su aporte en la discusión de ciertas metodologías de trabajo.

Al Dr. Alejandro Venegas por su valioso aporte intelectual para el logro de ciertos objetivos de la tesis.

A la Dra. Liliana Cardemil por el constante apoyo recibido durante el desarrollo de esta tesis, y por las facilidades de laboratorio otorgadas.

Al Dr. Víctor Cifuentes por su permanente apoyo en el análisis y discusión de los resultados experimentales.

A la Dra. Margarita Carú por la discusión y sugerencias de ciertas metodologías de trabajo.

A las autoridades de la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación por las facilidades otorgadas para finalizar esta tesis.

Al Sr. Rafael Negrete y a la Srta. Angélica Vega por su valiosa colaboración.

INDICE DE MATERIAS

	página
INDICE -----	vi
LISTA DE TABLAS -----	xiv
LISTA DE FIGURAS -----	xvi
ABREVIATURAS -----	xix
RESUMEN -----	xxii
ABSTRACT -----	xxv
INTRODUCCION -----	1
MATERIALES Y METODOS -----	13
I.- MATERIALES -----	13
1.- Material biológico -----	13
1.1 Cepas bacterianas -----	13
1.2 Levaduras -----	13
1.3 Plásmidos -----	14
1.4 Enzimas -----	14
1.5 Acidos desoxirribonucleicos -----	14
2.- Reactivos químicos -----	15
II.- METODOS -----	17
1.- Cultivo de microorganismos -----	17

	página
1.1 Bacterias -----	17
1.2 Levaduras -----	17
2.- Mantención de las cepas -----	18
3.- Purificación del DNA -----	18
3.1 Purificación del DNA plasmidial de <u>E. coli</u> -----	18
3.2 Minipreparación de DNA plasmidial de <u>E. coli</u> -----	20
3.3 Purificación del DNA plasmidial de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> -----	21
3.4 Purificación del DNA cromosomal de <u>Lactobacillus casei</u> -----	22
4.- Electroforesis del DNA -----	24
4.1 Geles de agarosa -----	24
4.2 Visualización del DNA en geles de agarosa -----	25
4.3 Determinación de tamaños moleculares -----	25
5.- Extracción de DNA a partir de geles de agarosa -----	26
5.1 Método del N-cetil-N,N,N-trimetil amonio (CTAB) -----	26
5.2 Electroelución -----	27
5.3 Método de "glass milk" -----	28
6.- Determinación de la concentración de DNA -----	29
6.1 Densidad óptica -----	29
6.2 Método del minigel de agarosa -----	29

	página
7.- Digestión del DNA con endonucleasas de restricción -----	30
7.1 Digestión total de DNA cromosomal de <u>L. casei</u> -----	30
7.2 Digestión parcial de DNA cromosomal de <u>L. casei</u> -----	31
7.3 Digestión de DNA plasmidial -----	31
8.- Desfosforilación del DNA -----	32
8.1 Tratamiento con fosfatasa alcalina ---	32
9.- Ligamiento de DNA con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T ₄ -----	32
9.1 Ligamiento de moléculas de DNA con extremos cohesivos -----	32
9.2 Ligamiento de moléculas de DNA con extremos romos -----	33
10.- Síntesis de sonda específica de la secuencia que contiene el gen para la enzima α -acetolactato descarboxilasa -----	34
10.1 Purificación del fragmento de DNA conteniendo el gen para la α -acetolactato descarboxilasa	34
10.2 Síntesis de la sonda radioactiva específica	35
11.- Hibridación DNA : DNA -----	36
12.- Transformación genética -----	37
12.1 Transformación de <u>E. coli</u> -----	37

	página
12.1.1 Preparación de células competentes mediante tratamiento con cloruro de calcio -----	37
12.1.2 Preparación de células competentes mediante tratamiento con cloruro de rubidio -----	38
12.1.3 Transformación de células competentes de <u>E. coli</u> -----	39
12.1.4 Selección y mantención de clones transfor- mados -----	40
12.2 Transformación de <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	40
13.- Cuantificación de la actividad enzimática	41
13.1 Preparación de extracto celular -----	41
13.2 Permeabilización celular -----	42
13.3 Medición de la actividad enzimática α -acetolactato descarboxilasa -----	43
14.- Separación del genoma de levadura mediante electroforesis de campo pulsado de contorno homogéneo (CHEF)-----	44
14.1 Preparación de DNA cromosómico intacto ---	44
14.2 Electroforesis de campo pulsado -----	45
14.3 Tinción de geles -----	45

	página
RESULTADOS -----	46
1.- Prospección de la actividad α -acetolactato descarboxilasa en diversos microorganismos	46
2.- Incorporación del gen de <u>Enterobacter</u> <u>aerogenes</u> que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa en el vector de expresión pAAR6 -----	46
2.1 Análisis de restricción del plásmido pUA11	49
2.2 Linearización del plásmido pUA11 y adición de "linkers" EcoRI -----	49
2.3 Aislamiento y purificación del vector de expresión pAAR6 -----	52
2.4 Transformación genética de <u>Escherichia</u> <u>coli</u> DH5 α -----	53
2.5 Recuperación de plásmidos de clones trans- formados y ensayo de digestión con EcoRI	53
2.6 Actividad de α -acetolactato descarboxilasa en las colonias de <u>E. coli</u> transformadas	55
3.- Introducción del gen que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa en <u>Saccharomyces cerevisiae</u> -----	57
3.1 Transformación genética de <u>S. cerevisiae</u>	57
3.2 Extracción de DNA plasmidial de clones transformados de <u>S. cerevisiae</u> AB1380, y retrotransformación de <u>E. coli</u> DH5 α -----	59

	página
3.3 Extracción de DNA plasmidial de clones retrotransformados de <u>E. coli</u> DH5 α , y análisis de restricción EcoRI y EcoRV -----	62
3.4 Medición de la actividad enzimática α -acetolactato descarboxilasa en clones transformados de <u>S. cerevisiae</u> -----	66
4.- Estabilidad mitótica del gen heterólogo en cepas transformadas de <u>S. cerevisiae</u>	68
5.- Construcción de la genoteca de <u>L. casei</u>	70
5.1 Digestión parcial del DNA cromosomal de <u>L. casei</u> -----	70
5.2 Digestión enzimática del plásmido pBR322	72
5.3 Ligamiento de los fragmentos de restricción BamHI del DNA cromosomal de <u>L. casei</u> al vector pBR322 -----	72
5.4 Transformación genética de <u>Escherichia coli</u> DH5 α con DNA de <u>L. casei</u> -----	72
5.5 Purificación del DNA cromosomal de <u>L. casei</u> mediante columna de exclusión molecular	75
5.6 Digestión enzimática del DNA cromosomal de <u>L. casei</u> y purificación de fragmentos de restricción -----	77
5.7 Ligamiento y transformación de <u>E. coli</u> DH5 α	77

	página
6.- Detección mediante sonda heteróloga de secuencia complementaria de DNA cromosomal de <u>L. casei</u> para la enzima α -acetolactato descarboxilasa -----	78
6.1 Síntesis de la sonda específica del gen que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa -----	78
6.2 Hibridación DNA : DNA -----	80
7.- Características morfológicas y fisiológicas de <u>Saccharomyces uvarum</u> -----	82
8.- Análisis del genoma de <u>S. uvarum</u> mediante electroforesis de campo pulsado -----	82
 DISCUSION -----	 85
 Detección de secuencia complementaria del gen para α -acetolactato descarboxilasa en <u>L. casei</u> mediante sonda heteróloga -----	 87
Integración del gen que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa en el plásmido pAAR6	88
Expresión del gen para la α -acetolactato descarbo - xilasa en <u>E. coli</u> DH5 α y <u>S. cerevisiae</u> AB1380 ---	90
Estabilidad genética del gen de <u>E. aerogenes</u> para la α -acetolactato descarboxilasa en cepas transfor- madas de <u>S. cerevisiae</u> AB1380 -----	97

	página
Caracterización morfológica y molecular de <u>Saccharomyces uvarum</u> -----	98
CONCLUSIONES -----	100
PROYECCION -----	102
APENDICE -----	104
BIBLIOGRAFIA -----	117

LISTA DE TABLAS

	página
TABLA 1 Cuantificación de la actividad enzimática α -acetolactato descarboxilasa en cepas bacterianas y de levadura -----	47
TABLA 2 Transformación de <u>E. coli</u> DH5 α con DNA plasmidial pAAR6 (α -ALDC) -----	54
TABLA 3 Cuantificación de la actividad enzimática α -acetolactato descarboxilasa en transfor- mantes de <u>E. coli</u> DH5 α -----	58
TABLA 4 Transformación de <u>S. cerevisiae</u> AB1380 con DNA plasmidial pAAR6 (α -ALDC) -----	60
TABLA 5 Tiempos de duplicación de clones transfor- mados de <u>S. cerevisiae</u> AB1380 con DNA plasmidial pAAR6 (α -ALDC) -----	61
TABLA 6 Retrotransformación de <u>E. coli</u> DH5 α con DNA plasmidial obtenido de clones transformados de <u>S. cerevisiae</u> AB1380 -----	63

TABLA 7 Cuantificación de la actividad enzimática
de α -acetolactato descarboxilasa en clones
transformados de S. cerevisiae AB1380 ---- 67

TABLA 8 Caracterización morfológica y fisiológica de
S. uvarum ----- 83

LISTA DE FIGURAS

		página
FIGURA 1	Biosíntesis de isoleucina y valina en levadura -----	3
FIGURA 2	Integración del fragmento de DNA conteniendo el gen para la α -acetolactato descarboxilasa en el vector de expresión pAAR6 -----	48
FIGURA 3	Electroforesis de DNA del plásmido pUA11	51
FIGURA 4	A.- Electroforesis de DNA plasmidial de clones transformados de <u>E. coli</u> DH5 α B.- Electroforesis de DNA plasmidial de clones transformados de <u>E. coli</u> DH5 α digeridos con EcoRI -----	56
FIGURA 5	Electroforesis de DNA plasmidial de clones retrotransformados de <u>E. coli</u> DH5 α digeridos con EcoRI -----	64
FIGURA 6	Electroforesis de DNA plasmidial de clones retrotransformados de <u>E. coli</u> DH5 α digeridos con EcoRV -----	65

FIGURA 7	Determinación de la estabilidad mitótica promedio de clones transformados de <u>S. cerevisiae</u> AB1380 -----	69
FIGURA 8	Electroforesis de DNA cromosomal de <u>Lactobacillus casei</u> digerido con BamHI --	71
FIGURA 9	Electroforesis de reacciones de ligamiento entre DNA del plásmido pBR322 y DNA cromosomal de <u>L. casei</u> -----	73
FIGURA 10	Electroforesis de la reacción de ligamiento de DNA del plásmido pBR322 y DNA cromosomal de <u>L. casei</u> -----	74
FIGURA 11	Electroforesis de DNA del plásmido pBR322 conteniendo inserto de DNA cromosomal de <u>L. casei</u> -----	76
FIGURA 12	Electroforesis de DNA del plásmido pUC19 conteniendo insertos de DNA cromosomal de <u>L. casei</u> -----	79

FIGURA 13 A y B.- Autorradiografías de hibridación
de DNA cromosomal de *Lactobacillus casei*
con sonda heteróloga marcada con [α -³²P]
dCTP ----- 81

FIGURA 14 Electroforesis de campo pulsado (CHEF) de
DNA cromosomal de *Saccharomyces cerevisiae*
y *Saccharomyces uvarum* ----- 84

ABREVIATURAS

ADC1	gen que codifica para la alcohol deshidrogenasa I
ALDC	acetolactato descarboxilasa
ARS	secuencia de replicación autónoma
bla	marcador genético de resistencia a ampicilina (β -lactamasa)
BSA	seroalbúmina de bovino
CIAP	fosfatasa alcalina de intestino de ternero
CTAB	bromuro de cetil-trimetilamonio
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DHA	dehidratasa de dihidroácidos
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAsa	desoxirribonucleasa
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
HEPES	ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2 etanosulfónico
kb	kilobase
LB	caldo Luria

Mb	megabases
MDa	megadaltons
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MRS	caldo de Man, Rogosa y Sharpe
nm	nanómetro
PEG	polietilenglicol
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
PVP	polivinilpirrolidona
RNA	ácido ribonucleico
RNAasa	ribonucleasa
SC	medio sintético para levadura
SDS	dodecilsulfato de sodio
SOB	medio de cultivo completo con sales de magnesio
SOC	medio SOB con de D (+) Glucosa
SSC	solución salina para hibridación
TAE	tampón Tris-acetato, EDTA
TBE	tampón Tris-borato, EDTA
TE	tampón Tris, EDTA
TfB1	solución salina, glicerol
TfB2	solución salina, glicerol y MOPS
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TRP1	marcador de selección para levadura
µCi	microcurie
µg	microgramo

μ l microlitro .
YMPG medio completo con extracto de malta para
 cultivo de levadura
YEP medio completo para cultivo de levadura

RESUMEN

Durante el proceso de elaboración de cerveza, Saccharomyces uvarum libera al medio extracelular α -acetolactato. Este compuesto es convertido en diacetilo por un proceso de descarboxilación no enzimática alterando la calidad organoléptica de la cerveza elaborada.

La enzima α -acetolactato descarboxilasa cataliza la conversión de α -acetolactato en acetoína. Esta enzima se encuentra presente en diversas especies bacterianas (Enterobacter aerogenes, Bacillus brevis, Lactobacillus casei, etc.), pero no se ha detectado en el género Saccharomyces (S. cerevisiae, S. carlsbergensis, S. uvarum).

La incorporación y expresión del gen de α -acetolactato descarboxilasa en Saccharomyces cerevisiae es el paso inicial para intentar una estrategia similar en Saccharomyces uvarum, y de este modo lograr una reducción de los niveles de diacetilo en la producción de cerveza.

El objetivo de esta tesis fue transferir los determinantes genéticos de esta enzima de E. aerogenes a S. cerevisiae mediante técnicas de transformación genética.

Un fragmento de DNA de E. aerogenes de 1,4 kb conteniendo el gen para α -acetolactato descarboxilasa fué

incorporado al vector de expresión pAAR6, con el cual se transformó Escherichia coli DH5 α .

Los clones transformados de E. coli DH5 α , junto con presentar el plásmido conteniendo el inserto de 1,4 kb, expresaban la actividad α -acetolactato descarboxilasa.

Del mismo modo, los ensayos de transformación de S. cerevisiae AB1380 con este DNA plasmidial permitieron obtener clones portadores del inserto de 1,4 kb y con actividad de α -acetolactato descarboxilasa.

Los niveles de actividad enzimática encontrados en estos clones fueron superiores a la actividad que presentaban los clones de E. coli DH5 α transformados con el mismo vector.

La estabilidad mitótica del plásmido híbrido en los clones transformados de S. cerevisiae AB1380 fue levemente inferior a la estabilidad mitótica establecida para plásmidos de tipo replicativo en S. cerevisiae (1% por generación, aproximadamente).

Al intentar clonar el gen de α -acetolactato descarboxilasa a partir de una genoteca del DNA cromosomal de L. casei preparada en los plásmidos pBR322 y pUC19, se obtuvo clones transformados en E. coli DH5 α , con un tamaño promedio de inserto de 2 a 4 kb, pero ninguno de ellos presentó actividad enzimática.

Sin embargo, el resultado de hibridaciones "Southern blot" de DNA cromosomal de L. casei, digerido con las enzimas EcoRI y BamHI, con una sonda heteróloga portadora del gen de α -acetolactato descarboxilasa de E. aerogenes permitió detectar la hibridación específica de un fragmento de L. casei de 3 kb, aproximadamente.

ABSTRACT.

During the process of beer production, Saccharomyces uvarum liberates α -acetolactate to the extracellular medium. This compound is converted to diacetyl by a process of non-enzymatic decarboxylation, altering the taste of the beer.

The enzyme α -acetolactate decarboxylase catalyses the conversion of α -acetolactate to acetoin. This enzyme is found in different bacterial species (Enterobacter aerogenes, Bacillus brevis, Lactobacillus casei, etc.), but has not been found in the genus Saccharomyces (S. cerevisiae, S. carlsbergensis, S. uvarum).

The incorporation and expression of a α -acetolactate decarboxylase gene in Saccharomyces cerevisiae is a good first step towards a similar strategy with S. uvarum, in order to attempt the reduction of the diacetyl level in the production of beer.

The object of this thesis is to introduce the genetic determinants of this enzyme from E. aerogenes into S. cerevisiae through genetic transformation.

A 1.4 kb fragment of DNA from E. aerogenes including the gene for α -acetolactate decarboxylase was incorporated into the expression vector pAAR6, with which transformation of Escherichia coli DH5 α was performed.

The transformants obtained presented the plasmid containing the 1.4 kb insert and also showed α -acetolactate decarboxylase activity.

In the same way, transformation assays of S. cerevisiae AB1380 with the same plasmid DNA, gave clones carrying the 1.4 kb insert and with α -acetolactate decarboxylase activity.

The levels of enzymatic activity found in these clones were higher than those found in E. coli DH5 α transformants with the same vector.

The mitotic stability of the hybrid plasmid in S. cerevisiae AB1380 transformant was slightly lower as compared to the mitotic stability of replicative plasmids in S. cerevisiae (1%, approximately).

The attempts to clone the gene for the same enzyme from chromosomal DNA of L. casei using pBR322 and pUC19 plasmids, allowed the obtention of transformants in E. coli DH5 α with inserts of an average size of 2 to 4 kb, but with no enzymatic activity.

Nevertheless, the results of Southern blot hybridization of L. casei chromosomal DNA digested with EcoRI and BamHI, with a probe carrying the E. aerogenes gene for α -acetolactate decarboxylase allowed the detection of hybridization of a L. casei DNA fragment of 3.0 kb, approximately.

INTRODUCCION

El proceso de elaboración de cerveza se divide en dos etapas principales: la fermentación primaria (producción de cerveza inmadura o verde), y la fermentación secundaria (producción de cerveza madura o elaborada) (Godtfredsen, S. et al. 1982).

La fermentación primaria se caracteriza por la liberación al medio de fermentación de diversos compuestos químicos productos del metabolismo secundario de la levadura. Uno de estos compuestos es el α -acetolactato el cual genera diacetilo alterando la calidad de la cerveza. Durante la fermentación secundaria, una fracción del diacetilo es transformado en acetoína por la levadura (Godtfredsen, S. et al. 1982).

1.- Importancia del α -acetolactato como producto intermediario.

El α -acetolactato es un compuesto intermediario que se produce durante la biosíntesis de los aminoácidos isoleucina y valina, tanto en microorganismos como en tejidos de mamíferos (Chuang, L. et al. 1968; Jones, E. et al. 1982).

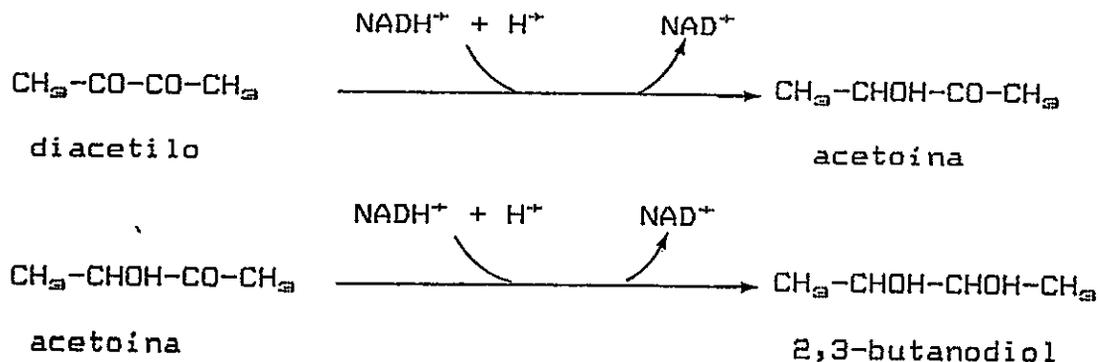
En levaduras, el α -acetolactato es producido a partir del ácido pirúvico, mediante la enzima ácido acetohidroxil-

sintetasa (AHAS) a nivel mitocondrial (Ryan, E. et al. 1974) (Figura 1).

En Saccharomyces, especialmente en aquellas especies que participan en el proceso de producción de cerveza, como lo es S. uvarum, la síntesis de α -acetolactato durante el proceso de fermentación primaria excede la demanda para la síntesis de los aminoácidos indicados (Wettstein, D. et al. 1984). Esto determina la acumulación intracelular de α -acetolactato y su liberación al medio extracelular.

Mediante un proceso de descarboxilación oxidativa de tipo no-enzimática el α -acetolactato es convertido en diacetilo (Chuang, L. et al. 1968), el cual altera la calidad organoléptica de la cerveza madura al proporcionar a ésta un sabor a mantequilla rancia.

Posteriormente, durante el proceso de fermentación secundaria o maduración de la cerveza, parte del diacetilo es incorporado intracelularmente por la levadura y convertido en acetoina y ésta en 2,3 butanodiol mediante la enzima diacetilo-reductasa (Holmberg, S. 1984).



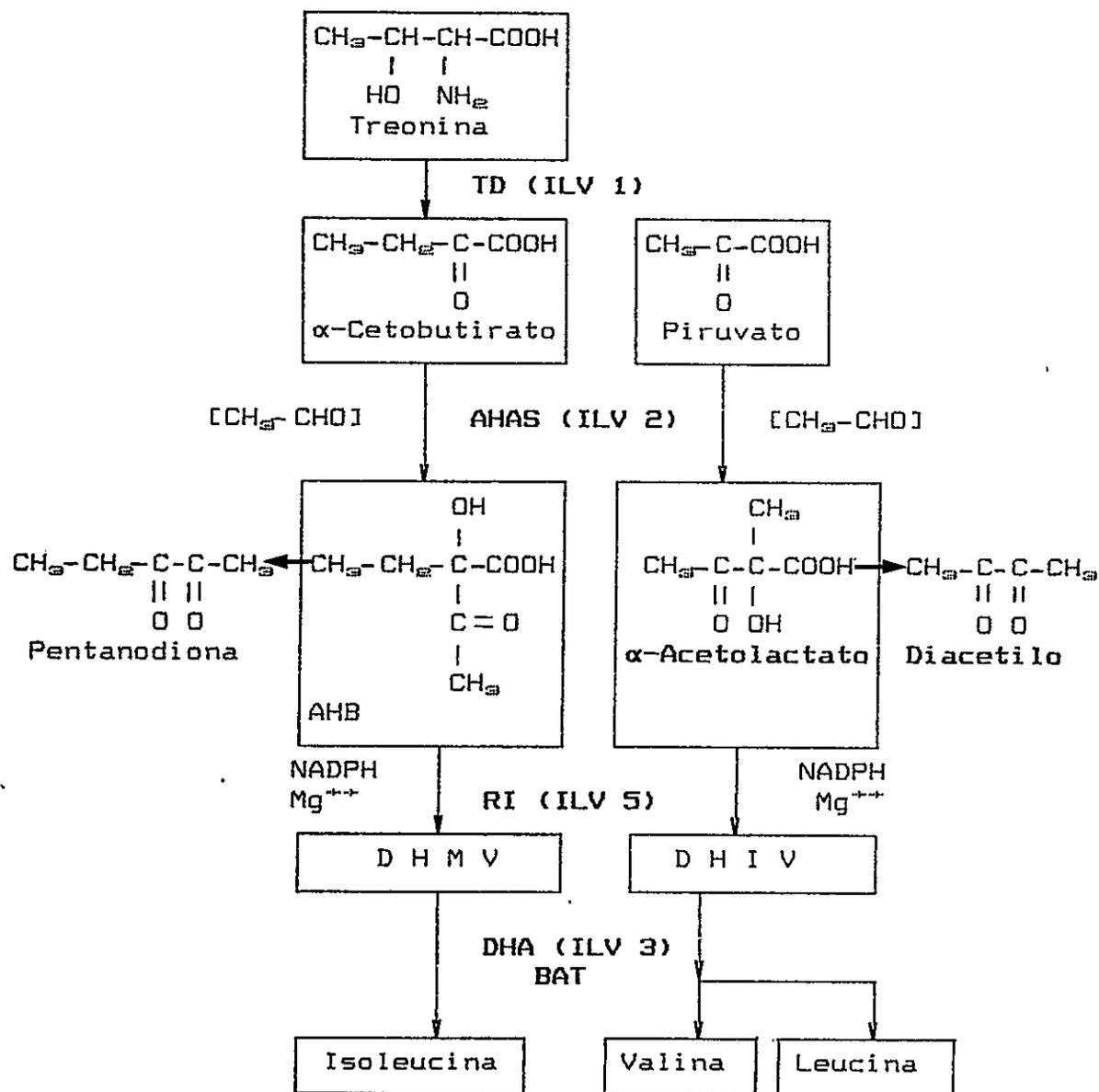


Figura 1. BIOSINTESIS DE ISOLEUCINA Y VALINA EN LEVADURA

- Enzimas :TD : treonina deaminasa
 AHAS: ácido acetohidroxi-sintetasa
 RI : ácido acetohidroxi-reductoisomerasa
 DHA : deshidratasa de dihidroxiácidos
 BAT : aminotransferasa
- Intermediarios: AHB : ácido hidroxibutirato
 DHMV: ácido α,β-dihidroxi-β-metilvaleriánico
 DHIV: ácido α,β-dihidroxi-β-isovaleriánico

La velocidad de este proceso enzimático es diez veces superior al proceso de descarboxilación no-enzimático, constituyéndose este último en la etapa limitante para disminuir los niveles de α -acetolactato en el medio extracelular.

