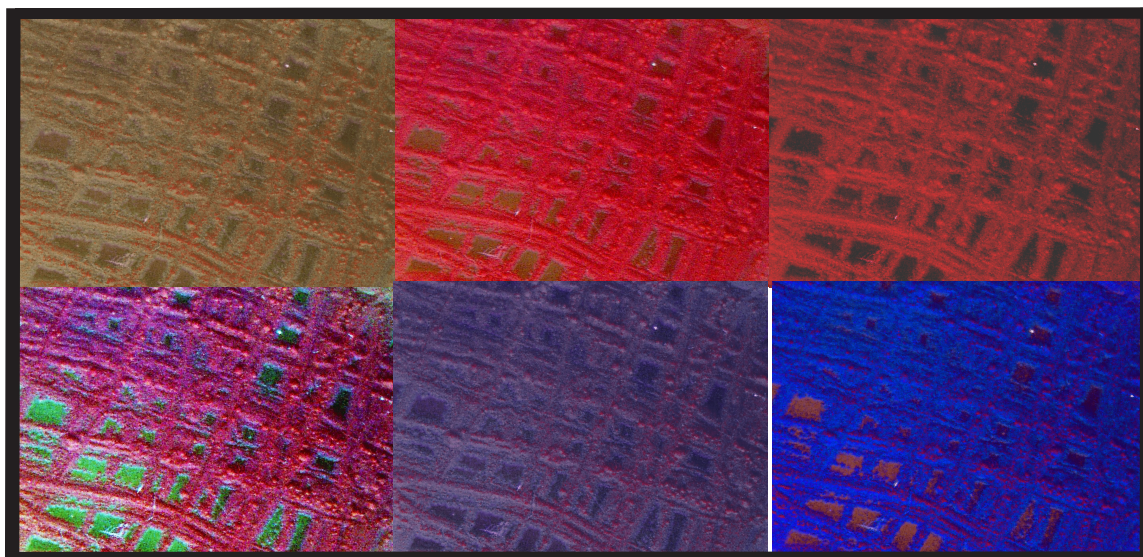




Tesis Doctoral

**Estudio molecular,
análisis de la pigmentación y
aplicabilidad industrial
de *Gordonia jacobaea*.**



**FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA**

Patricia Veiga Crespo
Santiago de Compostela
2006

**TOMÁS GONZÁLEZ VILLA, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA DEL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA,**

CERTIFICA:

Que la presente tesis titulada “**Estudio molecular, análisis de la pigmentación y aplicabilidad industrial de *Gordonia jacobaea***” que presenta Patricia Veiga Crespo para optar al grado de Doctora en Biología, ha sido realizada bajo mi dirección y la de la Dra. Margarita Poza Domínguez, en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, y hallándose concluida, autorizo su presentación para que sea evaluada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos en la presente en Santiago de Compostela, Junio, 2006.

Fdo.: Tomás González Villa

Fdo.: Margarita Poza Domínguez.

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA**

**Estudio molecular, análisis de la
pigmentación y aplicabilidad industrial de
Gordonia jacobaea.**

Memoria presentada por la Licenciada Patricia Veiga Crespo
para optar al grado de Doctora en Biología

Santiago, 2006

Fdo: Patricia Veiga Crespo

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



Tesis Doctoral

**Estudio molecular, análisis de la
pigmentación y aplicabilidad industrial de
Gordonia jacobaea.**

Patricia Veiga Crespo

Santiago de Compostela, 2006

¡Experimenta!
Haz de ello tu consigna día y noche.
Experimenta,
Y ello te llevará a la luz

La manzana en la copa del árbol
Nunca está demasiado alta para alcanzarla.
Así que sigue el ejemplo de Eva,...
¡Experimenta!

Sé curioso,
Aunque los amigos con quien creces se puedan molestar.

Enójate,
Cada vez que quieran retenerte.
Si sólo sigues este consejo,
El futuro puede ofrecerte infinita felicidad
Y alegría...
Experimenta
¡Y ya verás!