Considerando la importancia industrial que tiene el poder reducir los niveles de diacetilo en el proceso de producción de cerveza, se han realizado esfuerzos experimentales para reducir los niveles de este compuesto durante el proceso de fermentación secundaria. Para ello se han manejado diversas variables, como por ej; prolongar el tiempo de maduración de la cerveza con el consiguiente mayor costo, disminuir la temperatura durante la fermentación secundaria, utilizar diversas cepas de levadura cervecera (Linsken, H. F. et al. 1988), etc.

Otro enfoque a este problema ha sido el mejoramiento de las cepas de levadura cervecera mediante técnicas genéticas. Debido a que estas levaduras se caracterizan por su homotalismo, aberración en el comportamiento sexual, variación en el número de cromosomas, reducida (a veces nula) tasa de esporulación, y baja viabilidad de las esporas, no se han obtenido los resultados esperados (Spencer, I. F. T. 1983).

Esta metodología ha permitido lograr significativos avances en la caracterización genética de S. cerevisiae.

Así, por ejemplo, ha sido posible obtener mutantes auxótrofos para isoleucina y/o valina (Spencer, I. 1983), los cuales presentan alteraciones que afectan su capacidad de división, o una producción elevada de ciertos alcoholes (Spencer, J. et al. 1990; Linsken, H. 1988).

Se han obtenido mutantes del gen ilv-2, que presentan un bajo nivel de la enzima ácido acetohidroxi-sintetasa (AHAS), y cepas mutantes para los genes ilv-1 e ilv-2, que presentan alterados los niveles de las enzimas treonina desaminasa (TD) y acetohidroxi-sintetasa (AHAS), respectivamente. Sin embargo, estas mutaciones resultan en pérdida concomitante de la capacidad fermentativa de la levadura (Wettstein, D. et al. 1984).

En S. cerevisiae se han seleccionado mutantes espontáneos, alelos dominantes del gen ilv-2 (Falco, S. 1985), que determinan resistencia al herbicida metil sulfometuron, y una disminución de hasta un 50 % de la producción de diacetilo, respecto a la cepa parental (Johnston, J. 1990).

Otra estrategia para disminuir los niveles de diacetilo ha sido aumentar el flujo anabólico de los diversos intermediarios de la vía de biosíntesis de isoleucina y valina. Esta aproximación experimental impediría la acumulación y liberación de α -acetolactato al medio extracelular, y por consiguiente la formación de diacetilo

por descarboxilación espontánea. Para ello se ha clonado el gen ilv-5, de S. cerevisiae que codifica para la enzima reducto-isomerasa, y se transformó una cepa haploide de Saccharomyces cerevisiae ilv-5; ura-3. Los transformantes obtenidos presentaban un aumento de 5 a 10 veces en la actividad enzimática, y una disminución entre el 50 % a un 60 % en los niveles de diacetilo (Dillemans, M. et al. 1987).

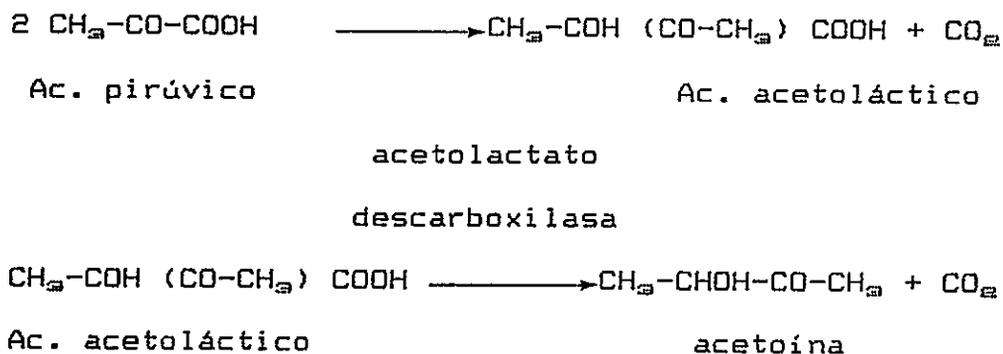
De manera similar se procedió con el gen ilv-3, de S. cerevisiae que codifica para la enzima deshidratasa de dihidroxiácidos (DHA). Los transformantes obtenidos en cepas haploides muestran un aumento de la actividad enzimática, específica de 5 a 6 veces, pero no se obtuvo una disminución significativa de los niveles de diacetilo en el medio de fermentación (Johnston, J. 1990).

Otro enfoque experimental ha sido optimizar la actividad catalítica de la enzima diacetilo-reductasa de levadura. Hasta el momento no se ha logrado una disminución significativa del nivel de diacetilo en el medio de fermentación mediante su conversión en acetoína (Linsken, H. 1988).

También se ha intentado modificar las condiciones de fermentación que permitan una mejor incorporación del diacetilo por parte de la levadura, no lográndose avances importantes al respecto (Johnston, J. 1990).

Con respecto a otros organismos, estudios realizados con extracto de Staphylococcus aureus demostraron la conversión de α -acetolactato, obtenido por síntesis química, en acetoína (Krampitz, L. 1948).

Posteriormente, se ha podido demostrar que un extracto enzimático preparado a partir de Aerobacter aerogenes es capaz de producir acetoína a partir de ácido pirúvico. Este extracto enzimático fue resuelto en dos componentes, uno de los cuales convertía el ácido pirúvico en ácido α -acetoláctico, y el segundo componente produce acetoína por descarboxilación de dicho ácido (Juni, E. 1952).



A partir de Aerobacter aerogenes, se purificó la enzima que cataliza la conversión de ácido pirúvico en ácido acetoláctico, y se demostró que la conversión del ácido acetoláctico en acetoína es catalizada por la enzima α -acetolactato descarboxilasa (2-aceto-lactato carboxi-liasa EC 4.1.1.5) (Stormer, F. 1967).

Este mecanismo de producción de acetoina a partir de ácido acetoláctico se encontró en diversas otras especies bacterianas, tales como, Streptococcus diacetylactis, Leuconostoc citrovorum, Bacillus subtilis, Clostridium acetobutyricum (Gunsalus, I. 1961.; Speckman, R. et al. 1968).

2.- Presencia de actividad de α -acetolactato descarboxilasa.

La actividad α -acetolactato descarboxilasa ha sido detectada en numerosas cepas bacterianas y de hongos con variados niveles de expresión. En bacterias, la actividad α -acetolactato descarboxilasa ha sido especialmente notoria en los géneros Bacillus y Lactobacillus (Godtfredsen, S. et al. 1983).

Escherichia coli y Saccharomyces cerevisiae no presentan actividad de α -acetolactato descarboxilasa (Chuang, L. 1968; Godtfredsen, S. et al. 1983).

A partir de un cultivo de Enterobacter aerogenes se obtuvo un extracto celular con actividad α -acetolactato descarboxilasa, y se demostró la conversión in vitro de α -acetolactato en acetoina (Loken, J. P. et al. 1970). Posteriormente, una preparación de la enzima de E. aerogenes, parcialmente purificada, fue adicionada a cerveza obtenida mediante fermentación primaria. Al cabo de 24 hr, los niveles de diacetilo se redujeron significativamente

(Godtfredsen, S. et al. 1982).

En extracto libre de células de Lactobacillus casei se demostró la presencia de una actividad enzimática en la fracción soluble que convierte el α -acetolactato en acetoína (Branen, A. 1971).

Un estudio posterior de detección de la actividad α -acetolactato descarboxilasa practicado a un total de 266 cepas de bacterias productoras de ácido láctico, demostró la presencia de la enzima en 233 cepas (Godtfredsen, S. et al. 1984). La totalidad de las cepas de L. casei (86 cepas) presentaban actividad de α -acetolactato descarboxilasa.

3.- Clonamiento del gen que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa.

A partir de una genoteca de Enterobacter aerogenes se clonó el gen que codifica por la enzima α -acetolactato descarboxilasa, y se obtuvo su expresión en E. coli modulado por su propio promotor (Sone, H. et al. 1987).

De manera similar se clonó el gen que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa de Streptococcus lactis subsp. diacetylactis. Se demostró la expresión de dicho gen en E. coli, controlado por su propio promotor (Goelling, D. et al. 1988).

En Bacillus brevis se clonó el gen ald-B que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa. Se encontró

que es una exoenzima, la cual puede ser excretada al medio extracelular por medio de un péptido señal de 24 o 27 aminoácidos, situado en el extremo 5' de la secuencia codogénica estructural de la enzima. Experimentos de clonación molecular mostraron que esta enzima se puede expresar en Escherichia coli a partir de su propio promotor, en cambio, su expresión en Bacillus subtilis se obtuvo solamente cuando se clonó el gen bajo el promotor del gen amy-M, el cual codifica por la enzima α -amilasa maltogénica de Bacillus stearothermophilus (Diderichsen, B. et al. 1990).

El gen que codifica para la α -acetolactato descarboxilasa de Enterobacter aerogenes tiene un tamaño muy semejante al de Bacillus brevis (260 residuos aminoacídicos del gen ald-B de Bacillus brevis, respecto a 258 aminoácidos del gen de Enterobacter aerogenes). Asimismo, el análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de las respectivas proteínas, muestran un 33 % de identidad (Diderichsen, B. et al. 1990).

Hasta ahora, el gen que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa ha sido caracterizado en un reducido número de microorganismos (Goelling, D. et al. 1988; Sone, H. et al. 1988; Diderichsen, B. et al. 1990; Blomqvist, K. et al. 1993; Renna, M. C. et al. 1993), existiendo escasa información acerca de genes o secuencias

reguladoras que intervienen en los mecanismos de la expresión génica (Blomqvist, K. et al. 1993; Renna, M. C. et al. 1993).

La información disponible sobre este problema en S. uvarum es muy escasa, no obstante la importancia de este organismo en la producción cervecera. Probablemente, ello se deba en parte a las dificultades que implica el estudio genético de una especie poliploide (Linsken, H. 1988), o bien a la reserva en publicar datos de interés industrial. No obstante, ya se han intentado experimentos de transformación genética en S. uvarum (Chang, S. P. et al. 1990).

PROPOSITO DE LA TESIS.

Si la enzima α -acetolactato descarboxilasa proveniente de Enterobacter aerogenes cataliza la conversión del α -acetolactato en acetoína, es posible, mediante clonación molecular del gen de esta enzima insertado en un vector de expresión para Saccharomyces cerevisiae, lograr que dicho potencial genético se exprese en este organismo. Esta actividad puede determinar una disminución de los niveles de α -acetolactato en el medio de incubación. Si ello es exitoso, sería posible proyectar una estrategia experimental que permita la clonación de los genes homólogos de Lactobacillus casei, su introducción y expresión en S. cerevisiae, y eventualmente en Saccharomyces uvarum.

Los objetivos planteados en esta tesis son:

- 1.- Clonar los determinantes genéticos para la α -acetolactato descarboxilasa de E. aerogenes en vector de expresión en levadura.
- 2.- Transformación genética de Saccharomyces cerevisiae con el vector híbrido indicado, y evaluación de la actividad de dicha enzima en los transformantes.
- 3.- Análisis de la estabilidad mitótica de los transformantes obtenidos.

MATERIALES Y METODOS.

I.- MATERIALES.

1. Material biológico.

1.1 Cepas bacterianas:

Escherichia coli HB101 (F⁻, hsdS20 (r_B⁻, m_B⁻), recA13, ara14, proA2, lacY1, galK2, rspL20 (Sm^r), xyl5, mt11, supE44, λ⁻) (Boyer, H. et al., 1969), proporcionada por el Dr. Antonio Jiménez (C.B.M., Madrid, España).

Escherichia coli DH5α (supE44, ΔlacU169 (Ø80, lacZ ΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1) (Sambrook, J. et al. (1989), fue proporcionada por el Sr. Antonio Castillo (Lab. de Microbiología, Universidad de Santiago de Chile).

Lactobacillus casei ATCC 393 (Branen, A. et al., 1972), proveniente de la ATCC Washington D.C. U.S.A.

1.2 Levaduras:

Saccharomyces cerevisiae cepa AB1380 (MATa, ψ⁺, ura3, trp1, ade2-1, can1-100, lys2-1, his5) (Burke, D. et al., 1987), fue proporcionada por el Dr. Antonio Jiménez (C.B.M., Madrid, España).

S. uvarum biotipo Hebru, fue proporcionada por la Cia. Cervecerías Unidas, S.A. Santiago, Chile.

1.3 Plásmidos.

El plásmido pUA11 es un plásmido híbrido que contiene un fragmento de 1,4 kb con el gen para la α -acetolactato descarboxilasa de Enterobacter aerogenes clonado en el plásmido pUC12. Fue proporcionado por el Dr. Sone Hidetaka (Kirin Brewery Co. Ltd., Takasaki, Japón).

Los plásmidos pBR322 (Bolívar, F. et al., 1977), pUC19 (Yanisch-Perron, C. et al. 1985), y el plásmido de expresión dual ("shuttle" plasmids) pAAR6 (Ammerer, G. 1983), fueron proporcionados por el Dr. Antonio Jiménez (C.B.M., Madrid, España).

1.4 Enzimas:

Las endonucleasas de restricción EcoRV, BamHI, HincII, y las enzimas DNA ligasa del bacteriófago T4, DNA polimerasa I de E. coli, fosfatasa alcalina de ternera (CIAP), fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de E. coli se obtuvieron de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, Maryland USA. Las endonucleasas de restricción EcoRI, PstI, HindIII se obtuvieron de Bio. Labs. Inc. USA. Las enzimas lisozima, ribonucleasa A libre de DNasa y proteinasa K se obtuvieron de Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA.

1.5 Acidos desoxirribonucleicos.

DNA del bacteriófago lambda (λ) digerido con la enzima de restricción HindIII se obtuvo de Bethesda Research Laboratories Inc., Maryland USA. El DNA de esperma de salmón

se obtuvo de Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA.

2.- Reactivos químicos.

- Merck A.G., Darmstadt, Alemania: glucosa, sacarosa, acetato de sodio, acetato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de rubidio, fosfato monoácido de potasio, fosfato diácido de potasio, etanol absoluto, alcohol isoamílico, alcohol butílico (n-butanol), cloroformo, tolueno, ácido bórico, ácido cítrico, formamida, glicerol, glicina, acetato de amonio, hidróxido de sodio, α -naftol, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, borato de sodio, sulfato de fierro II, sulfato de cobalto heptahidratado, sulfato de cobre, sulfato de manganeso y sulfato de zinc.

- Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA: creatina, agarosa (tipo V), ampicilina, tetraciclina, tris, albúmina sérica de bovino (fracción V), etilendiaminotetraacetato, bromuro de etidio, dodecil sulfato de sodio, ficoll, β -hidroxiquinolina, lisina monoclóhidrato, histidina, triptófano, uracilo, adenina, polietilén glicol 4000, fenilmetilsulfonil fluoruro, esferas de vidrio de 0,45-0,5 mm de diámetro, y agarosa de bajo punto de fusión.

- Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA: agar-agar, triptona, peptona, extracto de levadura, base de nitrógeno para levaduras.

- Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, Maryland, USA: sistema de marcación de DNA por extensión de partidor ("random primers").

- ICN Biomedicals, California, USA: [α - 32 P] dCTP
- Millipore Filter Corporation: membrana de nylon
- Whatmann Ltd., Inglaterra: papel 3 MM

II.- METODOS.

1.- Cultivo de microorganismos.

1.1 Bacterias.

Escherichia coli HB101 y DH5 α fue crecida en caldo LB (Apéndice 1). Para cultivo en medio sólido se adicionó agar-agar al 1,5% (p/v). Los cultivos se incubaron a 37°C durante 14 a 18 horas. Los cultivos en medio líquido se desarrollaron en agitación (200 a 300 ciclos por minuto en agitador orbital).

Lactobacillus casei ATCC 393 fue crecida en caldo MRS (Apéndice 1) o caldo Elliker (Apéndice 1) bajo atmósfera de CO₂. Para cultivo en medio sólido se adicionó agar-agar al 1,5% (p/v). Se incubó a 37°C durante 16 horas.

1.2 Levaduras:

Saccharomyces cerevisiae AB1380 fue crecida en medio YEP (Apéndice 1). Para cultivo sólido se agregó agar-agar al 2% (p/v). Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación constante (400 ciclos por minuto en agitador orbital).

Saccharomyces uvarum fue crecida en caldo natural (caldo mosto) y en caldo artificial (caldo YMPG) (Apéndice 1). Los cultivos se incubaron entre 28°C a 30°C con agitación constante (400 ciclos por minuto en agitador orbital).

2.- Mantenición de las cepas.

2.1 Las cepas de E. coli y de L. casei crecidas hasta alcanzar la fase estacionaria, fueron mezcladas con glicerol al 80% (v/v) y se guardó a -20°C.

Asimismo, las cepas se mantuvieron en medio sólido en placa y en tubo con agar inclinado a 4°C. Estas cepas se sembraron en medio fresco cada 15 a 30 días.

2.2 La cepa de S. cerevisiae fue crecida en medio YEP (Apéndice 1) hasta alcanzar la fase estacionaria, y se mantuvo en condiciones similares a las cepas bacterianas.

2.3 La cepa de S. uvarum fue crecida en medio YMPG (Apéndice 1) hasta alcanzar la fase estacionaria, y se mantuvo en condiciones similares a las cepas de bacterias.

3.- Purificación del DNA.

3.1 Purificación del DNA plasmidial de Escherichia coli. Se realizó una preparación de DNA plasmidial en gran escala mediante la metodología descrita por Wang, C. J. (1987), y modificada de la siguiente manera. Se inoculó un matraz conteniendo 500 ml de caldo LB (Apéndice 1) adicionado de ampicilina (100 µg/ml). Se incubó a 37°C con agitación hasta el inicio de la fase logarítmica ($1-2 \times 10^8$ células/ml). Se adicionó 2,5 ml de solución de cloramfenicol (170 µg/ml) y se incubó durante 14 hrs. a 37°C con agitación. Se centrifugó a 8000 rpm ($7.710 \times g$) durante 10 min a 4°C en centrífuga Sorvall RC-5B con rotor GSA. Las células se

resuspendieron en 100 ml de solución Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0 y NaCl 150 mM en hielo. Se centrifugó a 6000 rpm (5.860 x g) durante 10 min a 4°C en centrífuga Sorvall RC-5B con rotor GSA. El precipitado se resuspendió en 6 ml de solución de sacarosa al 25% (p/v) pre-enfriada y se incubó durante 20 min en hielo. Se adicionó 1,5 ml de solución de lisozima (25 mg/ml en Tris-HCl 0,25 M pH 8,0) pre-enfriada y 3 ml de solución de EDTA 0,25 M. Se incubó en hielo durante 15 minutos. Se agregó 9 ml de una solución fría de Tritón al 2% (v/v) en Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 60 mM pH 8,0. Se mezcló suavemente con varilla de vidrio manteniendo el tubo en hielo hasta lisis total (15 a 30 min). Se centrifugó a 18000 rpm (39.100 x g) durante 60 min a 4°C en una centrífuga Beckman J2-21 utilizando un rotor SS-34. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó RNAsa A a una concentración final de 30 µg/ml. Se incubó a 37°C durante 20 minutos. Se desproteinizó con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Apéndice 2). Se centrifugó a 5000 rpm (3.020 x g) durante 5 min en centrífuga Sorvall RC-5B con rotor SS-34. Se recuperó la fase acuosa superior y se volvió a desproteinizarse con igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Después de centrifugar se precipitó el DNA de la fase acuosa con 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol frío (-20°C). La mezcla se incubó a -20°C durante 60 min y

se centrifugó a 12000 rpm (17.300 x g) durante 40 min a 4°C en centrífuga Sorvall RC-5B con rotor SS-34. Se lavó el precipitado de DNA con etanol 70% (v/v), y se resuspendió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM) a una concentración aproximada de 100µg/ml.

3.2 Minipreparación de DNA plasmidial de E. coli. El análisis de plásmidos de clones transformados de E. coli DH5α se hizo utilizando la metodología descrita por Birnboim, H. et al. (1979) modificada de la siguiente manera. Se inoculó la cepa bacteriana en 10 ml de caldo LB (Apéndice 1) adicionado de ampicilina (50 a 100 µg/ml). Se incubó a 37°C durante 14 a 16 hr con agitación (300 ciclos /min en agitador orbital). Se centrifugó a 10000 rpm (12.100 x g) durante 10 min a 4°C en centrífuga Sorvall RC-5B con rotor SS-34. Se resuspendió el precipitado bacteriano con 200 µl de solución de glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10mM, lisozima 4 mg/ml y se transfirió a tubo Eppendorf. Se incubó 10 min a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 400 µl de solución de NaOH 0,2 N, SDS 1% (p/v) recién preparada. Se mezcló invirtiendo el tubo 5 a 6 veces y se incubó en hielo durante 10 minutos. Se agregó 300 µl de solución fría de acetato de potasio 5 M. Se mezcló suavemente el contenido del Eppendorf manteniendo éste en posición invertida sobre el vórtex a baja velocidad durante 10 segundos. Se dejó en hielo durante 5 a 10 minutos. Se

centrifugó a máxima velocidad durante 5 min a 4°C en centrífuga Eppendorf 5414. Se recuperó el sobrenadante en otro tubo Eppendorf estéril y se desproteinizó 2 veces con la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (Apéndice 2) y luego con la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico. Se precipitó el DNA plasmidial de la fase acuosa con 2,5 volúmenes de etanol frío (-20°C) y se incubó a -20°C por un mínimo de 4 horas. Se centrifugó y eliminó el sobrenadante. Se lavó el DNA con 1 ml de etanol absoluto al 70% (v/v). Se centrifugó durante 5 min, se eliminó el sobrenadante, y se dejó secar el precipitado invirtiendo el tubo sobre papel filtro durante 5 minutos. Se resuspendió el DNA con 100 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM, RNasa A a concentración final de 30 µg/ml). Se incubó a 37°C durante 15 minutos.

3.3 Purificación del DNA plasmidial de Saccharomyces cerevisiae: Se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Strathern, J. N. et al. (1991) modificada de la siguiente manera. Se inoculó la cepa en medio SC (Apéndice 1) suplementado con 40 µg/ml de cada uno de los siguientes aminoácidos: adenina, lisina, histidina y uracilo. Se incubó a 30°C durante 16 hr con agitación constante (400 ciclos por min en agitador orbital). Se centrifugó a 3000 rpm (1.085 x g) durante 5 min a 4°C en centrífuga Sorvall RC-5B en rotor SS-34. El sedimento celular se resuspendió en 200 µl de una

solución estéril de NaCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, SDS 0,1% (p/v). La suspensión celular se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se agregó 0,8 g de esferas de vidrio (0,45-0,5 mm de diámetro, previamente tratadas con HCl 1 M a 70°C con agitación constante y lavadas con agua destilada estéril). La mezcla se agitó en vórtex a máxima velocidad durante 1 minuto. Se determinó el porcentaje de lisis celular mediante microscopía óptica. Se agregaron 200 µl de fenol saturado en Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM. Se agitó en vórtex durante 1 minuto. Se centrifugó durante 2 min en centrífuga Eppendorf modelo 5414. Se recuperó la fase acuosa en tubo Eppendorf estéril y se extrajo por segunda vez con fenol saturado. Se centrifugó durante 2 min y se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo Eppendorf estéril. Se precipitó el DNA plasmidial con 0,1 volúmen de acetato de sodio 3 M pH 7,0 y 2,5 volúmenes de etanol frío (-20°C). Se incubó a -20°C durante 12 hrs. Se centrifugó y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol frío (-20°C). Se resuspendió el DNA plasmidial con 50 µl de tampón TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM).

3.4 Purificación del DNA cromosomal de Lactobacillus casei.

Se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Marmur, J. (1961) y Gross-Bellard, M. (1973) modificada de la siguiente manera. Se inoculó un matraz conteniendo 50 ml de medio mínimo salino (Apéndice 1) y se incubó a 37°C bajo

atmósfera de CO₂ equivalente a 100 p.s.i. (7 Kg/cm²) durante 12 horas. A partir de este cultivo se inoculó 250 ml de medio mínimo salino con 5 ml del cultivo original. Se incubó a 37°C bajo atmósfera de CO₂ de 100 p.s.i. durante 20 horas. Se centrifugó a 8000 rpm (10.400 x g) durante 10 min a 4°C en centrífuga Sorvall RC-5B con rotor 6SA. Se lavó dos veces el sedimento bacteriano con tampón SSC (Apéndice 3), centrifugando cada vez a 5000 rpm (3.020 x g) durante 10 min a 4°C. Se resuspendió el sedimento celular con 10 ml de tampón ES (Apéndice 3) frío. Se adicionó lisozima a concentración final de 80 µg/ml. Se incubó a 37°C durante 60 min con agitación mecánica ocasional. Luego, se adicionó 1,38 ml de SDS al 10% (p/v) y se incubó a 60°C durante 60 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se desproteinizó dos veces con mezcla cloroformo:alcohol isoamílico. Enseguida, se centrifugó a 5000 rpm (3.020 x g) durante 5 minutos y se precipitó el DNA cromosomal con 2 volúmenes de etanol frío (-20°C). Se incubó a -20°C durante 12 horas. Se centrifugó a 8000 rpm (7.710 x g) durante 10 min a 4°C. Se lavó el precipitado con etanol frío (-20°C) al 70% (v/v). Se centrifugó y se resuspendió el DNA con 3 ml de tampón TE (Apéndice 3) con RNAsa a concentración final de 30 µg/ml. Se incubó a 37°C durante 60 min y se desproteinizó con mezcla cloroformo:alcohol isoamílico. Se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol frío (-20°C) y se incubó

durante 12 horas a -20°C . Se centrifugó a 8000 rpm ($7.710 \times g$) durante 10 min a 4°C y se resuspendió el DNA con 3 ml de agua destilada estéril. Se dializó contra tampón TE (Apéndice 3) durante 24 horas a 4°C . Se cuantificó el grado de pureza DNA (Métodos, sección 4.1) y se analizó el estado del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa (Métodos, sección 4.2).

4.- Electroforesis del DNA.

4.1 Geles de agarosa. Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Johnson et al. (1977) modificada por Sambrook, J. et al. (1989). La agarosa se disolvió en tampón TBE (Apéndice 3) por calentamiento hasta total disolución. Se dejó enfriar hasta unos $60-65^{\circ}\text{C}$ y se agregó una solución de bromuro de etidio (Apéndice 2) a concentración final de $0,5 \mu\text{g/ml}$. La solución preparada se vertió en una placa de vidrio sellada en su contorno con cinta adhesiva, y provista de una peineta con espaciadores de $0,5 \text{ mm}$. Se dejó gelificar a temperatura ambiente. El gel se sumergió en una cámara de electroforesis horizontal la cual contenía tampón TBE (Apéndice 3) con bromuro de etidio a concentración final de $0,5 \mu\text{g/ml}$. La muestra de DNA a analizar se mezcló en proporción 5:1 (v/v) con tampón de carga 6x (Apéndice 3), y la mezcla se cargó en el gel. La electroforesis se corrió a voltaje constante de 60 volts a temperatura ambiente.

Asimismo, se realizó electroforesis sin la adición de

bromuro de etidio tanto a la solución de agarosa como al tampón de corrida TBE. En este caso se sumergió el gel de agarosa en solución de bromuro de etidio preparada en agua destilada a concentración final de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ por 30 minutos. El exceso de colorante fue retirado colocando el gel en una solución de MgSO_4 1 mM por 30 minutos.

4.2 Visualización del DNA en geles de agarosa. Se observó bajo lámpara de luz UV (iluminador frontal UVIS para UV 254/366 nm), y en transiluminador Mineralight modelo TM-36 a una longitud de onda de 302 nm. Los geles fueron fotografiados en una cámara Polaroid tipo 55 o en cámara Polaroid tipo 66 con filtro amarillo de gelatina. La película se expuso durante 30 segundos.

4.3 Determinación de tamaños moleculares. El tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos por digestión con las enzimas de restricción, se determinó construyendo una curva de calibración empleando el DNA del fago lambda (λ) digerido con HindIII (Apéndice 4) (Williams, B. et al., 1980). Se graficó en papel semilogarítmico colocando en la abscisa el tamaño molecular de los fragmentos de DNA del fago lambda y en la ordenada su movilidad electroforética relativa. A partir de la curva se extrapolaron las migraciones electroforéticas y se determinó el tamaño molecular para cada fragmento de DNA.

5.- Extracción de DNA a partir de geles de agarosa.

5.1 Método del N-cetil-N,N,N-trimetil amonio (CTAB). Se utilizó la técnica descrita por Langridge, J. et al. (1980), modificada por Cifuentes V. (1988) usando como agente de extracción el compuesto bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetil amonio (CTAB). Se separaron los fragmentos de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (p/v) en tampón TAE (Apéndice 3) sin bromuro de etidio. La condición de corrida fue de 25 volts a 4°C. Se cortó el segmento de gel que contenía la banda de interés teniendo como referencia la sección del gel donde se cargó parte de la muestra, la cual fue teñida con bromuro de etidio. Se colocó el trozo de gel en tubo Eppendorf estéril. Se fundió la agarosa en baño de agua mantenido entre 65 a 70°C durante 20 a 30 min, con agitación ocasional en vórtex. Se colocó en un baño mantenido a 37°C. Se agregó un volumen de la solución agua-CTAB (Apéndice 2) precalentada a 37°C, un volumen de la solución butanol-CTAB (Apéndice 2) precalentada a 37°C, y se agitó en vórtex durante 30-60 segundos. Se centrifugó y se recuperó la fase superior (butanol) en tubo Eppendorf estéril. Se realizó una nueva extracción del DNA de la fase acuosa con 1/2 volumen de solución butanol-CTAB precalentado a 37°C. Después de la agitación en vórtex y centrifugación por 1 min, se unieron ambas fases de butanol. Se agregó 1/4 volumen de acetato de

sodio 0,3 M, se agitó en vórtex durante 30-60 seg, y se centrifugó durante 1 minuto. Se recuperó la fase inferior (acuosa) en tubo Eppendorf estéril. Seguidamente, se agregó un volumen de cloroformo, se agitó en vórtex y se dejó en hielo durante 10 minutos. Se centrifugó y se precipitó el DNA de la fase superior agregando un 3% (v/v) de acetato de sodio 3M, y 3 volúmenes de etanol frío (-20°C). Se incubó a -20°C durante 16 horas. Se centrifugó durante 15 min a 4°C. Se resuspendió el DNA con 10-20 µl de agua destilada estéril. Se analizó una muestra en gel de agarosa (Métodos, sección 4.1).

5.2 Electroelución. Este método se empleó para recuperar fragmentos de DNA de tamaño superior a los 5 kb. Se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Sambrook, J. et al. (1989) modificada de la siguiente manera. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Métodos, sección 4.1) del DNA digerido con la enzima de restricción. Se selló una bolsa de diálisis activada (Apéndice 2) en un extremo y se llenó con tampón de baja conductividad [Tris-HCl 5 mM, ácido acético 2,5 mM (pH 8,0)]. Se cortó el segmento del gel que contenía las bandas de DNA de interés, y se deslizó al interior de la bolsa de diálisis. Se eliminó el exceso de líquido sin dejar burbujas, y se selló el otro extremo de la bolsa. Se colocó la bolsa de diálisis en la cámara de electroforesis con tampón TAE (Apéndice 3), en sentido

perpendicular al campo eléctrico. Se realizó una electroforesis a 100 volts durante 3 horas. Luego, se invirtieron los polos y se aplicó una corriente de 80 volts por 5 minutos para remover el DNA que quedó adherido al interior de las paredes de la bolsa de diálisis. Se extrajo el tampón del interior de la bolsa y se concentró el DNA por precipitación con 0,1 volúmen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol frío (-20°C). Después de una incubación a -20°C durante 12 horas, se recuperó el DNA por centrifugación. Se resuspendió el DNA con agua desionizada y destilada, estéril.

5.3 Método de "glass milk". Se empleó para recuperar fragmentos de DNA entre 1 y 15 kb. Se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el Kit gene clean II (Bio 101 Inc., La Jolla). Los fragmentos de DNA digerido con enzima de restricción fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa (Métodos, sección 4.1). Se extrajo el segmento del gel que contenía la banda de DNA, se pesó y se colocó en tubo Eppendorf estéril. Se adicionó 3 volúmenes equivalentes de solución de NaI (Apéndice 2), y se incubó en baño con agua a 50°C hasta total solubilización del gel. Se agregó 5 µl de solución glass milk, se homogenizó mecánicamente, y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó y se lavó lavó 3 veces consecutivas el precipitado con 0,5 ml de solución de lavado (Apéndice 2). Se centrifugó la mezcla

durante 5 seg para el primer y segundo lavado, y por 15 seg al término del tercer lavado. Se resuspendió suavemente el precipitado con 10 μ l de agua destilada estéril y se incubó a 50°C por 5 minutos. Se centrifugó durante 15 seg y se recuperó el sobrenadante en tubo Eppendorf estéril. Se adicionó 5 μ l de agua destilada estéril al precipitado, se incubó a 50°C por 5 min y se centrifugó por 20 seg. Se unieron ambos sobrenadantes.

6.- Determinación de la concentración de DNA.

6.1 Densidad óptica. Se diluyó la muestra de DNA con agua destilada hasta completar un volumen de 1 ml. Se colocó en cubeta de cuarzo y se leyó su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-150-02. La concentración de DNA se calculó tomando en consideración que 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 μ g/ml de DNA doble hebra (Sambrook, J. et al. 1989).

6.2 Método del minigel de agarosa. Se empleó para determinar, de manera aproximada, la concentración de DNA plasmidial o de fragmentos de restricción de DNA en un muestra. Se preparó un minigel (2,5 x 8 cm o de 8 x 8 cm.) de agarosa al 0,7% (p/v) con bromuro de etidio a concentración final de 0,5 μ g/ml (Métodos, sección 4.1). La muestra de DNA a analizar se mezcló 5:1 (v/v) con tampón de carga 6x (Apéndice 3), y la mezcla se cargó en el gel. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 40 volts a

temperatura ambiente. El gel se observó en transiluminador Mineralight modelo TM-36. Se comparó la intensidad de fluorescencia de la banda de DNA de la muestra en estudio con aquellas de DNA estándar (fago lambda digerido con HindIII) (Apéndice 4). Se estimó la concentración de DNA de la muestra por similitud de intensidad con alguna de las 8 bandas del fago lambda digerido con HindIII.

7.- Digestión del DNA con endonucleasas de restricción.

7.1 Digestión total de DNA cromosomal de L. casei. Se colocó en tubo Eppendorf estéril el DNA cromosomal y la enzima de restricción a una concentración de 3-4 unidades de enzima por μg de DNA. Se agregó el volúmen de tampón adecuado y se llevó la mezcla a un volúmen final de 30 a 40 μl . Se incubó a la temperatura adecuada para la enzima de 1 a 4 horas. La digestión del DNA se verificó mediante electroforesis en minigel de agarosa (Métodos, sección 6.2). Al término de la digestión total del DNA se desproteinizó con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Apéndice 2), y luego con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Después de la centrifugación se recuperó el sobrenadante y se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol frío (-20°C). Se incubó a -20°C durante 14 horas. Se centrifugó durante 15 min a 4°C , y se lavó el precipitado con etanol frío (-20°C) 70% (v/v). Se resuspendió el precipitado con agua destilada estéril.

7.2 Digestión parcial de DNA cromosomal de *L. casei*. Se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Sambrook, J. et al. (1989). Se dispuso de una serie de 9 tubos Eppendorf estériles cada uno conteniendo 1 µg de DNA cromosomal. El tubo Nº1 contenía sólo DNA cromosomal (control), y los restantes tubos DNA cromosomal y concentraciones decrecientes de la enzima de restricción BamHI (20 a 0,16 unidades/µg de DNA). La mezcla final en cada tubo fue de 15 µl y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Se detuvo la reacción agregando EDTA pH 8,0 a una concentración final de 33 mM. Se analizó la cinética de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (p/v) (Métodos, sección 4.1).

7.3 Digestión de DNA plasmidial. La proporción de DNA plasmidial y unidad de enzima de restricción dependieron del objetivo experimental planteado. Cuando se deseó observar la presencia de un fragmento de DNA clonado en un plásmido se usó entre 0,5-1 µg de DNA plasmidial y 8-10 unidades de enzima de restricción. Para recuperar DNA plasmidial linearizado o un fragmento de DNA producto de digestión enzimática de un plásmido híbrido, se usó de 4-8 µg de DNA y 15-20 unidades de enzima de restricción. Se incubó la mezcla de reacción a 37°C durante 1-3 horas en un volumen final de 20-30 µl. Después de analizada la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa (Métodos, sección

4.1), se detuvo la reacción con EDTA a una concentración final de 33 mM. Se recuperó el DNA plasmidial linearizado o el fragmento de restricción mediante el método del CTAB (Métodos, sección 5.1) o de "glass milk" (Métodos, sección 5.3).

8.- Desfosforilación del DNA.

8.1 Tratamiento con fosfatasa alcalina. Se mezcló de 1-2 µg de DNA plasmidial linearizado con 10-20 unidades de fosfatasa alcalina de ternera (CIAP) diluida en tampón de dilución conteniendo trietanolamina 30 mM pH 7,6, NaCl 3 M, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM. Se agregó tampón de reacción conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 8,5, EDTA 1 mM, y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se agregó en forma adicional 10 unidades de CIAP y se incubó a 37°C por 30 minutos. Se desproteinizó la muestra con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Apéndice 2) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se precipitó el DNA con 0,1 volúmen de acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol frío (-20°C). Se resuspendió el precipitado con agua destilada estéril.

9.- Ligamiento de DNA con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4.

9.1 Ligamiento de moléculas de DNA con extremos cohesivos. Se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Cobianchi, F. et al (1987) y Sambrook, J. et al. (1989) modificado de la siguiente manera. Se mezcló en un tubo Eppendorf estéril

100-400 ng de DNA plasmidial linearizado y desfosforilado (vector) con 100-200 ng de fragmento de restricción de DNA. Se adicionó tampón de ligado que contenía Tris-HCl 250 mM pH 7,5, MgCl₂ 100 mM, ditioneitol 100 mM, ATP 4 mM, una unidad Weiss de la enzima DNA ligasa en un volumen final de 20 µl. Se incubó a 8°C durante 14-16 horas. Se determinó la eficiencia de ligamiento mediante electroforesis en gel de agarosa (Métodos, sección 4.1).

9.2 Ligamiento de moléculas de DNA con extremos romos. Se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Shelby, L. et al. (1987) y Sambrook, J. et al. (1989) modificado de la siguiente manera. Se mezcló en tubo Eppendorf estéril 4-6 µg del plásmido pUA11 con 20 unidades de la enzima de restricción EcoRV. Se adicionó tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0, Mg Cl₂ 10 mM, NaCl 50 mM y se llevó a un volumen final de 20 µl. Se incubó a 37°C por una hora. Se purificó la banda correspondiente al plásmido linearizado mediante la técnica de "glass milk" (Métodos, sección 5.3). Se mezcló entre 0,5-1 µg de plásmido líneal con 1-2 µg de una secuencia dodecanucleotídica (12-mer) específica, la cual contenía un único sitio de restricción EcoRI. La mezcla de reacción contenía ATP 5 mM y tampón de ligamiento Tris-HCl 660 mM pH 7,6, MgCl₂ 50 mM, ditioneitol 50 mM, albúmina sérica de bovino (fracción V) 1 mg/ml, espermidina-Cl 5 mM. Se adicionó 2 unidades Weiss de la enzima DNA ligasa y se

incubó a 16°C durante 16 horas. Se desproteinizó la mezcla con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Apéndice 2) y luego con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se precipitó el DNA con 0,1 volúmen de acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol frío (-20°C). El precipitado se resuspendió con agua destilada estéril. Se realizó la digestión del plásmido con la enzima de restricción EcoRI en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM en un volúmen final de 20 µl. Se recuperó el fragmento EcoRI-EcoRI de 1,4 kb mediante la técnica de "glass milk" (Métodos, sección 5.3).

10.- Síntesis de sonda específica de la secuencia que contiene el gen para la enzima α-acetolactato descarboxilasa.

10.1 Purificación del fragmento de DNA conteniendo el gen para la α-acetolactato descarboxilasa. El plásmido pUA11 fue linearizado con la enzima de restricción HincII en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, KCl 50 mM en un volúmen final de 15 µl. Se incubó a 37°C durante 60 minutos, y se purificó la banda de 4,1 kb correspondiente al plásmido linearizado por el método de "glass milk" (Métodos, sección 5.3). Luego, se digirió con la enzima de restricción BamHI en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM. Se incubó a 37°C por 60 minutos. Se desproteinizó y se precipitó el DNA con 0,1 volúmen de acetato de sodio 3 M y

2,5 volúmenes de etanol frío (-20°C). A partir de un gel de agarosa al 0,7% (p/v) (Métodos, sección 4.1), se purificó el fragmento HincII-BamHI de 0,9 kb (el cual contiene la secuencia estructural para la enzima α -acetolactato descarboxilasa) por el método de "glass milk" (Métodos, sección 5.3).

10.2 Síntesis de la sonda radioactiva específica. Se realizó mediante el método de extensión de partidador ("random primers") de Feinberg, A. et al. (1983) y Feinberg, A. et al (1984) modificado de la siguiente manera. Se colocó en tubo Eppendorf estéril 20 μ l de solución conteniendo 70 ng del fragmento de DNA de 0,9 kb, y se denaturó en baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Se enfrió rápidamente en hielo. Se agregó 2 μ l de cada uno de los siguientes deoxirribonucleótidos, dATP, dGTP, dTTP, en Tris-HCl 3 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, y 15 μ l de tampón conteniendo 0,67 M HEPES, 0,17 M Tris-HCl, 33 mM 2-mercaptoetanol, 1,33 mg/ml de BSA, 18 unidades/ml de oligodesoxirribonucleótidos (hexámeros) pH 6,8. Se adicionó 5 μ l de [α -³²P] dCTP (50 μ Ci), y se llevó a un volumen final de 49 μ l con agua destilada. Se mezcló brevemente, y se agregó 1 μ l de solución conteniendo el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de E. coli en tampón fosfato 100 mM pH 7,0, 2-mercaptoetanol 10 mM, glicerol 50% (v/v). Se incubó a 25°C durante 2,5 hr. Se detuvo la reacción agregando 5 μ l de EDTA

0,2 M pH 7,5. Se diluyeron 2 μ l de la mezcla con 498 μ l de agua destilada. A partir de dos alícuotas de 5 μ l cada una, se determinó la radioactividad total de la mezcla de incubación y la radioactividad incorporada en la sonda. Se multiplicó las cpm resultantes de cada ensayo por el factor 2750 para obtener las cpm total e incorporada en los 70 ng de DNA de la muestra.

11.- Hibridación DNA : DNA. Se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Southern, E. (1975). Se realizó la electroforesis del DNA cromosomal de L. casei digerido completamente con enzima de restricción, cargando en el gel entre 15-20 μ g de la muestra. Se utilizó como control negativo el DNA del fago lambda digerido con HindIII (600 ng), y como control positivo DNA del fragmento de 0,9 kb obtenido del plásmido pUA11 (6-8 ng). Se depuriné el DNA colocando el gel en solución de HCl 0,2 N durante 10 minutos. Se lavó el gel 2 veces con agua desionizada y destilada durante 10-15 segundos. Luego, se denaturó el DNA colocando el gel en solución de NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M. Se realizaron 3 lavados consecutivos por 15 minutos cada uno de ellos. Se neutralizó con solución Tris-HCl 1 M pH 7,5, NaCl 1,5 M, realizando 3 lavados por 15 min cada uno de ellos. Se transfirió el DNA a membrana de nylon utilizando una solución SSC 10X (Apéndice 2) como tampón de transferencia durante 20 hr a temperatura ambiente. Posteriormente, se

lavó la membrana con solución SSC 6X durante 5 min, con agitación constante. Se secó la membrana sobre papel 3M a temperatura ambiente, y se fijó el DNA exponiendo ésta a radiación UV (254 nm) en transiluminador Mineralight TM-36 por 5 minutos. Luego, se humedeció la membrana con solución SSC 6X y se colocó en bolsa nylon conteniendo solución de prehibridación (Apéndice 2). Se incubó a 42°C durante 4 horas. Después de eliminar esta solución se realizó la hibridación. Para ello se colocó en la bolsa la solución de hibridación (Apéndice 2), junto a la sonda denaturada por calor. Se incubó a 42°C durante 16 hr con agitación suave. Se lavó la membrana 2 veces con solución SSC 2X, SDS 0,5% (p/v) por 5 minutos, en SSC 0,1X, SDS 0,5% (p/v) a 37°C por 45 min, en SSC 0,1X, SDS 0,5% (p/v) a 42°C por 45 min, y en SSC 0,1X por 30 segundos. Luego, se expuso a placa autorradiográfica X-ray con pantalla intensificadora y se llevó a -70°C. El tiempo de exposición dependió de la intensidad de la marca radioactiva. Las placas se revelaron y fijaron de acuerdo a procedimientos establecidos.

12.- Transformación genética.

12.1 Transformación de Escherichia coli.

12.1.1 Preparación de células competentes mediante tratamiento con cloruro de calcio. Se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Cohen, S. et al. (1972) modificada de la siguiente manera. Se inoculó un matraz

conteniendo 10 ml de caldo LB (Apéndice 1) con una colonia de E. coli, y se incubó durante 16 horas a 37°C con agitación constante (300 ciclos por minuto en agitador orbital). Seguidamente, se obtuvo un cultivo fresco de la cepa inoculando 1 ml del cultivo anterior en un matraz conteniendo 10 ml de caldo LB (Apéndice 1), y se incubó durante 3 horas a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad aproximada de 5×10^7 células/ml ($DO_{550} = 0,5$). Se colocó en tubo corex frío de capacidad 30 ml y se dejó en hielo por 10 minutos. Se recuperaron las células por centrifugación a 6000 rpm ($4.340 \times g$) por 10 minutos en una centrífuga Sorvall RC-5B utilizando un rotor SS-34, y se eliminó el exceso de medio dejando el tubo 1 min en posición invertida. Se resuspendió el sedimento celular con 10 ml de $MgSO_4$ 10 mM y se dejó durante 30 min en hielo. Se centrifugó durante 6 min y se eliminó el exceso de medio dejando el tubo en posición invertida. Se resuspendió el sedimento con 5 ml de $CaCl_2$ 0,1 M y se dejó durante 20 min en hielo. Se centrifugó y se resuspendió el sedimento bacteriano con 1 ml de $CaCl_2$. Se dejó en hielo por un tiempo mínimo de 1 a 2 hr hasta su uso.

12.1.2 Preparación de células competentes mediante tratamiento con cloruro de rubidio. Se realizó de acuerdo a la metodología de Maniatis, T. et al. (1982) modificada de la siguiente manera. Se inoculó una colonia de E. coli en

placa LB (Apéndice 1) y se incubó durante 2 ds a 37°C. A partir del cultivo en placa se aislaron colonias y se inoculó un matraz conteniendo 6 ml de caldo sigma (Apéndice 1). Se incubó por 2 a 3 hr a 37°C con agitación constante (300 ciclos/min) hasta alcanzar una densidad aproximada de 5×10^7 células/ml. ($DO_{550} = 0,5$). Se dejó en hielo por 10 min, y se distribuyó en 4 tubos corex de capacidad 30 ml. Se centrifugó a 5000 rpm ($3.020 \times g$) durante 5 min a 4°C en centrífuga Sorvall RC-5B con rotor SS-34. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el sedimento bacteriano con 30 ml de solución TFB1 (Apéndice 1) mantenida a 4°C. Se centrifugó, se eliminó completamente el sobrenadante, y se resuspendió el sedimento con 4 ml de solución TFB2 (Apéndice 1) mantenida a 4°C. Se distribuyó de 100 a 200 μ l en tubo Eppendorf y se almacenó a 4°C hasta su uso.

12.1.3 Transformación de células competentes de Escherichia coli. Se procedió de acuerdo al método de Cohen, S. et al. (1972) modificado de la siguiente manera. Se transfirió 100 μ l de la suspensión de células competentes obtenidas por tratamiento con $CaCl_2$ a un tubo Eppendorf estéril mantenido a 4°C. Se adicionó entre 50 a 100 ng de DNA transformante en un volumen máximo de 10 μ l, y se dejó en hielo durante 30 minutos. Se dió un pulso térmico a 42°C durante 2 min y se dejó en hielo por 5 minutos. Se adicionó 0,9 ml de caldo LB

(Apéndice 1) preincubado a 37°C y se incubó por 1 hr a 37°C. Alternativamente, en ciertos ensayos de transformación se utilizó medio SOC (Apéndice 1) y se incubó por 45 min a 37°C.