Cole Porter ("Experiment de Nymph Errant") Cole Poter, 1993 Harms Inc.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	17
ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.	20
1.- INTRODUCCIÓN.....	23
<i>Gordonia jacobaea</i>	23
<i>Los carotenoides de G. jacobaea</i>	27
<i>Bases moleculares de la síntesis de los carotenoides</i>	31
2.- OBJETIVOS.....	37
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1.- CEPAS, VECTORES Y MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS.....	39
1.1. <i>Cepas empleadas</i>	39
1.2. <i>Vectores empleados</i>	39
1.3. <i>Medios de Cultivo</i>	42
2.- MÉTODOS DE ESTUDIO DE LOS PIGMENTOS DE <i>G. JACOBAEA</i> Y SU PRODUCCIÓN.	44
2.1. <i>Producción de pigmentos a lo largo de la curva de crecimiento</i>	44
2.1.1. <i>Diseño de la curva de crecimiento de G. jacobaea</i>	44
<i>Mediante espectrofotometría</i>	44
<i>Mediante recuento de Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C)</i>	45
2.2. <i>Métodos de extracción de pigmentos de G. jacobaea</i>	45
2.2.1. <i>Extracción con hexano</i>	45
2.2.2. <i>Extracción con etanol</i>	45
2.2.3. <i>Extracción con acetona</i>	46
2.3. <i>Influencia del medio de cultivo sobre la producción de pigmentos</i>	46
2.3.1. <i>Cultivo en medios comerciales</i>	46
2.3.2. <i>Cultivo en medios de bajo coste</i>	46
2.3.3. <i>Análisis estadístico</i>	47
2.4. <i>Escalado para la producción de pigmentos</i>	47

2.4.1. Escalado en matraces con agitación orbital.....	47
2.4.2. Escalado en un fermentador.	48
Cultivo en un fermentador Biostat C.	48
2.5. Cultivo mixto de <i>M. xanthus</i> y <i>G. jacobaea</i>	48
2.5.1. En matraces con agitación orbital.....	48
2.5.2. En un fermentador.	49
2.6. Técnicas de concentración del pigmento extraído.....	50
2.6.1. Empleando un Rotavapor.....	50
2.6.2. Empleando un liofilizador.....	51
Concentración de los cultivos procedentes del fermentador.	51
2.7. Valoración de la producción de carotenoides de <i>G. jacobaea</i>	52
2.7.1. Mediante espectrofotometría.	52
2.7.2. Mediante HPLC.	52
2.7.3. Mediante TLC.	53
3.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN GENÉTICA DE <i>G. JACOBAEA</i>	54
3.1. Técnicas de transformación.	54
3.1.1. Conjugación.....	54
3.1.2. Obtención de células electrocompetentes de <i>G. jacobaea</i>	55
3.1.3. Electroporación.	55
3.1.4. Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico.	56
3.1.5. Transformación de otras <i>Corynebacterias</i> distintas de <i>G. jacobaea</i>	57
3.2. Técnicas de transposición.	57
3.2.1. Transposición de <i>G. jacobaea</i>	57
3.2.2. Análisis de los clones mutantes obtenidos	58
3.3 Técnicas de extracción de DNA.	58
3.3.1 Extracción de DNA genómico de <i>G. jacobaea</i>	58
3.3.2. Extracción de DNA plasmídico.	59
A partir de <i>G. jacobaea</i> transformada con pRE-7 o pDBMCS-2b.....	59
a. QIApreps Spin Miniprep.....	59
b. Método de Birnboim y Doly.....	59

c. Método de Hoffman y Winston	59
d. Método de la lisis alcalina	59
e. Método de Takai et al. (1995) modificado.	60
f. Método de Kieser (1984) modificado.....	60
A partir de <i>E. coli</i> transformada con pRE-7 o pDBMCS-2b.....	61
3.4. Técnicas de PCR.....	61
3.4.1. PCR.....	61
3.4.2. TAIL-PCR.	63
3.5: Análisis de las secuencias.....	66
4.- MÉTODOS DE ESTUDIOS DE BIODEGRADACIÓN.	67
4.1. Reducción de nitratos.	67
4.2. Utilización de cis-1,4-poliisopreno.....	67
5.- ACTIVIDAD LÍTICA DE <i>M. XANTHUS</i> 422 SOBRE <i>G. JACOBAEA</i>	67
5.1. Medida de la actividad lítica de <i>M. xanthus</i> sobre <i>G. jacobaea</i>	67
5.2. Estudio de la actividad bacteriolítica de <i>M. xanthus</i> sobre <i>G. jacobaea</i>	68
5.3. Estudio de la actividad del antibiótico TA producido por <i>M. xanthus</i> sobre <i>G. jacobaea</i>	69
4.- RESULTADOS.....	71
4.1. VIABILIDAD DE <i>G. JACOBAEA</i>	71
4.2. TRANSFORMACIÓN DE <i>G. JACOBAEA</i> MEDIANTE CONJUGACIÓN.....	71
4.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE <i>G. JACOBAEA</i>	71
4.4. ELECTROPORACIÓN DE <i>G. JACOBAEA</i>	74
4.5. RECUPERACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO A PARTIR DE CÉLULAS DE <i>G. JACOBAEA</i> TRANSFORMADAS.	75
4.6 TRANSPOSICIÓN DE <i>G. JACOBAEA</i>	77
4.7. ANÁLISIS POR HPLC DE LOS CLONES OBTENIDOS MEDIANTE TRANSPOSICIÓN DE <i>G. JACOBAEA</i>	79
4.8. APLICABILIDAD DEL MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN A OTRAS CORYNEBACTERIAS.	81
4.9. PCR.....	81
4.10. TAIL-PCR.	82
4.11. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DEL FRAGMENTO DE DNA OBTENIDO MEDIANTE TAIL-PCR.	85
4.12. INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES.	90
4.13: APLICABILIDAD INDUSTRIAL DE <i>G. JACOBAEA</i>	94