12.1.4 Selección y mantención de clones transformados. Para la selección de las células transformadas se plaquearon de 100 a 200 µl del cultivo anterior en placa con agar LB (Apéndice 1) conteniendo ampicilina (50 a 100 µg/ml) o tetraciclina (20 µg/ml). Cuando se empleó el medio SOC (Apéndice 1) en el protocolo de transformación las células fueron plaqueadas en medio SOB (Apéndice 1) conteniendo MgSO₄ 20 mM y el antibiótico apropiado. En ambas situaciones las placas fueron incubadas durante 16 a 24 hr a 37°C para la expresión del carácter. Las colonias que crecieron fueron transferidas a placas con agar LB (Apéndice 1) o agar SOB (Apéndice 1) conteniendo MgSO₄ y el antibiótico adecuado e incubadas por 16 a 18 horas a 37°C. Las placas conteniendo las colonias transformadas fueron mantenidas a 4°C hasta su uso.

12.2 Transformación de Saccharomyces cerevisiae. Se realizó de acuerdo la metodología descrita por Ito, H. et al. (1983). Se inoculó S. cerevisiae AB1380 en 10 ml de medio YEP (Apéndice 1), y se incubó a 30°C con agitación constante (300 ciclos por min en agitador orbital) hasta alcanzar una DO_{600 nm} 1,2 (2,4 x 10⁷ células/ml). Se centrifugó a 3000

rpm (1.085 x g) durante 5 min en centrifuga Sorvall RC-5B con rotor SS-34, y se resuspendió el sedimento celular con 2 ml de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM. Se centrifugó y se resuspendió el sedimento con 2 ml de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, acetato de litio 100 mM. Después de centrifugar a 3000 rpm (1.085 x g) por 5 min, se resuspendió el sedimento celular con 200 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, acetato de litio 100 mM. Se incubó a 30°C durante 60 min con agitación suave. Se colocó en tubo Eppendorf estéril, y se agregó 40 µg de DNA de esperma de salmón y 1 µg de DNA plasmidial. Se incubó a 30°C durante 30 minutos. Luego, se adicionó 0,7 ml de PEG y se incubó a 30°C por 50 minutos. Se dió un pulso térmico en baño con agua a 42°C por 5 min. Se centrifugó durante 5 seg y se lavó el sedimento celular con 0,5 ml de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM. Después de centrifugar, se resuspendió el sedimento con 100 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM. Se plaquéó en medio SC (Apéndice 1) con aminoácidos, excepto triptófano.

13.- Cuantificación de la actividad enzimática.

13.1 Preparación de extracto celular. Se realizó de acuerdo a la metodología de Rose, M. et al. 1983. Se cultivó la cepa de levadura en un medio selectivo hasta alcanzar una densidad aproximada de $1,4 \times 10^7$ células /ml. Se dejó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 2500 rpm (755 x g) por 5 min. El sedimento celular se resuspendió en tampón de

lisis conteniendo Tris-HCl 100 mM pH 8,0, ditiotreititol 1 mM y glicerol 20% (v/v). Se congeló a -20°C durante 1hr y se descongeló en hielo. Se agregaron esferas de vidrio de 0,45-0,5 mm de diámetro hasta alcanzar el nivel inferior del menisco de la solución, y PMSF a concentración final 1 mM. Se lisaron las células en vórtex a máxima velocidad por 15 seg durante 6 veces a 4°C . Se adicionó 1 volúmen del tampón de lisis, se mezcló, y recuperó el extracto líquido mediante micropipeta. Se clarificó el extracto líquido mediante centrifugación por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y guardó a 4°C hasta su uso.

13.2 Permeabilización celular. Se realizó de acuerdo a las metodologías descrita por Guarente, L. 1983 y Becker, J. 1990 modificada de la siguiente manera. La primera metodología consistió en obtener un cultivo de la cepa de levadura en medio selectivo hasta una densidad de $1,4 \times 10^7$ células /ml. Se dejó en hielo durante 20 min, y se centrifugó 10 ml a 2500 rpm ($755 \times g$) por 5 min en centrífuga Sorvall con rotor SS-34. Se lavó el sedimento celular con 1 ml de tampón Z (Apéndice 3). Se centrifugó durante 1 min, y se resuspendió el sedimento celular con 1 ml de tampón Z (Apéndice 3). Se adicionaron 3 gotas de cloroformo y 2 gotas de SDS 0.1%, y se agitó en vórtex a máxima velocidad durante 10 seg. La segunda metodología

consistió en obtener un cultivo de la cepa de levadura en medio selectivo hasta una densidad de $1,4 \times 10^7$ células/ml. Se centrifugó 10 ml de cultivo a 2500 rpm ($755 \times g$) por 5 min en centrífuga Sorvall con rotor SS-34. Se lavó el sedimento celular con 1 ml de tampón Z (Apéndice 3). Se centrifugó durante 1 min, y se resuspendió el sedimento celular con 1 ml de tampón Z (Apéndice 3). Se adicionó 10 μ l de tolueno y 10 μ l de sarcosil, y se agitó en vórtex a máxima velocidad durante 10 segundos.

La medición de la actividad enzimática en E. coli se realizó de acuerdo a la metodología modificada de Becker, J. 1990 para levadura, excepto que el sedimento bacteriano se resuspendió con 1 ml de fosfato de potasio 30 mM, y las células se permeabilizaron sólo con tolueno.

13.3 Medición de la actividad enzimática α -acetolactato descarboxilasa. Se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Loken, J. et al (1970). Se mezcló 150 μ l de células permeabilizadas, con 50 μ l de fosfato de potasio 30 mM pH 6,2 y 50 μ l de solución de α -acetolactato. Se incubó la mezcla a 37°C durante 30 minutos, y se detuvo la reacción por la adición de 250 μ l de NaOH 2,5 N. Se agregó 6,5 ml de α -naftol 0,77% (p/v), creatina 0,077% (p/v). Se dejó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se centrifugó 1 ml de la mezcla y se leyó la absorbancia a 540 nm. La unidad de enzima se define como la cantidad de enzima la cual libera

un μmol de acetoina en 1 hora bajo las condiciones de ensayo.

14.- Separación del genoma de levadura mediante electroforesis de campo pulsado de contorno homogéneo (CHEF).

14.1 Preparación de DNA cromosómico intacto. Se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Schwartz, D. et al. 1984 modificada de la siguiente manera. Se inoculó la cepa de levadura en 10 ml de caldo YEP (Apéndice 1) y se incubó a 28°C con agitación constante (300 ciclos por min en agitador orbital) hasta alcanzar la fase estacionaria ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 10$). Se centrifugó 1 ml de cultivo y se lavó con agua destilada estéril. Se lavó dos veces con 1 ml de EDTA 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Se resuspendió en 150 μl de EDTA 50 mM, Tris-HCl 1 mM pH 7,5 y se adicionó zimoliasa a concentración final de 2 mg/ml. Se colocó en un baño a 42°C por 30 seg y se agregó 250 μl de agarosa de bajo punto de fusión mantenida a 42°C. Se mezcló suavemente y se dejó solidificar a 4°C por 30 min. Se depositó sobre el bloque de agarosa EDTA 50 mM, Tris-HCl 10 mM y β -mercaptoetanol al 7% (p/v). Se incubó a 37°C durante 12 a 14 horas. Se transfiere el bloque de agarosa a un tubo conteniendo EDTA 0,5 M, N-laurilsarcosina al 1% (p/v) y proteinasa K a concentración final de 2mg/ml. Se incubó a 55°C durante 24 horas. Se dializó el bloque de agarosa con EDTA 0,5 M, Tris-HCl 10 mM

pH 7,5 por 1 hora, durante 4 veces consecutivas. Se guardó a 4°C con EDTA 50 mM.

14.2 Electroforesis de campo pulsado. Se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Chu, G. et al. 1986. La electroforesis de campo pulsado se realizó en un equipo de electroforesis Pulsaphor plus LKB. Se preparó un gel de agarosa al 1% en tampón TBE (Apéndice 3). Para la corrida electroforética se usó tampón TBE 0,5x. La temperatura del gel y del tampón de corrida se mantuvo a 12°C, y con circulación constante de tampón TBE 0,5x. Se depositaron los moldes de agarosa que contienen el DNA cromosomal de levadura en cada pocillo del gel de agarosa. La corrida electroforética se programó en los siguientes tiempos de pulso: 90, 120, 150 y 180 segundos, con un tiempo de corrida equivalente para cada pulso de 8 horas, a 180 volts.

14.3 Tinción de geles. Se colocó el gel en una solución de bromuro de etidio a una concentración final de 1 µg/ml. Se dejó a temperatura ambiente durante 30 min, y se eliminó el exceso de colorante sumergiendo el gel en agua destilada durante una hora. Se fotografió el gel en cámara Polaroid 55 con filtro amarillo de gelatina.

RESULTADOS.

1.- Prospección de la actividad α -acetolactato descarboxilasa en diversos microorganismos.

En la Tabla 1 se muestran los valores de actividad enzimática para α -acetolactato descarboxilasa en diversas bacterias y levadura mediante el método de permeabilización con tolueno (Métodos 13.2). Se puede observar la ausencia de actividad en E. coli DH5 α , S. cerevisiae AB1380, en tanto L. casei ATCC 393 presenta un nivel de actividad enzimática comparable a E. aerogenes ATCC 13048.

2.- Incorporación del gen de Enterobacter aerogenes que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa en el vector de expresión pAAR6.

La aproximación experimental empleada (Figura 2) consistió en subclonar el fragmento de DNA del plásmido pUA11, portador del gen para α -acetolactato descarboxilasa de E. aerogenes en el vector de expresión pAAR6, el cual contiene secuencias que permiten su replicación en forma autónoma en E. coli y en S. cerevisiae.

TABLA 1

Cuantificación de la actividad enzimática α -acetolactato
descarboxilasa en cepas bacterianas y de levadura

Cepa	*Unidades de actividad enzimática
<u>Escherichia coli</u> DH5 α	0,000
<u>Enterobacter aerogenes</u> ATCC 13048	0,340
<u>Lactobacillus casei</u> ATCC 393	0,267
<u>Saccharomyces cerevisiae</u> AB1380	0,000

*La unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de acetoina en una hora bajo las condiciones de ensayo.

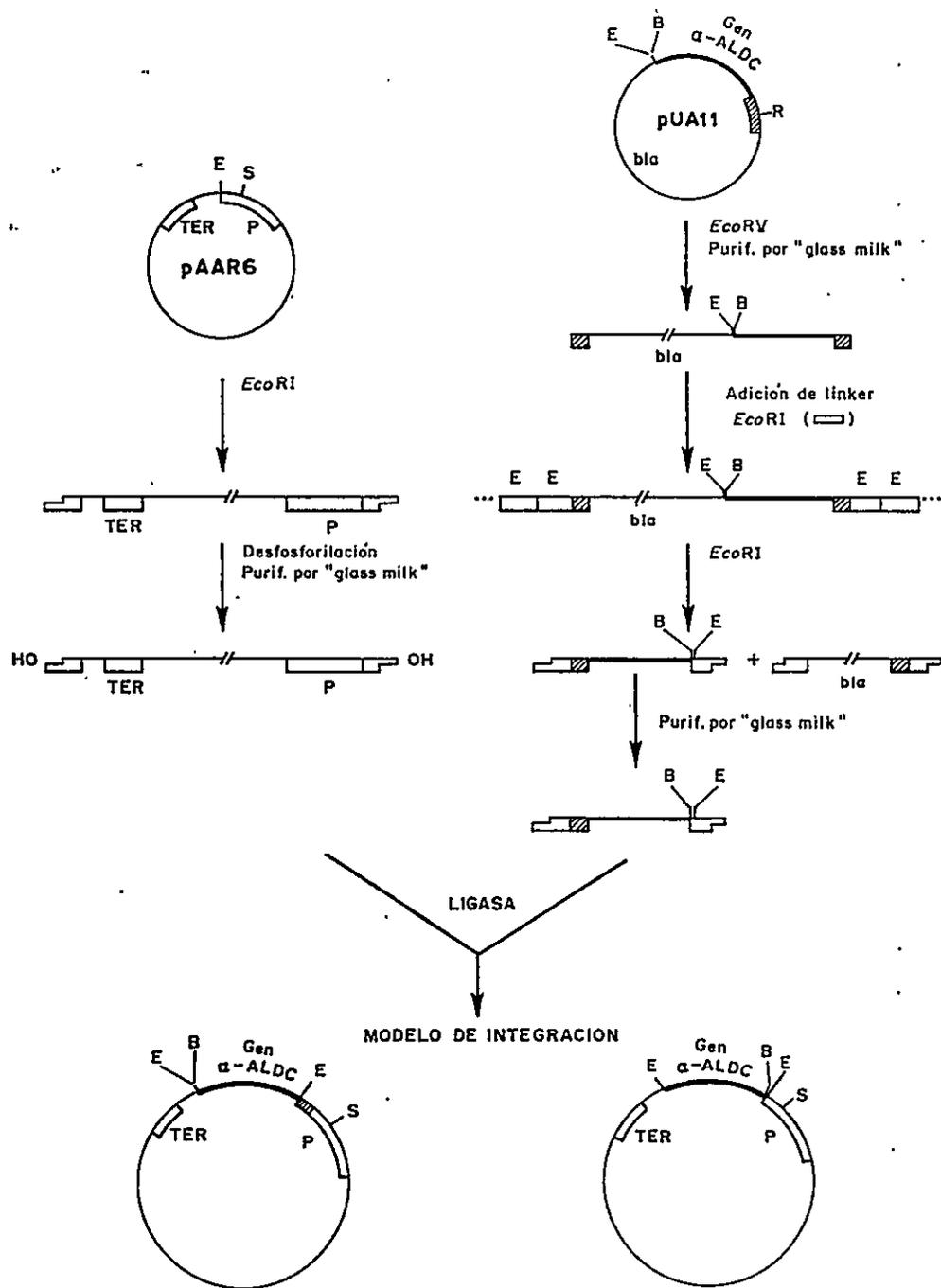


Figura 2. Integración del fragmento de DNA conteniendo el gen para la α -acetolactato descarboxilasa en el vector de expresión pAAR6.

La línea gruesa representa el fragmento de DNA de *E. aerogenes* que contiene el gen que codifica para la α -acetolactato descarboxilasa (α -ALDC), y la línea delgada el DNA del vector pAAR6.

TER= secuencia de término de transcripción del gen ADC1; P= secuencia del promotor del gen ADC1; bla= gen que codifica por una β -lactamasa. B= BamHI, E= EcoRI, R= EcoRV y S= SphI.

2.1 Análisis de restricción del plásmido pUA11.

El plásmido pUA11 es un plásmido híbrido que contiene un fragmento BamHI-EcoRV de DNA de 1,4 kb proveniente de E. aerogenes, clonado en la región de múltiples sitios de restricción ("polylinker") del plásmido pUC12 (Apéndice 5). Dicho fragmento contiene el gen que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa (Sone, H. et al. 1987).

Se transformó Escherichia coli DH5 α con el plásmido pUA11 con una eficiencia de transformación aproximada de 10^7 clones transformados/ μ g de DNA plasmidial.

A partir de estos clones se purificó el DNA plasmidial mediante la metodología del CTAB (Métodos, sección 5.1), y se realizó un análisis de restricción del plásmido con las enzimas BamHI, PstI, EcoRV y HincII. Dada la baja recuperación del plásmido (20% aproximadamente), y el grado de digestión parcial obtenida con las enzimas de restricción, el plásmido se purificó mediante el método de "glass milk" (Métodos, sección 5.3). De esta manera se aumentó el grado de recuperación del plásmido (50 a 60%), y la eficiencia de los ensayos con enzimas de restricción.

2.2 Linearización del plásmido pUA11 y adición de "linker" EcoRI.

Con la finalidad de clonar el fragmento BamHI-EcoRV de 1,4 kb en el sitio de restricción EcoRI del plásmido pAARó, se realizó una digestión total del plásmido pUA11 con la

enzima de restricción EcoRV. Se obtuvo una sola banda de 4,1 kb, aproximadamente. La muestra fue desproteïnizada y se purificó a partir de un gel de agarosa mediante el método de "glass milk".

Enseguida, se adicionó "linker" EcoRI fosforilado a los extremos romos del plásmido pUA11 ya linearizado con la enzima EcoRV (Métodos, sección 9.2). La muestra fue desproteïnizada y precipitada con etanol.

Considerando que el plásmido pUA11 contiene un sitio de restricción EcoRI, adyacente al sitio BamHI de la secuencia de policlonación del plásmido pUC12, y que por integración direccional el fragmento de 1,4 kb de *E. aerogenes* fue clonado entre los sitios BamHI y EcoRV, se realizó la digestión del plásmido pUA11 modificado por la adición de linker, con la enzima EcoRI. Como resultado de la digestión enzimática se obtuvieron 2 fragmentos EcoRI-EcoRI con tamaños de 2,7 y de 1,4 kb, respectivamente (Figura 3).

El primero de estos fragmentos corresponde al DNA del plásmido pUC12 y el segundo fragmento al inserto de 1,4 kb, el cual sería portador de la secuencia codogénica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa. Se purificó el fragmento de 1,4 kb EcoRI-EcoRI mediante el método de "glass milk". Esta etapa de purificación permitió, además, remover el "linker" EcoRI no ligado al fragmento de 1,4 kb, como asimismo, dejar un único sitio EcoRI en ambos extremos del

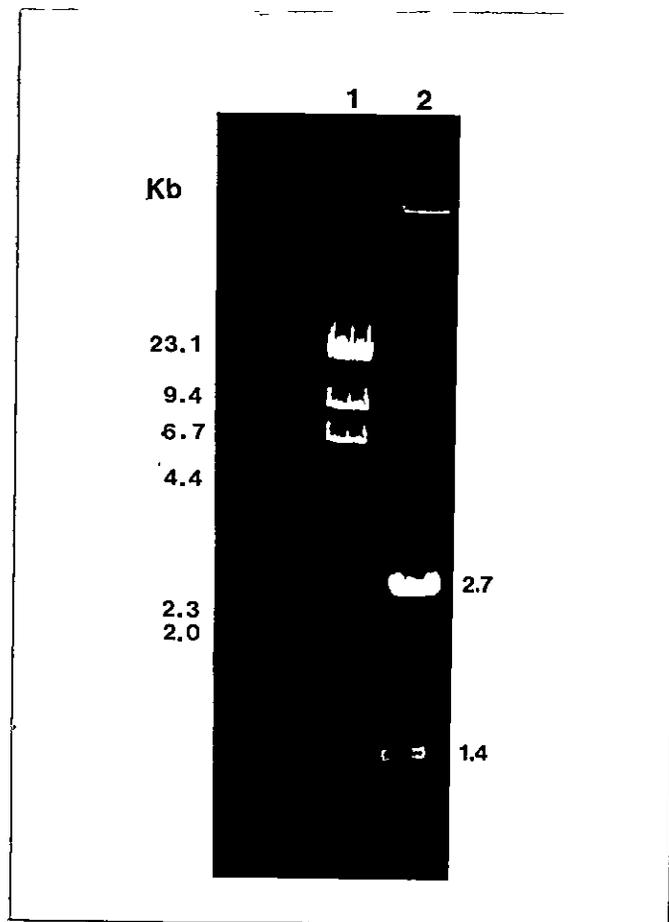


Figura 3. Electroforesis de DNA del plásmido pUA11. El DNA fue obtenido a partir de una minipreparación (Métodos 3.2), y la electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0,7% preparada en tampón TAE, a 60 volts durante 2 horas.

Carril 1 : DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII (400 ng) (marcador de peso molecular)

Carril 2 : DNA del plásmido pUA11 digerido con EcoRV y BamHI (250 ng).

fragmento después de la acción de la enzima EcoRI.

2.3 Aislamiento y purificación del vector de expresión pAAR6.

Se transformó Escherichia coli DH5 α con el plásmido de expresión pAAR6 (Apéndice 6) con una eficiencia cercana a 2×10^6 clones transformados/ μ g de DNA plasmidial.

Este plásmido contiene un fragmento de pBR322 con la secuencia ORI que permite su replicación en E. coli, y la secuencia ARS 1 del cromosoma IV de levadura que permite su replicación autónoma en S. cerevisiae.

Contiene, además el gen bla que confiere resistencia a la ampicilina, lo cual permite su selección en E. coli, el gen trp-1 que permite la complementación de mutantes auxótrofos trp-1 en S. cerevisiae y el promotor (P) y el terminador (TER) del gen ADC1.

Se realizó una digestión total del plásmido pAAR6 con la enzima EcoRI, y se purificó el plásmido lineal a partir de un gel de agarosa al 0,7% mediante el método de "glass milk".

El plásmido fue desfosforilado con CIAP. Luego de inactivar la enzima con tratamiento térmico a 75°C durante 10 minutos, se desproteinizó la muestra y se precipitó con etanol. Se realizó la mezcla de ligamiento entre moléculas de DNA vector y fragmentos EcoRI-EcoRI de 1,4 kb.

2.4 Transformación genética de Escherichia coli DH5 α .

Las células competentes de E. coli DH5 α obtenidas mediante tratamiento con cloruro de rubidio se transformaron con la mezcla de ligamiento anterior. Las condiciones experimentales fueron similares al protocolo de transformación de E. coli DH5 α , excepto que se utilizó 25 ng de DNA en un volumen de 10 μ l; el pulso térmico fue de 42°C por 2,5 min; la mezcla de transformación se incubó en medio SOC (Apéndice 1) a 37°C por 60 min, y se seleccionaron las colonias transformadas en medio SOC con ampicilina a una concentración final de 50 μ g/ml. En la Tabla 2 se puede observar que la eficiencia de transformación con la mezcla de ligamiento es 7 veces menor a la eficacia de transformación de E. coli DH5 α con el plásmido pAAR6 sobreenrollado (control), y ésta a su vez es aproximadamente 15 veces menor a los resultados obtenidos con el plásmido pBR322 sobreenrollado del cual deriva su origen de replicación.

2.5 Recuperación de plásmidos de clones transformados y ensayo de digestión con EcoRI.

Se repicaron las colonias transformadas en medio SOC con ampicilina a concentración final de 100 μ g/ml, y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Se realizaron minipreparaciones de DNA plasmidial a una muestra de las

TABLA 2

Transformación de Escherichia coli DH5 α
con DNA plasmidial pAAR6 (α -ALDC)

Cepa	DNA	Nº Transformantes/ μ g DNA
<u>E. coli</u> DH5 α	-	0
	pUA11	$3,0 \times 10^8$
	pBR322	$2,0 \times 10^7$
	pAAR6	$1,4 \times 10^6$
	pAAR6 (α -ALDC)	$2,0 \times 10^5$

Cien microlitros de células competentes de E. coli DH5 α se transformaron con 16 ng de DNA plasmidial. Después de un período de expresión del marcador genético se sembraron las células de la mezcla de transformación en medio SOB (Apéndice 1) con MgSO₄ 20 mM y ampicilina.

colonias que crecieron en medio selectivo. Los resultados experimentales obtenidos muestran que, aproximadamente, un 60% de las colonias transformadas presentan un plásmido con un patrón electroforético diferente al control (plásmido pAAR6 sin inserto) (Figura 4A). El 40% de los clones transformados analizados presentaba un patrón electroforético similar al control.

Con el objeto de verificar si el plásmido aislado de los clones transformados presenta el fragmento EcoRI de 1,4 kb, se realizó una digestión total del plásmido con la enzima de restricción EcoRI. Los resultados de electroforesis (Figura 4B) muestran la presencia de dos fragmentos. Un fragmento cercano a los 7,9 kb, el cual correspondería al vector de clonación pAAR6, y un fragmento de un tamaño aproximado a 1,4 kb, el cual podría corresponder al fragmento portador de la secuencia codogénica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa.

2.6 Actividad de α -acetolactato descarboxilasa en las colonias de E. coli transformadas.

Considerando que el fragmento de 1,4 kb de E. aerogenes clonado en el plásmido pAAR6 contiene el gen que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa, se cuantificaron los niveles de actividad enzimática en algunos clones de E. coli transformados mediante la metodología de

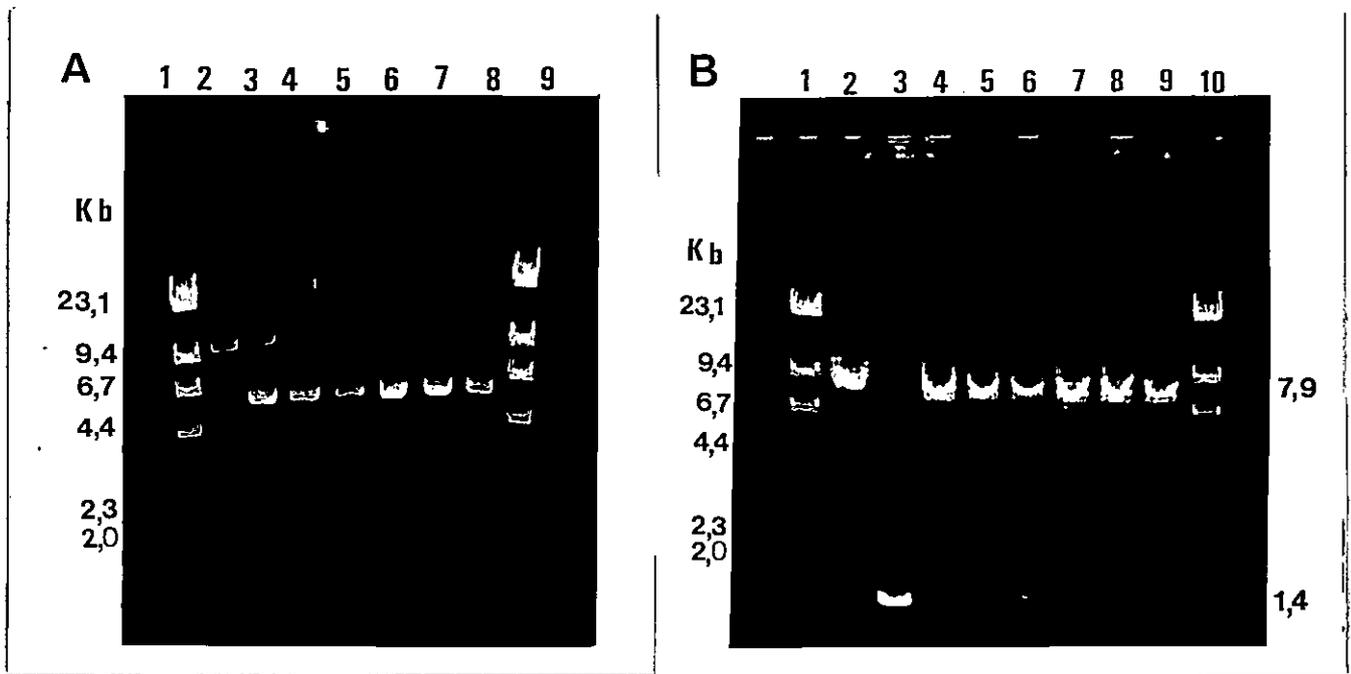


Figura 4

A. Electroforesis de DNA plasmidial de clones transformados de *E. coli* DH5 α . El DNA fue obtenido a partir de una minipreparación (Métodos 3.2), y la electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0,7% preparada en tampón TAE, a 60 volts durante 2 horas.

Carriles 1 y 9 : DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII (200 ng) (marcador de peso molecular). Carriles 2 al 8: DNA plasmidial de clones transformados de *E. coli* DH5 α conteniendo 30, 44, 40, 32, 100, 100 y 40 ng, respectivamente.

B. Electroforesis de DNA plasmidial de clones transformados de *E. coli* DH5 α digeridos con EcoRI. El DNA se obtuvo a partir de una minipreparación (Métodos 3.2), y la electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0,7% preparada en tampón TAE, a 60 volts durante 2 horas.

Carriles 1 y 10 : DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII (200 ng) (marcador de peso molecular). Carril 2: DNA del plásmido pAAR6 digerido con EcoRI (140 ng). Carril 3: fragmento de DNA de 1,4 kb de *E. aerogenes* (100 ng). Carriles 4 al 9 : DNA plasmidial de clones transformados de *E. coli* DH5 α digeridos con EcoRI, conteniendo 150, 110, 100, 150, 150 y 130 ng, respectivamente.

Loken, J. et al. 1970.

Los resultados de medición de la actividad enzimática que se presentan en la Tabla 3 muestran la presencia de dos tipos de colonias de E. coli transformadas. Aquellas que exhiben una actividad enzimática mayor, que corresponde aproximadamente a un 66% del total de las colonias analizadas, y un subgrupo con actividad enzimática más baja, que constituyen un 33% de las colonias transformadas.

3.- Introducción del gen que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa en Saccharomyces cerevisiae.

3.1 Transformación genética de Saccharomyces cerevisiae.

Se seleccionó el clon de E. coli DH5 α transformado que presentaba la mayor actividad de α -acetolactato descarboxilasa. A partir de una colonia se realizó una preparación de DNA plasmidial en gran escala de acuerdo a la metodología de Wang, C. J. 1987, exceptuando la etapa de amplificación del número de copias de DNA plasmidial mediante la adición de cloramfenicol.

Previo al ensayo de transformación, se seleccionó una colonia de Saccharomyces cerevisiae AB1380 multiauxotrófica. Para ello, a partir del cultivo original de la cepa, se realizaron réplicas de un total de 100 colonias en placa con medio SC (Apéndice 1), y en diferentes placas selectivas con medio SC complementado con diferentes aminoácidos.

TABLA 3

Cuantificación de la actividad enzimática α -acetolactato descarboxilasa en transformantes de Escherichia coli DH5 α

CEPA	*Unidades de actividad enzimática
<u>E. coli</u> DH5 α	0,000
<u>E. coli</u> DH5 α [pAAR6]	0,000
<u>E. coli</u> DH5 α [pAAR6 (α -ALDC)]:	
clon 1	0,090
clon 2	0,086
clon 3	0,082
clon 4	0,076
clon 5	0,032
clon 6	0,026
<u>E. coli</u> DH5 α [pUA11]	0,276

*La unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera un μ mol de acetoína en una hora bajo las condiciones de ensayo.

Se transformó S. cerevisiae AB1380 utilizando 1 a 2 µg de DNA plasmidial. Las colonias transformadas fueron seleccionadas en medio SC complementado con uracilo, adenina, histidina y lisina. Después de un período de incubación de 5 días a 28°C, las colonias que crecieron se replicaron en medio selectivo con los aminoácidos requeridos para el crecimiento de la cepa, excepto triptófano. La eficiencia de transformación fue de 310 colonias transformadas/µg de DNA plasmidial (Tabla 4).

Se estimó la tasa de duplicación de acuerdo a la cinética de crecimiento de S. cerevisiae AB1380 y de los clones transformados. La cepa normal tiene un tiempo de duplicación estimado de 2,5 horas, en cambio, el tiempo de duplicación promedio de los clones transformados fue de 3,7 horas (Tabla 5).

3.2 Extracción de DNA plasmidial de clones transformados de S. cerevisiae AB1380, y retrotransformación de E. coli DH5α.

Se realizó la extracción de DNA plasmidial de clones transformados de S. cerevisiae AB1380. Seguidamente, se realizaron ensayos de transformación de células competentes de E. coli DH5α con el DNA plasmidial obtenido. Las colonias retrotransformadas fueron seleccionadas en medio LB (Apéndice 1) con ampicilina a concentración final de 50 µg/ml. La eficiencia de transformación obtenida empleando el

TABLA 4

Transformación de Saccharomyces cerevisiae AB1380
con DNA plasmidial pAAR6 (α -ALDC)

Cepa	DNA	Transformantes TRP1/ μ g DNA
<u>S. cerevisiae</u> AB1380	-	0
	pAAR6	296
clon 1	pAAR6 (α -ALDC)	320
clon 2	pAAR6 (α -ALDC)	296
clon 3	pAAR6 (α -ALDC)	340

En cada ensayo se transformaron 100 μ l de células competentes de S. cerevisiae AB1380 con 1 μ g de DNA plasmidial pAAR6 (control) y 1 μ g de pAAR6(α -ALDC) para cada uno de los 3 clones transformados.

TABLA 5

Tiempos de duplicación de clones transformados de
S. cerevisiae AB1380 con DNA plasmidial pAAR6 (α -ALDC)

Cepa	DNA	Tiempo de duplicación (horas)
<u>S. cerevisiae</u> AB1380	-	2,5
	pAAR6	3,2
clon 1	pAAR6(α -ALDC)	3,6
clon 2	pAAR6(α -ALDC)	3,8
clon 3	pAAR6(α -ALDC)	3,6
clon 4	pAAR6(α -ALDC)	3,9

Los clones transformantes fueron crecidos en medio SC suplementado con uracilo, adenina, lisina e histidina. El cultivo control fue crecido en medio SC complementado con uracilo, adenina, lisina, histidina y triptófano. El tiempo de duplicación se determinó midiendo la D.O._{600nm}, y mediante recuento celular.

DNA plasmidial de 4 clones transformantes puede verse en la Tabla 6.

3.3 Extracción de DNA plasmidial de clones retrotransformados de E. coli DH5 α y análisis de restricción EcoRI y EcoRV.

Se extrajo el DNA plasmidial de algunos clones retrotransformados de E. coli DH5 α y se realizó una digestión total con la enzima de restricción EcoRI. El producto de la digestión se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 5). Los resultados muestran la presencia de un fragmento de 7,9 kb, aproximadamente, que correspondería al DNA del plásmido pAAR6 lineal, y una banda menor que correspondería al fragmento de 1,4 kb de E. aerogenes clonado en el sitio EcoRI del vector. Con el objeto de verificar la presencia del inserto de 1,4 kb en el plásmido pAAR6, se realizó la digestión del plásmido recuperado de los clones retrotransformados con la enzima EcoRV, y se analizó los productos de digestión enzimática mediante electroforesis (Figura 6). En el carril correspondiente al plásmido pAAR6 digerido con EcoRV se observa la presencia de 3 bandas, equivalentes a fragmentos de DNA de 5,4, 1,3 y 1,2 kb. En el carril correspondiente al DNA plasmidial de clones retrotransformados aparece una banda equivalente a un fragmento de DNA de 2,7 kb, que

TABLA 6

Retrotransformación de Escherichia coli DH5 α con DNA
 plasmidial obtenido de clones transformados de
S. cerevisiae AB1380

Fuente de DNA	Transformantes Ap ^r / μ g DNA
<u>S. cerevisiae</u> AB1380	0
<u>S. cerevisiae</u> AB1380 [pAAR6 (α -ALDC)] :	
clon 1	140 \pm 4
clon 2	130 \pm 2
clon 3	120 \pm 2
clon 4	130 \pm 3

Cien microlitros de células competentes de E. coli DH5 α
 fueron transformadas con 60 ng de DNA obtenido de clones
 transformados de S. cerevisiae AB1380.

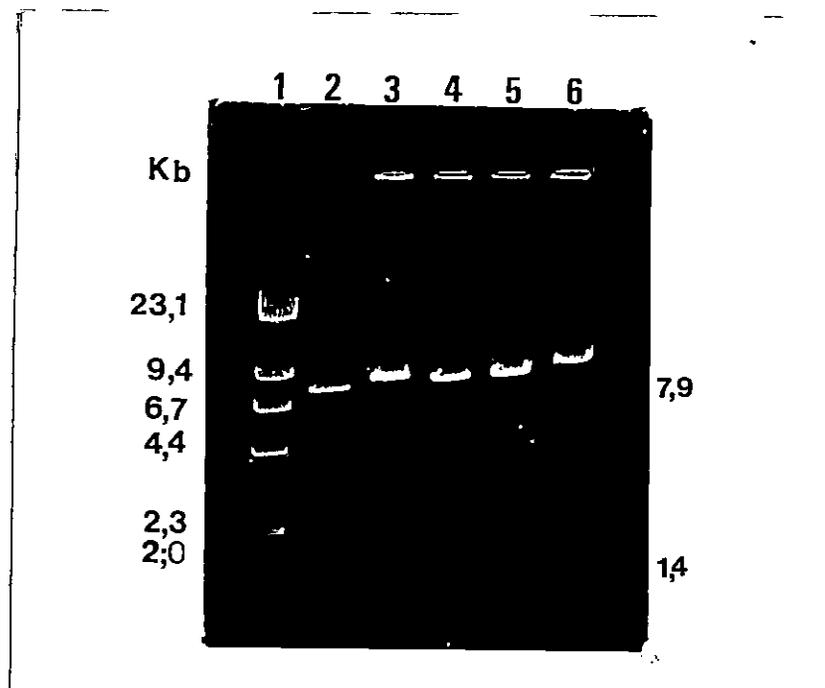


Figura 5. Electroforesis de DNA plasmidial de clones retrotransformados de *E. coli* DH5 α digeridos con EcoRI. El DNA se obtuvo a partir de una minipreparación de DNA plasmidial (Métodos 3.2), y la electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0,7% preparada en tampón TAE, a 60 volts durante 2 horas.

- Carril 1 : DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII (200 ng) (marcador de peso molecular)
- Carril 2 : DNA del plásmido pAAR6 digerido con EcoRI (40 ng)
- Carriles 3 al 6 : DNA plasmidial de clones retrotransformados de *E. coli* DH5 α digeridos con EcoRI (120 ng en carriles 3, 4 y 5, y 90 ng en carril 6).

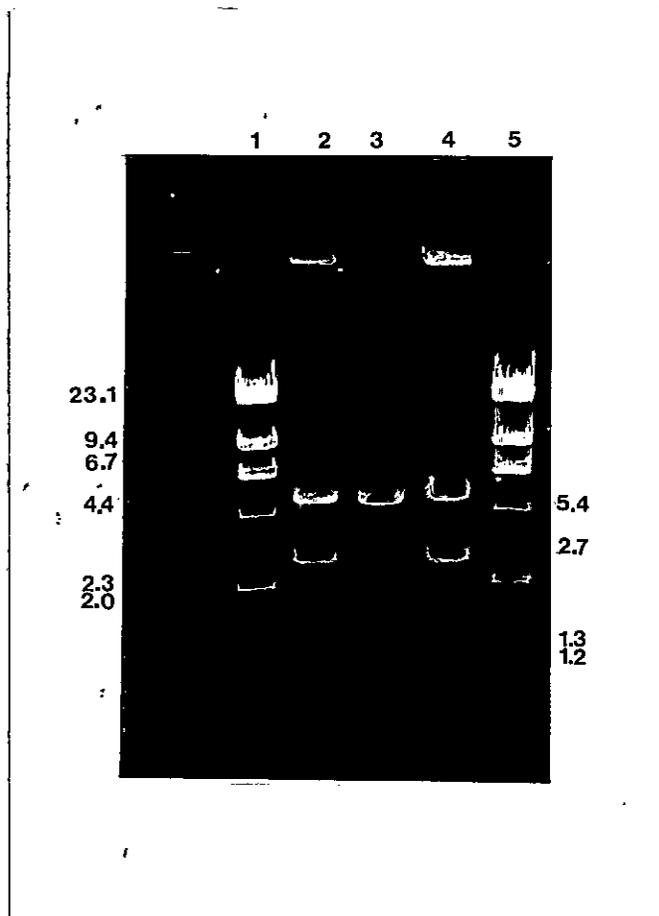


Figura 6. Electroforesis de DNA plasmidial de clones retrotransformados de *E. coli* DH5 α digerido con EcoRV. El DNA se obtuvo a partir de una minipreparación (Métodos 3.2), y la electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0,7% preparada en tampón TAE, a 60 volts durante 2 horas.

Carriles 1 y 5 : DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII (320 ng en cada carril) (marcador de peso molecular)

Carriles 2 y 4 : DNA plasmidial de clones retrotransformados de *E. coli* DH5 α digerido con EcoRV (80 ng en cada carril)

Carril 3 : DNA del plásmido pAAR6 digerido con EcoRV (80 ng).

correspondería al fragmento de DNA de 1,4 kb integrado al fragmento EcoRV-EcoRV de 1,3 kb.

3.4 Medición de la actividad enzimática α -acetolactato descarboxilasa en clones transformados de S. cerevisiae.

Se cuantificó in vitro la actividad de α -acetolactato descarboxilasa de clones transformados mediante el método de la lisis celular de Rose, M. et al. 1983, y el método de permeabilización celular de Guarente, L. 1983 y Becker, J. 1990.

Los resultados experimentales (Tabla 7) muestran la actividad de α -acetolactato descarboxilasa en los clones transformados de S. cerevisiae AB1380, medida a 37°C y a 28°C.

Se observa una actividad α -acetolactato descarboxilasa similar en el extracto celular y en células permeabilizadas con cloroformo-SDS al 1%, a 37°C. En cambio, la actividad enzimática cuantificada en células permeabilizadas con tolueno y sarcosil a 37°C fue, aproximadamente, un 50% superior respecto a las 2 metodologías anteriores. Los valores de actividad enzimática medidos a 28°C mediante los dos métodos de permeabilización, fueron equivalentes a los encontrados a 37°C.

TABLA 7

Cuantificación de la actividad enzimática de α -acetolactato descarboxilasa en clones transformados de S. cerevisiae AB1380

<u>S. cerevisiae</u>	¹ Unidades de actividad enzimática		
	Extracto celular	Permeabilización cloroformo/ SDS	tolueno/ sarcosil
² AB1380	0,000	0,000	0,000
² AB1380 [pAAR6(α -ALDC)]	0,087	0,090	0,139
³ AB1380 [pAAR6(α -ALDC)]	-	0,088	0,140

¹La unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de acetoína en una hora bajo las condiciones de ensayo.

²Medición de la actividad enzimática a 37°C.

³Medición de la actividad enzimática a 28°C.

En la tabla se especifican los valores de actividad enzimática promedio de 3 ensayos independientes.

4.- Estabilidad mitótica del gen heterólogo en cepas transformadas de Saccharomyces cerevisiae.

La estabilidad mitótica (Rose, M. D. et al. 1991) de los clones transformados fue examinada en medio completo y en medio selectivo. La estabilidad para la prototrofia para triptófano se determinó al cabo de 10 generaciones de crecimiento en medio no-selectivo (YEP). Luego, se sembró en medio sólido YEP y se repicaron las colonias en medio SC complementado con los aminoácidos requeridos para el crecimiento de la cepa (excepto triptófano), y en medio completo YEP. La estabilidad mitótica encontrada fue entre un 88 a un 90%. La estabilidad mitótica calculada cada 10 generaciones, y hasta alcanzar las 40 generaciones de cultivo en medio no selectivo, fue disminuyendo hasta alcanzar una estabilidad entre un 25 a un 28% (Figura 7).

Luego, se analizó la presencia de DNA plasmidial en clones de S. cerevisiae transformados que fueron crecidos durante 10 generaciones en medio de cultivo no selectivo. Para ello se sembró una alícuota en placa con medio completo, y después de un período de crecimiento se repicaron 100 colonias en forma paralela en medio selectivo y medio completo. Se seleccionaron 10 colonias que crecieron sólo en medio completo, y se realizó una minipreparación de DNA plasmidial. Se transformó un cultivo de E. coli DH5 α con cada una de las minipreparaciones. Al sembrarse en medio LB

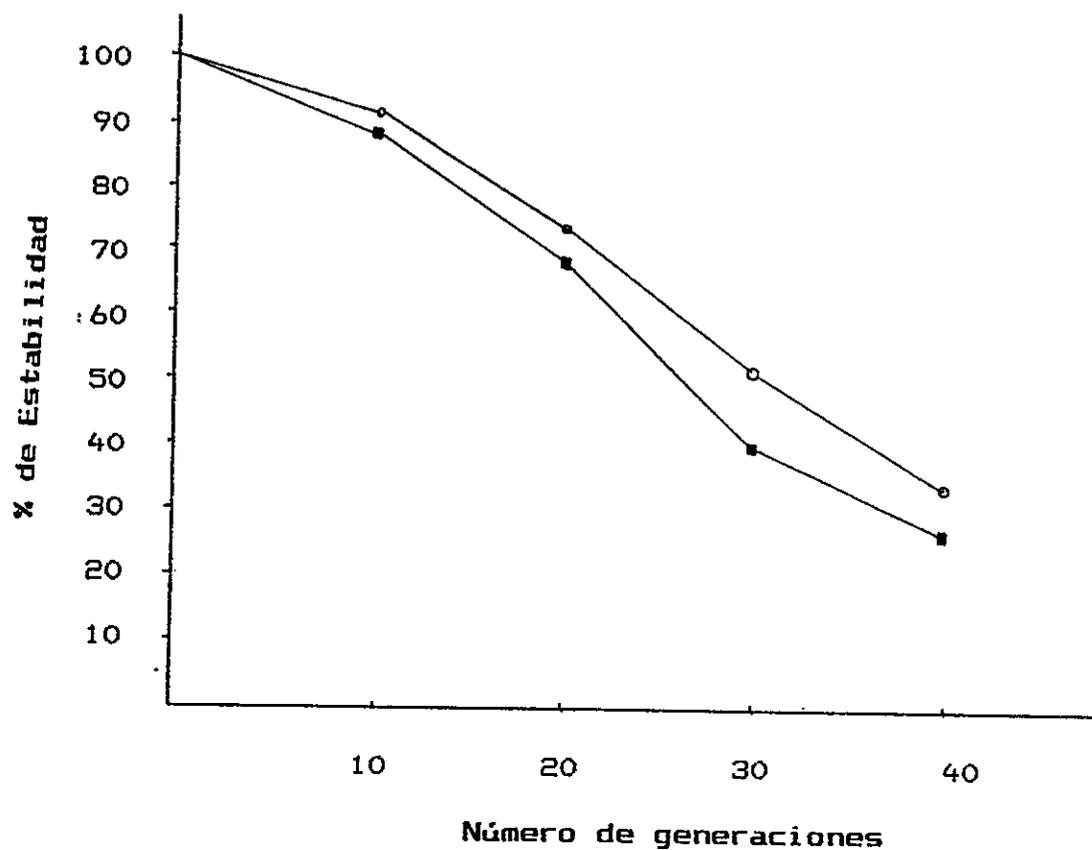


Figura 7. Determinación de la estabilidad mitótica promedio de clones transformados de *S. cerevisiae* AB1380.

○—○ clon de *S. cerevisiae* AB1380 transformado con el plásmido pAAR6.

■—■ clon de *S. cerevisiae* AB1380 transformado con el plásmido pAAR6 conteniendo el fragmento de 1,4 kb.

adicionado de ampicilina no hubo crecimiento de colonias, sugiriendo este resultado la pérdida del plásmido pAAR6 que contiene el inserto de 1,4 kb en cada uno de los clones de S. cerevisiae transformados. En forma paralela se realizaron ensayos de medición de la actividad α -acetolactato descarboxilasa en las 10 colonias seleccionadas. Se comprobó la ausencia de dicha actividad enzimática, a diferencia del control experimental (clon transformado de S. cerevisiae AB1380 con el plásmido híbrido) que creció en medio de cultivo selectivo.

5.- Construcción de la genoteca de Lactobacillus casei.

5.1 Digestión parcial del DNA cromosomal de L. casei.

En la Figura 8 se muestra la cinética de digestión parcial del DNA cromosomal de L. casei con la enzima BamHI. De acuerdo a este resultado se pudo establecer que la cantidad de enzima adecuada para obtener fragmentos de DNA entre los 2 a 23 kb es de 0,3 unidades de enzima/ μ g de DNA en las condiciones descritas (incubación a 37°C durante 30 min, con 1 μ g de DNA en un volumen de 15 μ l). Se purificaron los fragmentos de restricción de DNA cromosomal mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión, y posterior extracción de las correspondientes bandas mediante CTAB.

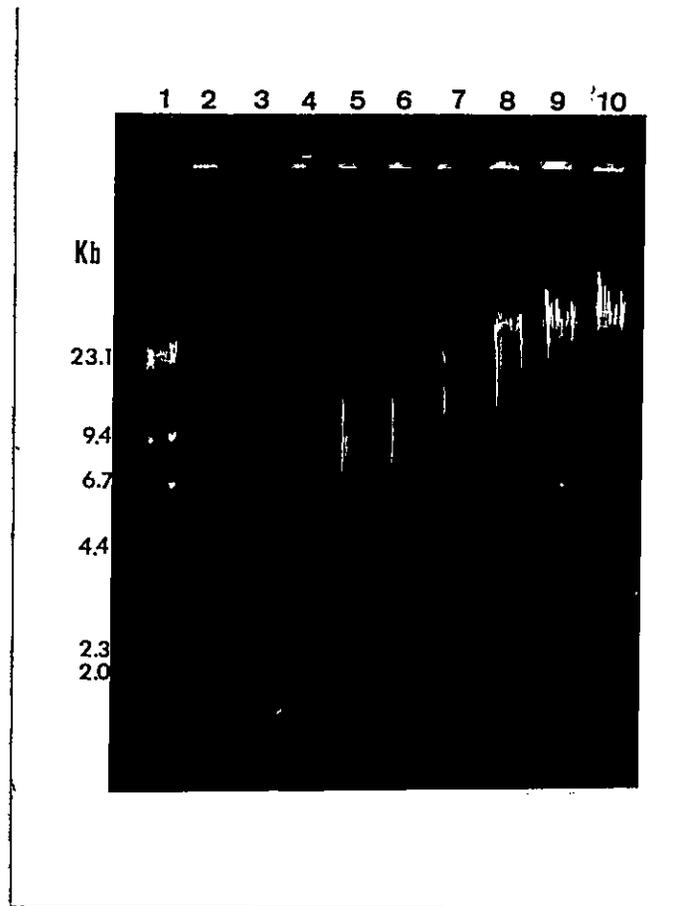


Figura 8. Electroforesis de DNA cromosomal de Lactobacillus casei digerido con BamHI. El DNA cromosomal purificado (Métodos 3.4) fue digerido con BamHI a 37°C durante 30 minutos, y la electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0,7% preparada en tampón TBE, a 60 volts durante 1,5 horas.