4.13.1. Extracción con etanol.	94
4.13.2. Extractabilidad de los carotenoides de <i>G. jacobaea</i> mediante cultivo mixto con <i>M. xanthus</i>	95
4.14. CONCENTRACIÓN DE LOS PIGMENTOS EXTRAÍDOS A PARTIR DE <i>G. JACOBAEA</i> MV-26.	98
4.14.1. Concentración de los pigmentos empleando un rotavapor.	98
4.14.2. Concentración de los pigmentos empleando un liofilizador.	99
4.15. CULTIVO DE <i>G. JACOBAEA</i> MV-26 EN FERMENTADOR.	100
4.15.1. Cultivo de <i>G. jacobaea</i> MV-26.	100
4.15.2. Cultivo mixto de <i>G. jacobaea</i> MV-26 y <i>M. xanthus</i> 422 en un fermentador.	100
4.15.3. Rendimiento industrial del proceso de fermentación.	101
4.16. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE <i>G. JACOBAEA</i> DE ACTUAR COMO BIO-DEGRADADOR.	102
4.16.1. Reducción de nitratos.	102
4.16.2. Utilización de cis-1,4-poliisopreno.	103
4.17. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BACTERIOLÍTICA DE <i>M. XANTHUS</i> 422 SOBRE <i>G. JACOBAEA</i>	103
4.17.1. Actividad lítica de <i>M. xanthus</i> sobre <i>G. jacobaea</i>	103
4.17.2. Estudio de la actividad bacteriolítica de <i>M. xanthus</i> sobre <i>G. jacobaea</i>	104
4.17.3. Estudio de la actividad del antibiótico TA producido por <i>M. xanthus</i> sobre <i>G. jacobaea</i>	105
5.- DISCUSIÓN.....	107
Manipulación genética de <i>G. jacobaea</i> MV-26.	107
Análisis de las secuencias de los genes implicados en la ceto-carotenogénesis.	110
Análisis del proceso de producción y aplicabilidad industrial de cantaxantina en <i>G. jacobaea</i> . ..	112
Capacidad de <i>G. jacobaea</i> de actuar como biorremediador.	117
6.- CONCLUSIONES.....	119
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	121
8.-PUBLICACIONES ORIGINADAS A PARTIR DE ESTE TRABAJO	131
 ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	
FIGURA 1: ESTRUCTURA DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDICOS SINTETIZADOS POR <i>G. JACOBAEA</i>.	23