- Carril 1 : DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII (320 ng) (marcador de peso molecular)
- Carriles 2 al 9 : DNA cromosomal de L. casei digerido con BamHI, conteniendo cada carril 4 µg de DNA cromosomal, y 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,32 y 0,16 U de BamHI, respectivamente
- Carril 10 : DNA cromosomal de L. casei (4 µg)

5.2 Digestión enzimática del plásmido pBR322.

Se realizó la digestión total del plásmido pBR322 con BamHI, y se desfosforiló con CIAP. Se purificó el plásmido linearizado mediante CTAB, obteniéndose una recuperación aproximada de un 25 a un 30% del plásmido lineal.

5.3 Ligamiento de los fragmentos de restricción BamHI del DNA cromosomal de L. casei al vector pBR322.

La Figura 9 muestra el resultado de ligamiento del vector y los fragmentos de restricción del DNA cromosomal de L. casei empleando diversas proporciones de ambas moléculas de DNA. La proporción óptima encontrada para el ligamiento entre el vector y el DNA cromosomal seleccionada para los experimentos de transformación genética fue de 1:4 (ng) (Figura 10).

5.4 Transformación genética de Escherichia coli DH5 α con DNA de L. casei.

La frecuencia promedio de transformación genética obtenida en diversos ensayos de transformación con la mezcla de ligamiento fue de 2×10^4 clones transformados/ μg de DNA plasmidial. El análisis de restricción BamHI del DNA plasmidial obtenido de colonias transformadas muestra una frecuencia de 2×10^9 colonias transformadas/ μg DNA plasmidial que presentan inserto de DNA cromosomal de

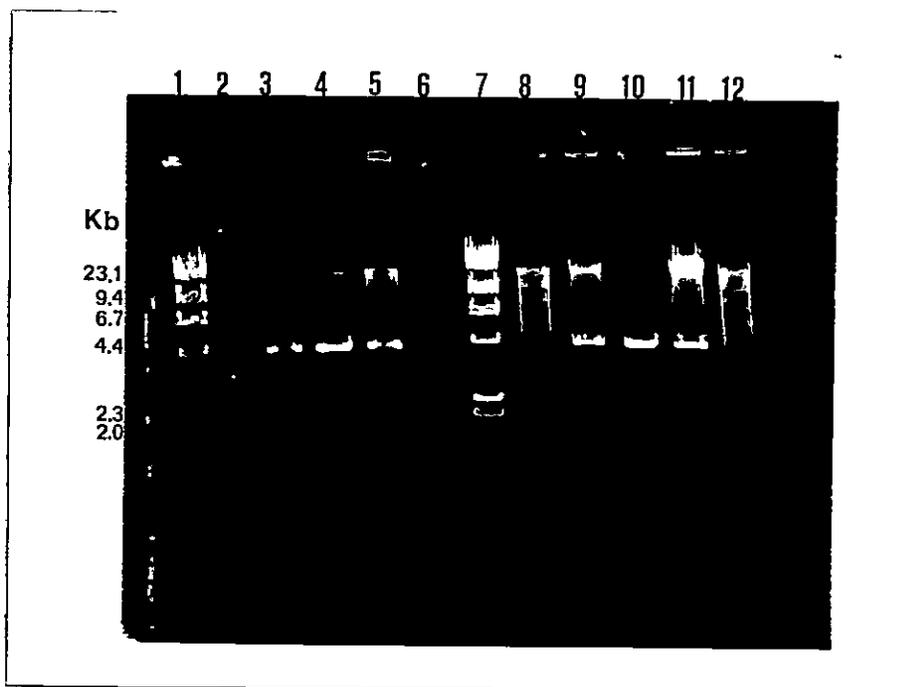


Figura 9. Electroforesis de reacciones de ligamiento entre DNA del plásmido pBR322 y DNA cromosomal de *L. casei*. El DNA de *L. casei* digerido con BamHI (fragmentos de 2 a 23 kb) y pBR322 tratado con BamHI y CIAP, fueron ligados (Métodos 9.1). Se analizó la reacción de ligamiento mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% preparada en tampón TBE, a 60 volts durante 2 horas. Carriles 1 y 7 : DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII (200 ng en cada carril) [marcador de peso molecular]. Carriles 2, 6, 8 y 12 : DNA cromosomal de *L. casei* digerido con BamHI, conteniendo 50, 100, 200 y 300 ng, respectivamente. Carriles 4 y 10 : DNA del plásmido pBR322 digerido con BamHI, conteniendo 50 y 100 ng, respectivamente. Carriles 3 y 5 : ligamiento de DNA cromosomal de *L. casei* (50 y 100 ng, respectivamente), con DNA de pBR322 (50 ng). Carriles 9 al 11 : ligamiento de DNA cromosomal de *L. casei* (200 y 300 ng, respectivamente), con DNA de pBR322 (100 ng).

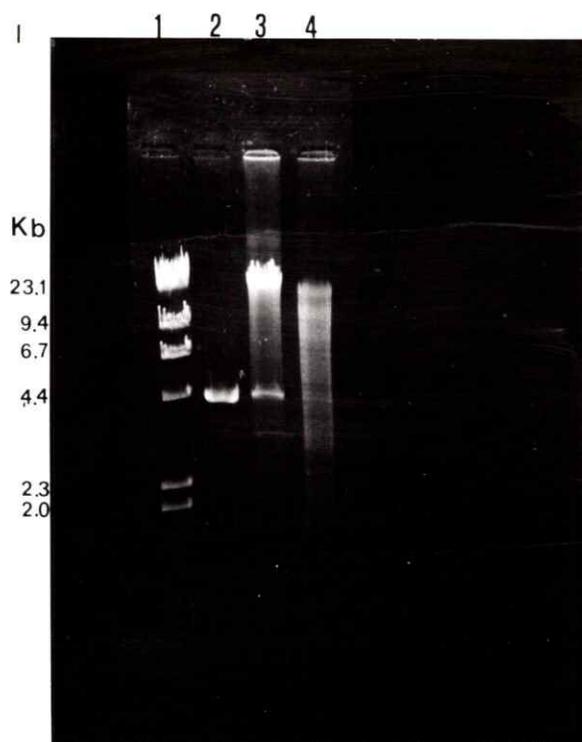


Figura 10. Electroforesis de la reacción de ligamiento de DNA del plásmido pBR322 y DNA cromosomal de L. casei. El DNA de L. casei digerido con BamHI (fragmentos de 2 a 23 kb) y pBR322 tratado con BamHI y CIAP, fueron ligados (Métodos 9.1). Se analizó la reacción de ligamiento mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% preparada en tampón TBE, a 60 volts durante 2 horas.

Carril 1 : DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII (200 ng) (marcador de peso molecular)

Carril 2 : DNA del plásmido pBR322 digerido con BamHI (100 ng)

Carril 3 : ligamiento de DNA cromosomal de L. casei (400 ng), con DNA de pBR322 (100 ng)

Carril 4 : DNA cromosomal de L. casei digerido con BamHI (400 ng).

L. casei. El tamaño máximo de inserto encontrado en estos clones transformados fue de 6 a 7 kb, con un promedio de 3kb (Figura 11).

No obstante, ensayos de medición de la actividad de α -acetolactato descarboxilasa en estos clones transformados dieron resultados negativos.

Considerando la frecuencia de clones transformados que contienen inserto de DNA cromosomal de L. casei, y la longitud promedio de inserto (3 kb, aproximadamente) clonado en el plásmido pBR322, se realizaron ensayos de clonación en pUC19 (Apéndice 7).

Se realizó la digestión total del plásmido pUC19 con BamHI, y se desfosforiló con CIAP. Se purificó el plásmido lineal mediante el método de "glass milk", obteniéndose una recuperación entre un 50 a 60% de plásmido lineal.

5.5 Purificación del DNA cromosomal de L. casei mediante columna de exclusión molecular.

El DNA cromosomal de L. casei, dializado contra tampón TE (Métodos, sección 3.4), fue purificado a través de una columna de exclusión molecular Bio-Gel A 5M. La razón A_{240}/A_{280} fue de 1,88.

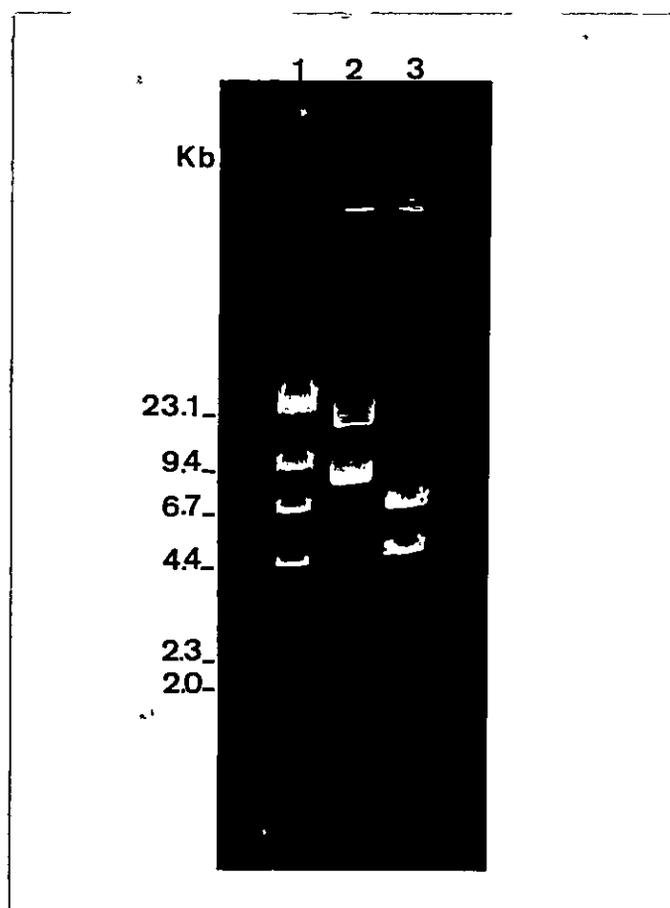


Figura 11. Electroforesis de DNA del plásmido pBR322 conteniendo inserto de DNA cromosomal de L. casei. El DNA plasmidial obtenido a partir de una minipreparación (Métodos 3.2) fue digerido con BamHI (Métodos 7.3). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0,7% preparada en tampón TBE, a 60 volts durante 2,5 horas.

Carril 1 : DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII (200 ng) (marcador de peso molecular)

Carril 2 : DNA plasmidial de clon transformado de E. coli DH5 α (pBR322 con inserto)

Carril 3 : DNA plasmidial de clon transformado de E. coli DH5 α digerido con BamHI.

5.6 Digestión enzimática del DNA cromosomal de L. casei y purificación de fragmentos de restricción.

Con el objeto de obtener una mayor proporción de fragmentos de DNA cromosomal de L. casei entre 2 y 16 kb, se seleccionó la condición de restricción BamHI equivalente a 1,3 unidades de enzima/ μ g de DNA.

Los fragmentos de DNA cromosomal entre 2 kb a 16 kb fueron purificados a partir de un gel de electroforesis mediante el método de "glass milk". La recuperación de los fragmentos de restricción, en relación al porcentaje de recuperación de los plásmidos linearizados por el mismo método fue menor, lográndose aproximadamente un 30%. También se ensayó la purificación de estos fragmentos mediante electroelución, lográndose una recuperación ligeramente inferior respecto a la metodología anterior.

5.7 Ligamiento y transformación de Escherichia coli DH5 α .

La proporción óptima de ligamiento encontrada entre pUC19 y DNA cromosomal de L. casei empleados en las condiciones de ensayo fue 1:4 (ng). La frecuencia de transformación fue aproximadamente de 6×10^4 colonias transformadas/ μ g de DNA plasmidial.

El análisis de restricción BamHI del DNA plasmidial obtenido de colonias que presenta inserto de DNA cromosomal de L. casei muestra una frecuencia de 6×10^3 colonias

transformadas/ μ g de DNA plasmidial.

A partir de clones transformados se aisló el DNA plasmidial y se sometió a digestión con la enzima BamHI con los resultados que se exhiben en la Figura 12. El tamaño promedio calculado a partir de diversos clones transformados fue de 2 kb, aproximadamente.

Dado que los ensayos realizados para detectar la actividad de α -acetolactato descarboxilasa en los clones transformados dieron resultados negativos, se optó por detectar la presencia de una secuencia complementaria en el DNA cromosomal de L. casei, mediante una sonda de DNA heteróloga.

6.- Detección mediante sonda heteróloga de secuencia complementaria de DNA cromosomal de L. casei para la enzima α -acetolactato descarboxilasa.

6.1 Síntesis de la sonda específica del gen que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa.

El fragmento BamHI-HincII de 0,9 kb del plásmido pUA11 portador del gen estructural de la enzima α -acetolactato descarboxilasa fue aislado y purificado mediante el método de "glass milk". Se obtuvo una recuperación de un 60%, aproximadamente. La sonda específica se sintetizó mediante el método de extensión de partidor ("random primers") utilizando [α -³²P] dCTP. El porcentaje de incorporación de

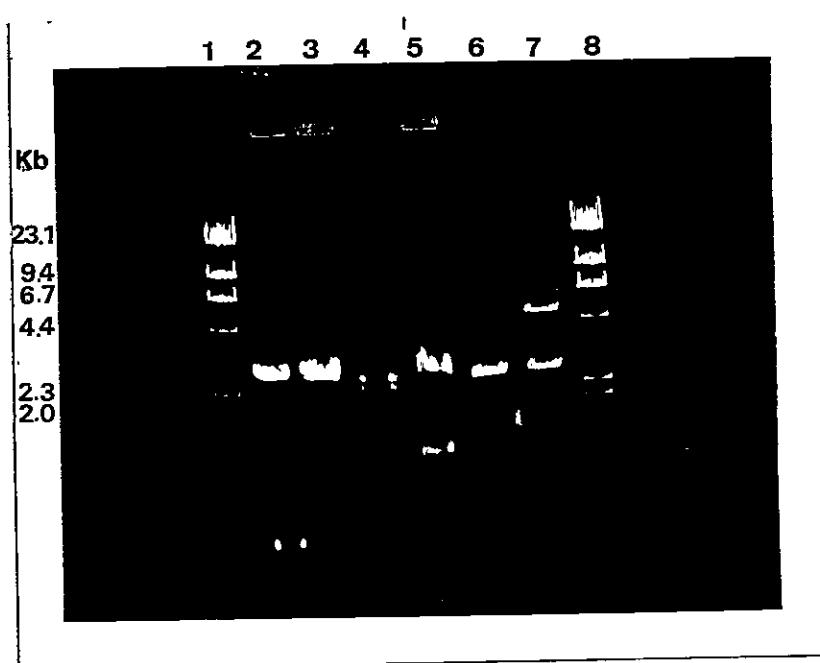


Figura 12. Electroforesis de DNA del plásmido pUC19 conteniendo insertos de DNA cromosomal de *L. casei*. El DNA plasmidial obtenido a partir de una minipreparación (Métodos 3.2) fue digerido con BamHI (Métodos 7.3). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0,7% preparada en tampón TBE, a 60 volts durante 2 horas.

- Carriles 1 y 8 : DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII (200 ng en cada carril) (marcador de peso molecular)
- Carriles 2, 3, 4, 5 y 7: DNA plasmidial de clones transformados de *E. coli* DH5α digeridos con BamHI
- Carril 6 : DNA del plásmido pUC19 digerido con BamHI.

radioactividad de la sonda, en cada uno de los 2 ensayos de incorporación, fue de un 39,7% (sonda 1), y de un 37,6% (sonda 2). La actividad específica de cada sonda fue de $3,6 \times 10^{10}$ c.p.m./ μ g de DNA (sonda 1), y de $2,0 \times 10^{10}$ c.p.m./ μ g de DNA (sonda 2).

6.2 Hibridación DNA:DNA.

En la Figura 13A se observa una zona de hibridación específica del DNA cromosomal de L. casei digerido con la enzima EcoRI con la sonda heteróloga (sonda 1) para el gen que codifica para la α -acetolactato descarboxilasa de E. aerogenes. La posición de la banda de hibridación con la sonda heteróloga, correspondería a una zona del gel que contendría fragmentos EcoRI del DNA cromosomal de L. casei entre los 2,8 a 3 kb. En cambio, en la Figura 13B se observan diversas zonas de hibridación específicas del DNA cromosomal de L. casei digerido con la enzima BamHI con la sonda heteróloga (sonda 2) para el gen que codifica para la α -acetolactato descarboxilasa. La posición de cada una de las bandas de hibridación con la sonda heteróloga corresponden a fragmentos de 3,1, 2,5, 1,1 y 0,5 kb, aproximadamente.

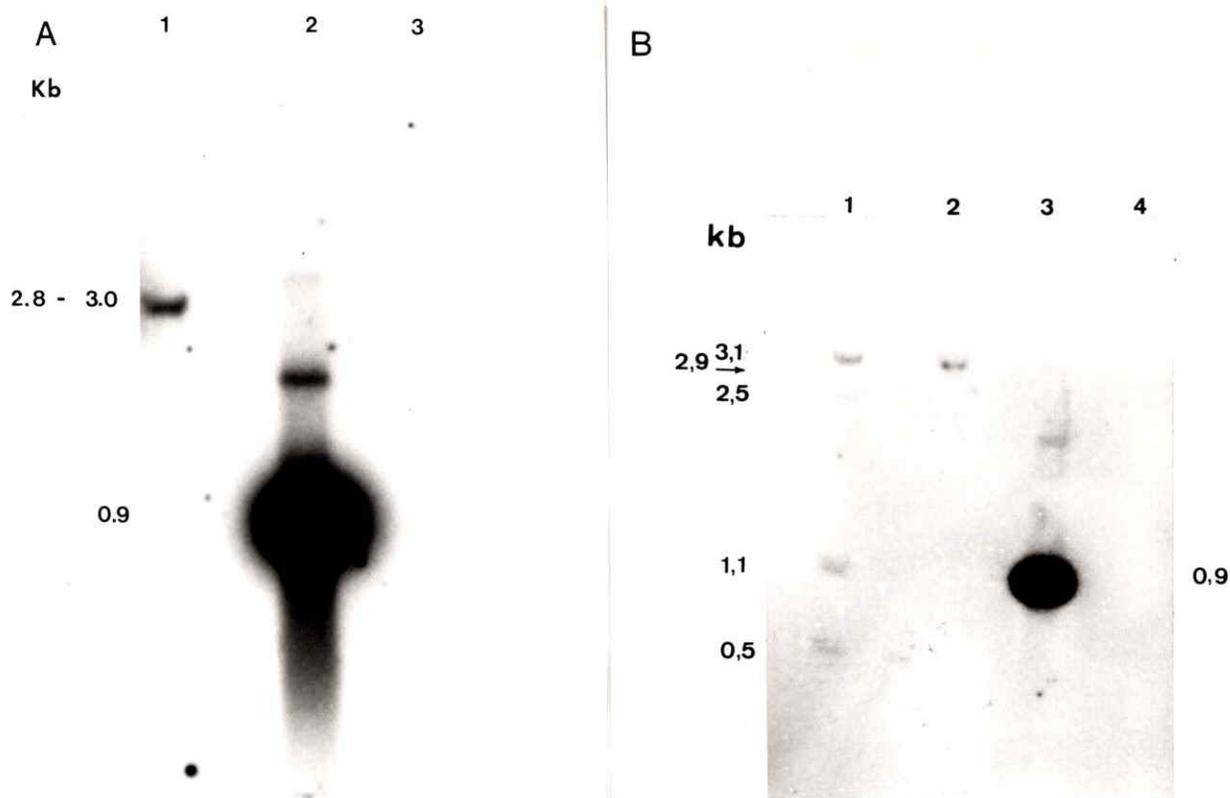


Figura 13.

Autorradiografía de hibridación de DNA cromosomal de Lactobacillus casei con sonda heteróloga marcada con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP. La sonda fue preparada a partir del fragmento BamHI-HincII de 0,9 kb, que contiene la secuencia estructural del gen α -ALDC, de E. aerogenes mediante "random primers".

A.- Carril 1 : DNA cromosomal de L. casei digerido con EcoRI (15 a 20 μg). Carril 2 : fragmentos de DNA de E. aerogenes (6 a 8 ng) (control positivo). Carril 3 : DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII (600 ng) (control negativo)

B.- Carril 1 : DNA cromosomal de L. casei digerido con BamHI (15 a 20 μg). Carril 2 : DNA cromosomal de L. casei digerido con EcoRI (15 a 20 μg). Carril 3 : fragmentos de DNA de E. aerogenes (6 a 8 ng). Carril 4 : DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII (600 ng).

7.- Caracterización morfológica y fisiológica de Saccharomyces uvarum.

Se realizó una caracterización parcial de S. uvarum en forma comparativa con S. cerevisiae AB1380. Los resultados presentados en la Tabla 8 muestran diferencias morfológicas entre estas dos levaduras. Lo más significativo de este análisis es la reducida a casi nula tasa de esporulación de S. uvarum, característica compartida por las levaduras poliploides de uso industrial.

8.- Análisis del genoma de S. uvarum mediante electroforesis de campo pulsado.

Se realizó la electroforesis de campo pulsado del DNA cromosomal de S. uvarum y de S. cerevisiae AB1380. En la Figura 14 se observan las 16 bandas de DNA tipo cromosomal de S. cerevisiae AB1380 con los siguientes tamaños moleculares: cromosoma XII, IV, VII-XV, XIII-XVI, II, X-XIV, XI, V-VIII, IX, III, VI y el I, con tamaños moleculares de 2,2, 1,6, 1,125, 1,02, 0,85, 0,785, 0,7, 0,63, 0,46, 0,32, 0,29 y 0,245 Mb, respectivamente. En S. uvarum se observa un polimorfismo de longitud cromosomal diferente al de S. cerevisiae AB1380. Además, se observa una mayor intensidad en algunas bandas de DNA tipo cromosomal, respecto a la intensidad de bandas en S. cerevisiae AB1380.

TABLA 8

Caracterización morfológica y fisiológica de S. uvarum

Carácter	<u>S. cerevisiae</u>	<u>S. uvarum</u>
Forma celular	ovalada	esférica
Tamaño celular (µm)	3-5	8-10
¹ Gemación	polar	multipolar
¹ Tipo de agrupación	individual	seudomicelios
² Esporulación	(-)	reducida a nula
³ Frecuencia de mutantes petite (%)	2-3	2-3
⁴ Tiempo de duplicación (hr)	≈2,5	≈4,5-5

¹Determinado por crecimiento de la cepa en caldo YMPG.

²Se realizó mediante cultivo de la cepa en medio Mc Clary's.

³Cuantificado en medio adicionado de cloruro de trifenil tetrazolium.

⁴Se determinó la D.O._{600nm} y el recuento celular a partir de cultivo en caldo YMPG a 28°C

(-) No determinada debido a su carácter haploide.

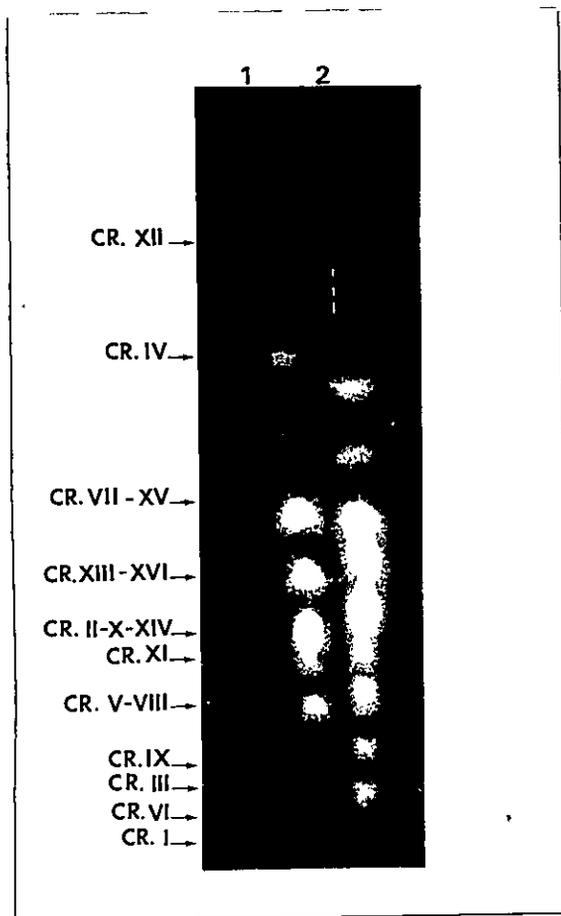


Figura 14. Electroforesis de campo pulsado (CHEF) de DNA cromosomal de Saccharomyces cerevisiae AB1380 y Saccharomyces uvarum. La electroforesis fue realizada en geles de agarosa al 1% en tampón TBE, a 180 volts durante 24 horas.

Carril 1 : DNA tipo cromosomal de S. cerevisiae AB1380 (cromosoma XII, IV, VII-XV, XIII-XVI, II, X-XIV, XI, V-VIII, IX, III, VI y I, con tamaño molecular de 2,2, 1,6, 1,125, 1,02, 0,85, 0,785, 0,70, 0,63, 0,46, 0,32, 0,29 y 0,245 Mb, respectivamente)

Carril 2 : DNA tipo cromosomal de S. uvarum.

DISCUSION.

Sin duda, la manipulación genética de levaduras industriales es un problema extraordinariamente complejo. En tal sentido, parece conveniente indicar que, en vista de la falta de caracterización del sistema genético de S. uvarum, la experimentación sobre la incorporación y expresión de genes que codifican para la α -acetolactato descarboxilasa en S. cerevisiae es una estrategia posible.

La integración del gen proveniente de E. aerogenes en el vector pAAR6 permitió expresar esta información genética en S. cerevisiae, con un nivel de actividad enzimática similar a lo obtenido por transformación genética de E. coli, bajo condiciones de ensayo semejantes.

En relación a las cepas de E. coli empleadas para los ensayos de transformación genética, se pudo constatar que la cepa E. coli DHS α permite obtener una mayor eficiencia de transformación. Esta cepa posee el gen rec A1, el cual impide el reordenamiento genético de los plásmidos por recombinación homóloga (Broach, J. R. et al. 1991), evitándose los problemas de alteración de la expresión génica por pérdida o interrupción del gen clonado en el plásmido.

La obtención de células competentes de E. coli DH5 α mediante tratamiento con cloruro de rubidio permitió aumentar la eficiencia de transformación por un factor cercano a 10 respecto al tratamiento con cloruro de calcio.

En cuanto a levaduras, la cepa S. cerevisiae AB1380 fue seleccionada por su carácter haploide, lo cual facilita el análisis de la estabilidad genética de los transformantes y, por su carácter de multiauxotrofia, que permite la selección de clones transformantes por complementación. Otra característica genética importante de esta cepa para los experimentos de transformación es su genotipo, que hace posible que determinantes citoplasmáticos aumenten la supresión de mutaciones "ocre" en el DNA exógeno (Burke, D. T et al 1991).

En relación a la disponibilidad de genes codificadores de α -acetolactato descarboxilasa, varios de ellos ya han sido clonados a partir de especies bacterianas. Sin embargo, debido a las restricciones para disponer de este material genético dado su interés industrial, se optó por trabajar, inicialmente, con el gen proveniente de E. aerogenes.

No obstante, considerando la limitante de utilizar genes provenientes de una enterobacteria en la industria alimenticia, se intentó clonar el gen para la α -acetolactato descarboxilasa de Lactobacillus casei.

Los resultados parciales obtenidos inicialmente se

debieron, probablemente, a que esta bacteria se caracteriza por la alta producción de polisacáridos en los medios de cultivo recomendados para su crecimiento. Estos polisacáridos forman complejos con el DNA cromosomal que dificultan la acción de las enzimas de restricción. No obstante, al cultivar esta bacteria en medio mínimo salino se logró obtener una preparación de DNA cromosomal adecuada para los ensayos de clonación molecular.

El enfoque experimental consistió en clonar el gen a partir de una genoteca construida en el vector pBR322, y posteriormente en el plásmido pUC19. Se utilizó la enzima BamHI en la construcción de ambas genotecas, ya que, permite seleccionar clones transformados por resistencia a la ampicilina y sensibilidad a la tetraciclina por inactivación insercional. En general, en ambos sistemas el número de clones transformados conteniendo un fragmento de DNA cromosomal de L. casei fue bajo, con un tamaño promedio de inserto de 2 a 4 kb. Probablemente, un factor importante a considerar lo constituyó la alta proporción de fragmentos de restricción de DNA cromosomal superior a 8 kb, en relación a los fragmentos de menor tamaño en la mezcla de ligamiento.

Detección de secuencia complementaria del gen para α -acetolactato descarboxilasa en L. casei mediante sonda heteróloga.

Los resultados de hibridación del DNA cromosomal de L. casei con las sondas heterólogas para el gen de α -acetolactato descarboxilasa obtenida de E. aerogenes permitieron detectar en las autorradiografías una o más bandas de DNA cromosomal de L. casei que contienen secuencias complementarias para una parte, o la totalidad, del gen que codifica para dicha enzima.

En efecto, considerada la estrictez del ensayo de hibridación (formamida al 50% e hibridación a 42°C), la especificidad estructural de la sonda empleada que corresponde, aproximadamente a un 87% de identidad respecto a la secuencia codogénica estructural para la α -acetolactato descarboxilasa, el tamaño de los fragmentos de DNA con los genes clonados de E. aerogenes y de E. brevis (1,4 kb y 1,3 kb, respectivamente), y las posibles secuencias regulatorias, se puede pensar que las bandas de hibridación observadas (Figura 13A y 13B) corresponden a la secuencia complementaria del gen para la α -acetolactato descarboxilasa en L. casei.

Integración del gen que codifica para la enzima α -acetolactato descarboxilasa en el plásmido pAAR6.

La elección del plásmido pAAR6 puede considerarse adecuada pues es un vector que se expresa en E. coli, debido a que presenta el origen de replicación de pBR322, y en S.

cerevisiae al tener una secuencia de replicación autónoma (ARS1). Además, contiene el marcador de selección bla que permite el aislamiento de clones transformados de E. coli en medio selectivo y el gen trp-1 que permite la selección de transformantes en S. cerevisiae por complementación de la auxotrofia para dicho aminoácido. Otro aspecto importante que se tuvo en consideración para la selección de este plásmido es que contiene la secuencia promotora del gen de la alcohol deshidrogenasa de levadura (ADC1), cuya expresión es altamente eficiente y de naturaleza constitutiva.

En atención a que el plásmido pAAR6 contiene un único sitio de clonación EcoRI se ensayó inicialmente, la adición de "linker" EcoRI al fragmento de 1,4 kb BamHI-EcoRV que contiene el gen para la α -acetolactato descarboxilasa. Sin embargo, el análisis de restricción EcoRI del DNA plasmidial de los clones transformados reveló la presencia de una única banda, de 7,9 kb, aproximadamente, sin el inserto esperado.

Este inconveniente fue subsanado mediante la adición de "linker" EcoRI al plásmido pUA11 tratado con la enzima EcoRV. El ligamiento posterior del fragmento EcoRI-EcoRI de 1,4 kb al vector pAAR6 hizo posible la transformación de E. coli DH5 α .

El análisis de la tasa de crecimiento de los clones transformados en medio selectivo, respecto a la cinética de

crecimiento de colonias transformadas de E. coli DH5 α con el plásmido pAAR6, reveló que los primeros presentan un menor tiempo de duplicación. Ello se debe probablemente a la presencia de un plásmido de mayor tamaño que el plásmido original en los clones transformados.

Expresión del gen para la α -acetolactato descarboxilasa en E. coli DH5 α y S. cerevisiae AB 1380.

La eficiencia de transformación de E. coli DH5 α con el plásmido pUA11 fue similar al control experimental empleando el plásmido pUC19. Este resultado estaría indicando que el tamaño del inserto clonado en pUC12 no altera la eficiencia, como asimismo, la expresión del gen para la α -acetolactato descarboxilasa de acuerdo a los resultados de medición de la actividad enzimática en los clones transformados.

Si se compara la eficiencia de transformación de E. coli con este plásmido, respecto a la eficiencia de transformación observada cuando se transforma E. coli con el plásmido pAAR6, se aprecia una disminución por un factor cercano a 10. Este resultado es coincidente con estudios de eficiencia de transformación de E. coli con DNA plasmidial de diverso tamaño (Hanahan, D. 1983).

El patrón electroforético del DNA plasmidial recuperado de diversos clones de E. coli DH5 α transformados, además de presentar movilidad electroforética diferente a la del

plásmido control, muestra también una cierta disimilitud entre estos clones. Ello puede deberse a que en un plásmido pueda haber existido más de un evento de inserción de fragmentos EcoRI-EcoRI de 1,4 kb, como también a la posibilidad de ligamiento de 2 plásmidos (Figura 4A).

Los plásmidos obtenidos de los clones de E. coli DH5 α transformados, digeridos con la enzima EcoRI, muestran la presencia de una banda de DNA de 7,9 kb que correspondería al plásmido pAAR6 y otra banda de DNA de 1,4 kb, que correspondería al fragmento de DNA de igual tamaño clonado en el sitio EcoRI del plásmido pAAR6.

Todos los clones transformados con el plásmido pAAR6 portador del inserto de 1,4 kb presentaron actividad de α -acetolactato descarboxilasa. La cuantificación de esta actividad enzimática permitió distinguir un grupo mayoritario de clones (66%) que presentaron alta actividad enzimática respecto al control (clon transformado de E. coli DH5 α con el plásmido pUA11) con una actividad enzimática promedio de 31%, y un grupo menor de clones con una actividad enzimática promedio equivalente a un 11%. Esta diferencia en los niveles de actividad enzimática puede deberse, ya sea, a la orientación del inserto respecto a la secuencia promotora del gen ADC1 o al número de copias del fragmento de 1,4 kb insertos en el plásmido pAAR6. Si se considera que el fragmento clonado contiene las secuencias

necesarias para la expresión del gen para la α -acetolactato descarboxilasa en E. coli, este se expresaría independientemente de su sentido de integración en el vector plasmidial, respecto al promotor del gen ADC1. Por lo tanto, la mayor actividad enzimática observada, probablemente se deba al número de copias del fragmento de 1,4 kb presente en el plásmido pAAR6.

Si se compara ahora el porcentaje de actividad enzimática promedio del total de clones transformados de E. coli DH5 α con el plásmido pAAR6 conteniendo el fragmento de 1,4 kb (20,3%), respecto a E. coli DH5 α transformada con el plásmido pUA11 (100%), se puede observar que ésta última presenta una actividad aproximada 5 veces mayor. Si se considera el número de copias de los plásmidos pUC (200 copias por célula, aproximadamente), en relación al número de copias de plásmidos conteniendo el origen de replicación de pBR322 (60 copias por célula, aproximadamente) (Sambrook, J. et al. 1989)), probablemente esta diferencia de actividad enzimática se deba al número de copias del gen para la α -acetolactato descarboxilasa presente en la célula.

La eficiencia de transformación genética de S. cerevisiae AB1380 con DNA plasmidial de 3 de los clones transformados de E. coli DH5 α con mayor actividad enzimática, fue similar. Esta eficiencia de transformación de levadura con acetato de litio se corresponde con los

valores de eficiencia esperados para plásmidos derivados de YRp7 (Struhl, K. et al. 1979). Además, el tiempo de duplicación promedio estimado de los clones transformados de S. cerevisiae AB1380 fue superior al tiempo de duplicación de la cepa no transformada. Este resultado estaría indicando, de manera indirecta, la presencia de DNA plasmidial en estos clones, tal como ha sido informado por Hsiao, Ch. et al. 1979 y Cifuentes, V. H. 1988 en S. cerevisiae.

La confirmación experimental de la presencia de DNA plasmidial en los clones transformados de S. cerevisiae AB1380 se realizó mediante retrotransformación de E. coli DH5 α . La eficiencia promedio de transformación fué de 2×10^9 colonias transformadas/ μ g de DNA de levadura. Esta menor eficiencia obtenida respecto a la observada cuando se transformó E. coli DH5 α con la mezcla de ligamiento de pAAR6 con el fragmento de 1,4 kb ($2,0 \times 10^{10}$ colonias transformadas/ μ g de DNA plasmidial) se debe, probablemente a la presencia de algún compuesto químico liberado al medio extracelular durante la preparación de DNA de levadura que disminuye la eficiencia de incorporación del plásmido en E. coli (Strathern, J. N. et al. 1991). Probablemente, componentes de la pared celular de levadura liberados durante la lisis celular, como son los β 1-3 glucanes, interfieren con el proceso de transformación de E. coli al

formar complejos con el DNA plasmidial, y así podrían disminuir la eficacia del proceso (Strathern, J. N. et al. 1991).

El análisis de digestión del DNA plasmidial de estos clones transformados de E. coli DH5 α con la enzima EcoRI, reveló la presencia del inserto de 1,4 kb. Una prueba adicional de la presencia de inserto en pAAR6 se obtuvo por digestión del DNA plasmidial de estos clones transformados con la enzima EcoRV (Figura 6). En los clones transformados con el plásmido híbrido se observa un fragmento EcoRV-EcoRV de 2,7 kb que corresponde, a la inserción del fragmento de 1,4 kb entre los sitios EcoRV del promotor (P) del gen ADC1, y del fragmento de 0,45 kb de pBR322 en el plásmido pAAR6.

La cuantificación de la actividad enzimática en los clones transformados de S. cerevisiae AB1380 respecto al control, demostró también la presencia de actividad de α -acetolactato descarboxilasa. Las diferencias en los niveles de actividad enzimática medida en extracto acelular y después de la permeabilización de las células con cloroformo-SDS, respecto a la permeabilización de éstas con tolueno-sarcosil, probablemente reflejen la eficiencia de cada una de estas metodologías. En los procedimientos anteriormente señalados debe tenerse en cuenta la composición de la pared celular en levaduras, la cual representa aproximadamente un 30% del peso seco de ésta. La

composición de la pared celular consiste, mayoritariamente en polisacáridos y glicoproteínas. El porcentaje calculado de lisis celular mediante microscopía óptica fue, aproximadamente, de un 60 a 70%, y la actividad enzimática se cuantificó en el sobrenadante del extracto acelular pudiendo quedar parte de la enzima asociada a la fracción particulada.

En relación a los dos métodos de permeabilización celular empleados, se puede pensar que el tratamiento más eficaz resulta de la combinación de tolueno, y el agente desnaturante sarcosil.

Al comparar los valores promedio de unidades de actividad enzimática del grupo de clones transformados de E. coli DHSx con mayor actividad enzimática (0,084 unidades), con aquella para clones transformados de S. cerevisiae AB1380 en extracto acelular y células permeabilizadas con cloroformo-SDS a 37°C (0,090 unidades), se observa una actividad enzimática similar. Ello no ocurre así cuando se comparan los niveles de actividad enzimática con clones transformados de S. cerevisiae AB1380 permeabilizados con tolueno-sarcosil (0,139 unidades). Esta diferencia de actividad enzimática encontrada en ambos organismos permeabilizados con tolueno, probablemente refleje un mayor nivel de expresión génica del gen para la α -acetolactato descarboxilasa en levadura a partir del promotor del gen

ADC1 de levadura. Lo anterior no descarta también la posibilidad de considerar diferencias en el número de copias del plásmido con inserto en ambos sistemas biológicos. Ahora, si se analiza la diferencia en unidades de actividad enzimática encontrada entre el clon transformado de S. cerevisiae AB1380 permeabilizado con tolueno-sarcosil (0.139 unidades), y el clon transformado de E. coli DH5 α con el plásmido pUA11 permeabilizado con tolueno (0.276 unidades), puede reflejar diferencias en el número de copias del gen en ambos organismos. Al respecto, es importante señalar la eficiencia del promotor del gen ADC1 de S. cerevisiae para la expresión de información genética heteróloga, como asimismo, la presencia de la secuencia de término de transcripción del gen ADC1 para la producción de una proteína con actividad (Hitzeman, R. A. et al. 1981; Bennetzen, J. L et al. 1982; Thomsen, K. K. et al. 1988; Cai, D. et al. 1994; Heidmann, S. et al. 1994).

La actividad de la enzima α -acetolactato descarboxilasa cuantificada en clones transformados de S. cerevisiae AB1380 permeabilizados con cloroformo-SDS y tolueno-sarcosil fue similar, cuando se incubó la mezcla de reacción a 28°C (temperatura óptima de crecimiento para esta levadura) y a 37°C (temperatura a la cual se realiza el ensayo enzimático en E. coli DH5 α). Este resultado muestra que la actividad enzimática no cambia con las temperaturas de incubación

utilizadas.

Estabilidad genética del gen de E. aerogenes para α -acetolactato descarboxilasa en cepas transformadas de S. cerevisiae AB1380.

El vector de clonación utilizado pAAR6 posee una secuencia de replicación autónoma (ARS1) proveniente del plásmido YRp7, lo que permite mantener un alto número de copias en levadura, pero se caracteriza por una inestabilidad mitótica cercana al 1% por generación. La estabilidad mitótica estimada en clones transformados de S. cerevisiae AB1380 fue de un 1,2% por generación, aproximadamente. Este porcentaje de inestabilidad mitótica aumentó durante las próximas 40 generaciones hasta alcanzar aproximadamente entre un 25 a 28% de estabilidad en medio de cultivo no selectivo.

La correlación de pérdida de DNA plasmidial y ausencia de actividad de α -acetolactato descarboxilasa en las colonias transformadas en medio de cultivo sin presión selectiva, muestran la concordancia entre el comportamiento del DNA plasmidial y la actividad enzimática asociada.

Si se considera que el tiempo de generación promedio de estos clones transformados es cercano a 3,7 horas (Tabla 5), que el porcentaje de células que presentan plásmido durante 40 generaciones de cultivo sin presión selectiva y actividad

enzimática asociada es de un 25 a 28% (Figura 7), como asimismo, la estabilidad térmica de la enzima α -acetolactato descarboxilasa, y el tiempo promedio de fermentación primaria en el proceso de elaboración de cerveza (5 días) (Godtfredsen, S. E. et al. 1984), se podría pensar que colonias transformadas de S. uvarum con el gen para la α -acetolactato descarboxilasa podrían disminuir los niveles de diacetilo en un 40%, aproximadamente durante el proceso de fermentación primaria.

Caracterización morfológica y molecular de Saccharomyces uvarum.

Existen diferencias de tipo morfológico y fisiológico entre S. uvarum y S. cerevisiae AB1380, siendo quizás la más importante la reducida a casi nula tasa de esporulación encontrada en S. uvarum. Esta es una propiedad característica de las levaduras empleadas en la industria cervecera (Johnston, J. R. 1990). La explicación más probable para este fenómeno es debido a la ploidía de estas levaduras que, de producir ascosporas, sean desequilibradas desde el punto de vista de su constitución genética (Johnston, J. R. 1990).

El análisis electroforético del DNA tipo cromosomal en S. uvarum muestra un polimorfismo de longitud de cromosomas diferente al polimorfismo de S. cerevisiae AB1380. Además,

la intensidad de algunas de las bandas en el gel de S. uvarum, bajo similares condiciones experimentales que S. cerevisiae AB1380, indirectamente evidencian una condición de ploidía en esta levadura. Análisis densitométrico e hibridación Southern con sondas específicas para ciertos cromosomas permitirá una mejor caracterización del genoma de S. uvarum.

CONCLUSIONES

1.- Ha sido posible demostrar que el gen de α -acetolactato descarboxilasa de E. aerogenes se expresa tanto en E. coli DH5 α como en S. cerevisiae AB1380.

2.- Se obtuvo una menor eficiencia de transformación genética en E. coli DH5 α con el plásmido pAAR6 conteniendo el inserto de 1,4 kb, respecto a la eficiencia observada en E. coli DH5 α con el plásmido control (pAAR6 sin inserto).

3.- Los clones de E. coli DH5 α transformados con el plásmido pAAR6 conteniendo el inserto de 1,4 kb presentan diferentes niveles de actividad α -acetolactato descarboxilasa.

4.- La eficiencia de transformación de S. cerevisiae AB1380 con el plásmido conteniendo el inserto de 1,4 kb, respecto a clones de S. cerevisiae AB1380 transformados con el plásmido control (pAAR6 sin inserto), fue similar.

5.- Se obtuvo una mayor actividad α -acetolactato descarboxilasa en clones de S. cerevisiae AB1380 transformados con el plásmido pAAR6 conteniendo el inserto de 1,4 kb, respecto a clones de E. coli DH5 α transformados con el mismo plásmido, bajo similar condición experimental.

6.- Existe correlación entre la pérdida de DNA plasmidial y la ausencia de actividad α -acetolactato descarboxilasa en clones transformados de S. cerevisiae AB1380 con el plásmido pAAR6 portador del inserto de 1,4 kb, en medio de cultivo sin presión selectiva.

7.- El tiempo de duplicación de clones de S. cerevisiae AB1380 transformados con el plásmido pAAR6 conteniendo el inserto de 1,4 kb, respecto a clones transformados con el plásmido control (pAAR6 sin inserto), fue mayor.

8.- La banda de hibridación específica entre el DNA cromosomal de L. casei con la sonda heteróloga de E. aerogenes, indicaría la presencia de un gen homólogo para la enzima α -acetolactato descarboxilasa en esta bacteria.

9.- Diferencias en cuanto a polimorfismo de longitud de DNA tipo cromosomal e intensidad de algunas bandas específicas observada mediante electroforesis de campo pulsado se encontró, tanto en S. cerevisiae AB1380 como en S. uvarum.

PROYECCION

Teniendo en consideración los resultados experimentales logrados con la expresión del gen para la α -acetolactato descarboxilasa en S. cerevisiae, la proyección de este estudio debería dirigirse a subclonar la unidad de expresión en el vector pSC3.13i y transformar un cultivo de S. uvarum. Este es un vector episomal derivado de pYE13 que se caracteriza por una alta frecuencia de transformación, su estabilidad mitótica, su alto número de copias, y por tener el gen que confiere resistencia para la cicloheximida que permite la selección de clones transformados de S. uvarum. En los clones transformados se cuantificaría la actividad α -acetolactato descarboxilasa.

Posteriormente, se puede clonar la unidad de expresión en el plásmido pDY3 (Thomsen, K. K. et al. 1988), que es un plásmido de expresión integrativo, y transformar un cultivo de S. uvarum. Se esperaría obtener clones transformados que expresen en forma estable la actividad α -acetolactato descarboxilasa.

En relación a la actividad de esta enzima detectada en L. casei y a la banda específica de hibridación encontrada con la sonda empleada, se debería purificar los fragmentos de restricción EcoRI o BamHI entre los 2,5 a 3,5 kb del DNA cromosomal de L. casei, y clonar éstos en plásmidos convencionales para transformar E. coli DH5 α . De acuerdo a los resultados de actividad enzimática encontrado se procedería a realizar su mapa de restricción, para subclonar el fragmento de menor tamaño que conserve la actividad enzimática. Posteriormente, se caracterizaría el gen (secuencias regulatorias y secuencia codogénica estructural). Se ensayaría la clonación del fragmento conteniendo el gen en un vector de expresión integrativo, y se realizaría la transformación de S. uvarum.

APENDICE 1

1.- Caldo Elliker

Triptona	20	g/lit
Extracto de levadura	5	g/lit
Gelatina	2,5	g/lit
D (+) Glucosa	5	g/lit
Lactosa	5	g/lit
Sacarosa	5	g/lit
Cloruro de sodio	4	g/lit
Acetato de sodio	1,5	g/lit
Acido ascórbico	0,5	g/lit
Ajustar a pH 6,8 con NaOH		

2.- Caldo MRS

Peptona	10	g/lit
Extracto de carne	10	g/lit
Extracto de levadura	5	g/lit
D (+) Glucosa	20	g/lit
Fosfato disódico	2	g/lit
Tween 80	1	g/lit
Citrato triamónico	2	g/lit
Acetato de sodio	5	g/lit
Sulfato de magnesio	100	mg/lit
Sulfato de manganeso	50	mg/lit
Ajustar a pH 6,5 con NaOH		

3.- Caldo Sigma

Triptona	20	g/lt
Extracto de levadura	5	g/lt
Cloruro de potasio	0,74	g/lt
Ajustar a pH 7,6 con KOH 1M		
Autoclavar a 121°C por 15 min		
Agregar Sulfato de magnesio al 8% 50 ml/lt		

4.- Caldo YMPG

Extracto de levadura	3	g/lt
Extracto de malta	3	g/lt
Peptona	5	g/lt
D (+) Glucosa	10	g/lt
Ajustar a pH 5 - 6 con HCl		
Autoclavar a 121°C por 15 min		

5.- Medio LB

Cloruro de sodio	5	g/lt
Triptona	10	g/lt
Extracto de levadura	5	g/lt
Para medio sólido agregar agar - agar al 1,5%		

6.- Medio Mc Clary's

Acetato de potasio	10	g/lt
Extracto de levadura	2,5	g/lt
Glucosa	1,0	g/lt

7.- Medio Mínimo Salino

Fosfato monoácido de potasio	7	g/lt
------------------------------	---	------

Fosfato diácido de potasio	3	g/lt
Citrato trisódico	5	g/lt
Sulfato de magnesio	100	mg/lt
Sulfato de amonio	1	g/lt
D (+) Glucosa	10	g/lt
Extracto de levadura	5	g/lt
Triptona	5	g/lt
Mezcla salina I	1	ml/lt
Mezcla salina II	200	µl/lt

8.- Medio SC

Base de de nitrógeno para levadura	6,7	g/lt
D (+) Glucosa	20	g/lt

Para medio sólido agregar agar-agar al 2%

9.- Medio SOB

Triptona	20	g/lt
Extracto de levadura	5	g/lt
Cloruro de sodio	0,5	g/lt
Cloruro de potasio 250 mM	10	ml/lt
Ajustar a pH 7 con NaOH 5N, y agregar:		
Sulfato de magnesio 2M	20	ml/lt
Cloruro de magnesio 2M	5	ml/lt
Agar - agar	15	g/lt

10.- Medio SOC

Triptona	20	g/lt
Extracto de levadura	5	g/lt

Cloruro de sodio	0,5 g/lt
Cloruro de potasio 250 mM	10 ml/lt
Ajustar a pH 7 con NaOH 5N, y agregar:	
Sulfato de magnesio 2M	20 ml/lt
Cloruro de magnesio 2M	5 ml/lt
Autoclavar a 121°C por 15 min, y adicionar:	
D (+) Glucosa 1M	20 ml/lt

11.- Medio YEP

Extracto de levadura	10 g/lt
Peptona	20 g/lt
D (+) Glucosa	20 g/lt
Agar - agar	20 g/lt

12.- Solución TfB1

Cloruro de rubidio	12,1 g/lt
Cloruro de manganeso	9,9 g/lt
Acetato de potasio	2,9 g/lt
Cloruro de calcio	1,1 g/lt
Glicerol 87%	172,4 ml/lt
Ajustar a pH 5,8 con acetato de sodio 0,2M	

13.- Solución TfB2

MOPS pH 7,0	100 ml/lt
Cloruro de rubidio	1,2 g/lt
Cloruro de calcio	8,3 g/lt
Glicerol 87%	172,7 ml/lt

APENDICE 2

1.- Activación de bolsa de diálisis

Se sumerge la bolsa de diálisis (largo de 10 a 20 cm) en 300 a 400 ml de solución de NaHCO_3 2% (p/v), 1 mM EDTA pH 8,0, y se hierve durante 10 minutos. Se lava tres veces sucesivas con agua destilada. Se sumerge en una solución de EDTA 1 mM pH 8,0, y se hierve durante 10 minutos. Se enfría la solución y se elimina. Se guarda la bolsa de diálisis en solución EDTA 1 mM pH 8,0 a 4°C.

2.- Fenol : cloroformo : alcohol isoamílico

Se funde el fenol a 68°C y se agrega 8-hidroxiquinolina a concentración final de 1%. Se satura el fenol con una solución de Tris-HCl 1M pH 8,0. Se recupera la fase fenólica y se realizan dos extracciones con una solución Tris-HCl 0,5M pH 8,0. La fase fenólica se extrae dos a tres veces con una solución Tris-HCl 0,1M pH 8,0, β - mercaptoetanol 0,2% (p/v) hasta alcanzar un pH superior a 7,6. Se mezcla un volumen de fenol saturado con un volumen de cloroformo : alcohol isoamílico (24 : 1).

3.- Solución agua - CTAB y butanol - CTAB

Se mezcla un volumen de butanol con un volumen de agua destilada, y se agita repetidas veces. Se recuperan ambas fases en forma separada. Se disuelve 1 g de CTAB en 100 ml de butanol saturado en agua (fase superior), se

mezcla con 100 ml de agua saturada en butanol (fase inferior), y se deja a temperatura ambiente hasta la separación de las fases. Cada fase se recupera en forma separada y se mantiene a 37°C hasta su uso.

4.- Solución de bromuro de etidio

Se disuelve 5 mg de bromuro de etidio en 100 ml de agua destilada. Se guarda en botella ámbar.

5.- Solución de lavado (Método de "glass milk")

Se mezclan 14 ml de una solución concentrada de cloruro de sodio preparada en solución Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, con 280 ml de agua destilada. Luego, se adicionan 310 ml de etanol absoluto y se guarda a -20°C

6.- Solución de hibridación

SSC	6x
SDS	0,5 %
DNA de esperma de salmón desnaturado	100 µg/ml
Formamida	50 %

7.- Solución de prehibridación

SSC	6x
Reactivo Denhardt's	5x
SDS	0,5 %
DNA de esperma de salmón desnaturado	100 µg/ml
Formamida	50 %

8.- Solución SSC 10x

Cloruro de sodio 87,65 g/lt

Citrato de sodio 44,1 g/lt

Se ajusta a pH 7,0 con solución de NaOH 10N

9.- Solución de yoduro de sodio

Se prepara una solución de yoduro de sodio 6 M

Se guarda a 4°C

10.- Reactivo Denhart's 50x

Ficoll 1 %

PVP 1 %

BSA (fracción V) 1 %

APENDICE 3

1.- Tampón de carga 6x

Ficoll (tipo 400) 2 %

Azul de bromofenol 0,25 %

Glicerol 35 %

Se prepara en tampón TBE 6x

2.- Tampón ES

Cloruro de sodio 0,15 M

EDTA pH 8,0 0,01 M

3.- Tampón SSC

Cloruro de sodio 0,15 M

Citrato trisódico pH 7,0 0,015 M

4.- Tampón TAE

Tris-HCl pH 7,9 40 mM

Acetato de sodio 5 mM

EDTA 1 mM

5.- Tampón TBE (1x)

Tris-HCl pH 8,0 89 mM

Acido bórico 89 mM

EDTA pH 8,0 2 mM

6.- Tampón TE

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

7.- Tampón Z

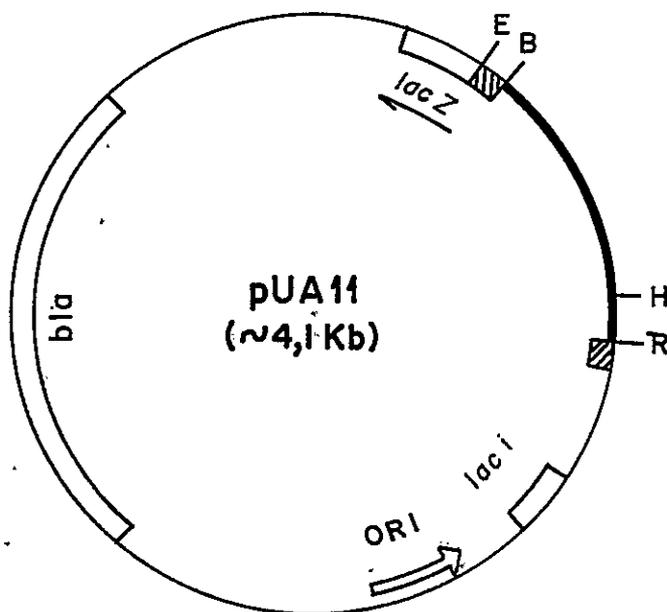
Fosfato monoácido de sodio	16,1 g/lt
Fosfato diácido de sodio	5,5 g/lt
Cloruro de potasio	0,75 g/lt
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,25 g/lt
β - mercaptoetanol	2,7 ml/lt
Ajustar a pH 7,0 y almacenar a 4°C	

APENDICE 4

1.- DNA del fago lambda digerido con HindIII

Nº del fragmento	Tamaño molecular (kb)	Peso molecular (MDa)
1	23,130	15,0
2	9,419	6,12
3	6,557	4,26
4	4,371	2,84
5	2,322	1,51
6	2,028	1,32
7	0,564	0,37
8	0,125	0,08

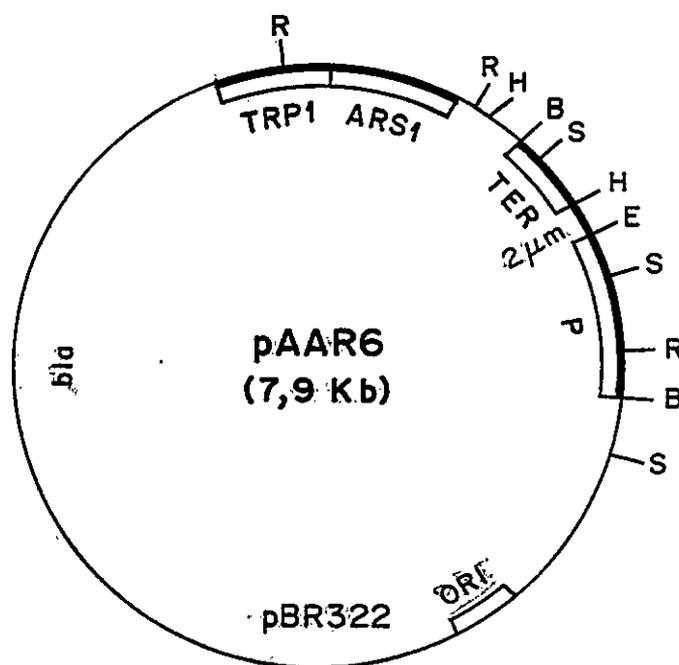
APENDICE 5



Mapa de restricción del DNA del plásmido pUA11.

La línea gruesa representa el fragmento de DNA de *E. aerogenes* de 1,4 kb conteniendo el gen para la α -acetolactato descarboxilasa, y la línea delgada representa secuencias de DNA del plásmido pBR322 y del bacteriófago M13mp19. *bla*= gen de β -lactamasa, ORI= origen de replicación (plásmido ColE1), *lac i*= represor del operón *lac*; *lac Z*= gen para α -péptido (β -galactosidasa). E= EcoRI, B= BamHI, R= EcoRV, H= HincII.

APENDICE 6

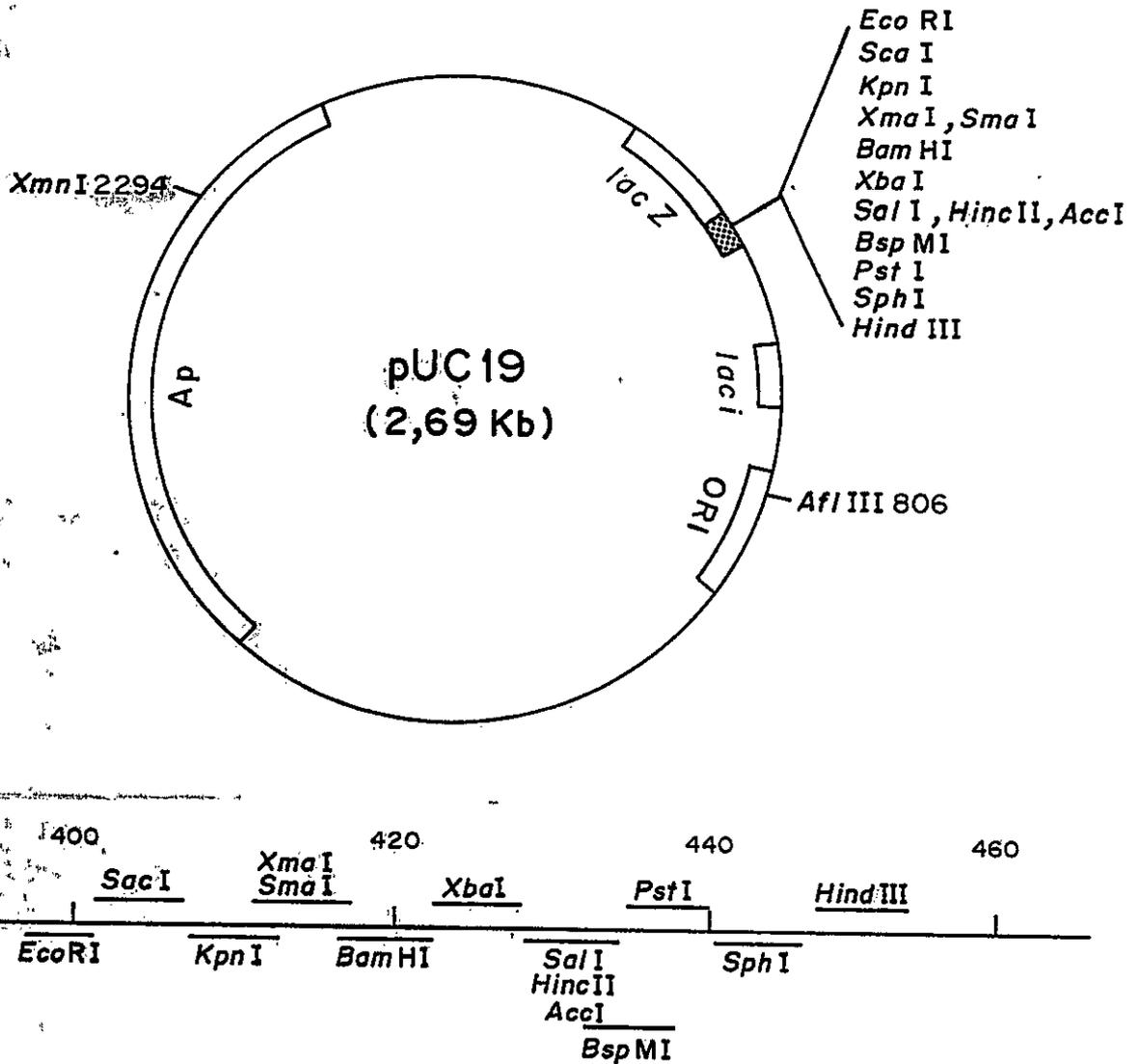


Mapa de restricción del vector de expresión pAAR6.

La línea delgada representa secuencias de DNA derivada del plásmido pBR322: un fragmento de 4,0 kb que contiene el origen de replicación (ORI) y el gen para la β -lactamasa (bla), y un fragmento de 0,4 kb que está entre la secuencia ARS1 y la secuencia TER.

La línea gruesa representa secuencias de DNA derivadas de *Saccharomyces cerevisiae*: un fragmento de 1,4 kb que contiene un marcador de selección para levadura (TRP1) y la secuencia de replicación autónoma (ARS1); un fragmento de 0,45 kb que contiene la secuencia de término de transcripción del gen ADC1 (TER); un fragmento adaptador de 105 pb derivado del plásmido de 2µ de levadura, y un fragmento de 1,5 kb que contiene la secuencia promotora del gen ADC1 (P). B= BamHI, E= EcoRI, H= HindIII, R= EcoRV, S= SphI

APENDICE 7



Mapa de restricción del DNA del plásmido pUC19.

En la parte inferior del esquema se muestra la secuencia de DNA de 54 pb correspondiente al sitio de policlonación del plásmido. bla= gen de β -lactamasa, lac i= represor del operón lac, lac Z= gen para α -péptido (β -galactosidasa). ORI=origen de replicación (plásmido ColE1).

BIBLIOGRAFIA

Ammerer, G. (1983) Expression of genes in yeast using the ADC1 promoter. Meth. Enzymol. 101: 192-201. Wu, R., Grossman, L. y Moldave, K. (eds.). Academic Press, New York.

Becker, J. M., Caldwell, G. A. y Zachgo, E. A. (1990) Determination of β -galactosidase in permeabilized yeast cells. Biotechnology. A laboratory course. Academic Press, INC. pp. 125-128.

Bennetzen, J. L. (1982) The primary structure of the Saccharomyces cerevisiae gene for alcohol dehydrogenase I. J. Biol. Chem. 257: 3018 - 3025.

Birboim, H. C. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523.

Blomqvist, K., Nikkola, M., Lehtovaara, P., Suihko, M.-L., Airakksinen, U., Straby, K. B., Knowles, J. K. y Penttilae, M. E. (1993) Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operon Klebsiella terrigena and Enterobacter aerogenes. J. Bacteriol. 175: 1392 - 1404.

Bolívar, F., Rodríguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L. y Boyer, H. W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. *Gene* 2: 95-113.

Boyer, H. W., y Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.

Branen, A. L. y Keenan, T. W. (1972) Biosynthesis of α -acetolactate and its conversion to diacetyl and acetoin in cell-free extracts of Lactobacillus casei. *Can. J. Microbiol.* 18: 479-485.

Broach, J. R. y Volkert, F. C. (1991) Circular DNA plasmids of yeasts. En *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol.1 pp. 297 - 331.

Burke, D. T. y Olson, M. V. (1991) Preparation of clone libraries in yeast artificial-chromosome vectors. *Meth. Enzymol. Guide to yeast genetics and molecular biology*. Vol. 194 p. 251-270. Guthrie, C. y Fink, G. R. (eds.). Academic Press, New York.

Burke, D. T., Carle, G. F. y Olson, V. (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806-812.

Cai., D. y Klinman (1994) Copper amine oxidase: Heterologous, purification, and characterization of an active enzyme in Saccharomyces cerevisiae. *Biochemistry* 33: 7647 - 7653.

Chang, S. P., Yong, J. P., Young, H. L., Kyung, J. P., Hyen, S. K. y Un, H. P. (1990) The novel genetic manipulation to improve the plasmid stability and enzyme activity in the recombinant brewing yeast. *M.B.A.A. Techn. Quarterly* 27: 112 - 116.

Chen, C. Y., Oppermann, H. y Hitzeman, R. A. (1984) Homologous versus heterologous expression in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Nucl. Acids Res.* 12: 8951 - 8970.

Chu, G., Vollrath, D. y Davis, R. W. (1986) Separations of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science.* 234: 1582 - 1585.

Cifuentes, V. H. (1988) Clonamiento de genes de Neurospora crassa. Tesis de doctorado en Ciencias con mención en Biología. Universidad de Chile p.: 29-31.

Cobianchi, F. y Wilson, S. H. (1987) Enzymes modifying and labeling DNA and RNA. Meth. Enzymol. Guide to molecular cloning. Vol. 152 p. 95. Shelby, L. B. y Kimmel, A. R. (eds.). Academic Press, New York.

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69: 2110-2114.

Chuang, L. F. y Collins, E. B. (1968) Biosynthesis of diacetyl in bacteria and yeast. J. Bacteriol. 95: 2083-2089.

Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R. y Sjøholm, C. (1990) Cloning of aldB, which encodes α -acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from Bacillus brevis. J. Bacteriol. 172: 4315-4321.

Dillemans, M., Goosens, E., Goffin, D. y Masschelein, C. A. (1987) The amplification effect of the *ilv-5* gene on the production of vicinal diketones in Saccharomyces cerevisiae. J. Am. Soc. Brew. Chem. 45: 81-84.

Falco, S. C. y Dumas, K. S. (1985) Genetic analysis of mutants of Saccharomyces cerevisiae resistant to the herbicide sulfometuron methyl. Genetics 109: 21-35.

Feinberg, A. y Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132: 6-13.

Feinberg, A. y Vogelstein, B. (1984) Addendum: a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 137: 266-267.

Godtfredsen, S. E. y Ottesen, M. (1982) Maturation of beer with α -acetolactate decarboxylase. Carlsberg Res. Commun. 47: 93-102.

Godtfredsen, S. E., Lorck, H. y Sigsgaard, P. (1983) On the occurrence of α -acetolactate decarboxylases among microorganisms. Carlsberg Res. Commun. 48: 239-247.

Godtfredsen, S. E., Rasmussen, A. M., Ottesen, M., Rafn, P. y Peitersen, N. (1984) Occurrence of α -acetolactate decarboxylases among lactic acid bacteria and their utilization for maturation of beer. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 23-28.

Goelling, D. y Stahl, U. (1988) Cloning and expression of an α -acetolactate decarboxylase gene from Streptococcus lactis subsp. diacetylactis in Escherichia coli. Appl. Environm. Microbiol. 54: 1889-1891.

Gross-Bellard, M., Oudet, P. y Chambon, P. (1973) Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. Eur. J. Biochem. 36: 32-38.

Guarente, L. (1983) Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. Meth. Enzymol. 101: 181-191. Wu, R., Grossman, L. y Moldave, K. (eds.). Academic Press, New York.

Gunsalus, I. C. y Stanier, R. Y. (1961) Metabolism. Fermentation of carbohydrates. Vol. II. p. 92.

Heidmann, S., Schindewolf, C., Stumpf, G. y Domdey, H. (1994) Flexibility and interchangeability of polyadenylation signals in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 14: 4633-4642.

Herskowitz, I. (1988) Life cycle of the budding yeast Saccharomyces cerevisiae. Microbiol. Rev. 52: 536-553.

Hitzemann, R. A., Hagie, F. E., Levine, H. L., y Goeddel, D. V. (1981) Expression of a human gene for interferon in yeast. Nature. 293: 717- 722.

Halmborg, S. (1984) Genetic improvement of brewers' yeast. Trends Biotechnol. 2: 98-102.

Ito, H., Fukuda, Y. Murata, K. y Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. 153: 163-168.

Johnson, P. H. y Grossman, L. I. (1977) Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double and single stranded DNAs. Biochemistry. 16: 4217-4225.

Johnston, J. R. (1990) Brewing and distilling yeasts. En Yeast technology. pp. 55-104. Spencer, J. F. T. y Spencer, D. M. (eds.). Springer-Verlag, Berlin.

Jones, E. W., Fink, G. R. (1982) . Metabolism and gene expression. The regulation of the amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. En The molecular biology of the yeast Saccharomyces Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 181-299.

Juni, E. (1952) Mechanisms of formation of acetoin by bacteria. J. Biol. Chem. 195: 715-734.

Krampitz, L. O. (1948) Synthesis of α -acetolactic acid. Arch. Biochem. 17: 81-85.

Langridge, J., Langridge, P. y Bergquist, P. L. (1980) Extraction of nucleic acids from agarose gels. Anal. Biochem. 103: 264-271.

Linsken, H. F. y Jackson, J. F. (1988) Beer analysis, Vol. VII. pp. 134-137. Linsken, H. F. y Jackson J. F. (eds.). Springer-Verlag, Berlin.

Loken, J. P. y Stormer, F. C. (1970) Acetolactate decarboxylase and properties. Eur. J. Biochem. 14: 133-137.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 252-253.

Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. 3: 208-218.

Old, R. W. y Primrose, S.B. (1989) Principles of gene manipulation. Cloning in organisms other than E. coli. Vol. 2. Blackwell Scientific Publications. Fourth Edition. pp. 217-219.

Renna, M. C., Najimudin, N., Winik, L. R. y Zahler, S.A. (1993) Regulation of the Bacillus subtilis alsS, alsD, and alsR involved in post-exponential-phase production of acetoin. J. Bacteriol. 175: 3863-3875.

Rose, M. y Botstein, D. (1983) Construction and use of gene fusions lac-Z (β -galactosidase) which are expressed in yeast. Meth. Enzymol. 101: 167-180. Wu, R., Grossman, L. y Moldave, K. (eds.). Academic Press, New York.

Rose, M. D. y Broach, J. R. (1991) Cloning genes by complementation in yeast. *Meth. Enzymol.* 194: 195-230. Guthrie, C y Fink, G. R. (eds.). Academic Press, New York.

Ryan, E. D. y Kohlhaw, G. B. (1974) Subcellular localization of isoleucine-valine biosynthetic enzymes in yeast. *J. Bacteriol.* 120: 631-637.

Sambrook, J., Fritsch y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schleif, R. F. y Wensink, P. C. (1981) *Practical methods in molecular biology. Enzymes assays.* Springer-Verlag. New York.

Schwartz, D. C. y Cantor, C. R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67- 75.

Sone, H., Fujii, T., Kondo, K. y Tanaka, J. (1987) Molecular cloning of the gene encoding α -acetolactate decarboxylase from Enterobacter aerogenes. *J. Biotechnol.* 5: 87-91.

Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

Speckman, R. A. y Collins, E. B. (1968) Diacetyl biosynthesis in Streptococcus diacetilactis and Leuconostoc citrovorum. *J. Bacteriol.* 95: 174-180.

Spencer, J. F. T. y Spencer, D. M. (1990) Yeast technology. Reed, G. y Nagodawithana, T. W. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 65-79.

Spencer, J. F. T. (1983) Genetic improvement of industrial yeasts. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 121-142.

Stormer, F. C. (1967) Isolation of crystalline pH 6 acetolactate-forming enzyme from Aerobacter aerogenes. *J. Biol. Chem.* 242: 1756-1759.

Strathern, I. N., Jones, E. W. y Broach, J. R. (1981) Genetic mapping in Saccharomyces cerevisiae. En *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Strathern, J. N. y Higgins, D.R. (1991) Recovery of plasmids from yeast into Escherichia coli: Shuttle vectors. Meth. Enzymol. 194: 319-329. Guthrie, C. y Fink, G. R. (eds.). Academic Press, New York.

Struhl, K., Stinchcomb, D. T., Scherer, S. y Davis, R. W. (1979) High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1035-1039.

Thomsen, K. K., Jackson, E. A. y Brenner, K. (1988) genetic engineering of yeast: Construction of strains that degrade β -glucans with the aid of a Barley gene. Am. Soc. Brew. Chem. 46: 31-36.

Veyrat, A., Monedero, V. y Martínez-Pérez, G. (1994) Glucose transport by the phosphoenolpyruvate: mannose phosphotransferase system in Lactobacillus casei ATCC and its role in carbon catabolite repression. Microbiology 140, 1141-1149.

Wang, C. J. (1987) Preparation of DNA and RNA. Selected recipe's in molecular biology. Chapter V p.: V 1-V 3.

Wettstein, D. V., Gjermansen, C., Holmberg, S., Kielland-Brandt, M. C., Nilsson-Tillgren, T. , Pedersen, M. B., Litske Petersen, J. G. y

Sigsgaard, P. (1984) Genetic engineering in the improvement of brewers yeast. M.B.A.A. Techn. Quarterly 21: 45-61.

Williams, B. G. y Blattner, F. R. (1980) Bacteriophage \ vectors for DNA cloning. En Genetics Engineering. J. K. Setlow y A. Hollander, (eds.) Plenum Press, New York. Vol. 2 pp. 201.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: 103-119.