FIGURA 2: CEPAS DE <i>G. JACOBAEA</i> EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO; SILVESTRE (MV-1) Y MUTANTE HIPERPIGMENTADO (MV-26).....	24
FIGURA 3: DETALLE DE UN CUERPO FRUCTÍFERO FORMADO POR <i>M. XANTHUS</i> 422.....	30
FIGURA 4: DIVERGENCIA DE LA RUTA DE SÍNTESIS DE LOS CAROTENOIDES A PARTIR DEL B-CAROTENO. (SIEIRO <i>ET AL.</i> , 2003).....	32
FIGURA 5: EJEMPLO DE UN ALINEAMIENTO ENTRE LOS CENTROS ACTIVOS DE LA FITOENO SINTASA DE DISTINTAS ESPECIES. (PROSITE DATABASE OF PROTEIN FAMILIES AND DOMAINS. WWW.EXPASY.ORG/PROSITE).....	33
FIGURA 6: ESQUEMA GENERAL DE UN TRANSPOSÓN (CATÁLOGO DE EPICENTRE).....	35
FIGURA 7: ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE UN TRANSPOSOMA TN5.....	35
FIGURA 8: PLÁSMIDOS PRE7 Y PDBMCS-2B.....	40
FIGURA 9: PLÁSMIDO pK18-MOB.....	40
FIGURA 10: TRANSPOSÓN EZ::TN TM <KAN-2>.....	41
FIGURA 11: PLÁSMIDO PEMEL-1.....	41
FIGURA 12: CULTIVO MIXTO DE <i>G. JACOBAEA</i> MV-26 Y <i>M. XANTHUS</i> 422 EN EL FERMENTADOR BIOSTAT C.....	50
FIGURA 13: CONCENTRACIÓN EL LIOFILIZADOR DEL PIGMENTO EXTRAÍDO DE <i>G. JACOBAEA</i> MV-26 Y <i>M. XANTHUS</i> 422 EMPLEANDO UN LIOFILIZADOR.....	52
FIGURA 14: MOTIVO 1 DEL ENZIMA GGPP SINTASA DE LOS ORGANISMOS PRÓXIMOS A <i>G. JACOBAEA</i>	64
FIGURA 15: AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS A PARTIR DE CÉLULAS TRANSFORMADAS DE <i>G. JACOBAEA</i> . A: EXTRACCIONES PLASMÍDICAS DEL VECTOR PRE-7 (CALLES 1 Y 2) Y DEL VECTOR PDBMCS-2B (CALLE 3) REALIZADAS MEDIANTE EL MÉTODO DE TAKAI <i>ET AL.</i> (1995) MODIFICADO. CALLE 4: MARCADOR DE PESO MOLECULAR. B: EXTRACCIONES PLASMÍDICAS DEL VECTOR PRE-7 (CALLE 1) Y DEL VECTOR PDBMCS-2B (CALLE 2) OBTENIDOS MEDIANTE EL MÉTODO DE HOFFMAN Y WINSTON (1987).....	76
FIGURA 16: ANÁLISIS DE LOS PLÁSMIDOS OBTENIDOS A PARTIR DE CÉLULAS DE <i>G. JACOBAEA</i> , PREVIO PASO POR <i>E. COLI</i> . PRE-7 EXTRAÍDO A PARTIR DE <i>E. COLI</i> Y DIGERIDO CON XBAI (CALLE 1) Y EcoRV (CALLE 3). CALLE 2: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1 KB.....	77
FIGURA 17: CLONES MUTANTES OBTENIDOS A PARTIR DE LA TRANSPOSICIÓN DE <i>G. JACOBAEA</i> MV-26.....	78

FIGURA 18: PIGMENTOS EXTRAÍDOS EN HEXANO-FRACCIÓN DE PETRÓLEO A PARTIR DE LOS CLONES MUTANTES DE <i>G. JACOBAEA</i> MV-26 OBTENIDOS POR TRANSPOSICIÓN.	79
FIGURA 19: A: PATRÓN DE PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES DE <i>G. JACOBAEA</i> MV-26. B: PATRÓN DE PRODUCCIÓN DEL CLON MUTADO POR TRANSPOSICIÓN MV-26-T45.	80
FIGURA 20: DNA GENÓMICO EXTRAÍDO A PARTIR DE LAS CÉLULAS DEL CLON DE <i>G. JACOBAEA</i> MUTADO POR TRANSPOSICIÓN MV-26-T45.	82
FIGURA 21: AMPLIACIONES OBTENIDAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE TAIL-PCR; A: REACCIÓN PRIMARIA; B: REACCIÓN SECUNDARIA; C: REACCIÓN TERCIARIA. EN LAS CALLES 1 Y 2 SE OBSERVA EL PRODUCTO ESPECÍFICO AMPLIFICADO ENTRE 1500 Y 2000 PB.	84
FIGURA 22: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DEL FRAGMENTO DE DNA DE <i>G. JACOBAEA</i> OBTENIDO MEDIANTE TAIL-PCR.	85
FIGURA 23: SECUENCIA AMINOACÍDICA OBTENIDA A PARTIR DEL FRAGMENTO DE DNA DE <i>G. JACOBAEA</i> OBTENIDO MEDIANTE TAIL-PCR.	86
FIGURA 24: ANÁLISIS DE LOS MOTIVOS CONSERVADOS DE LA SECUENCIA DE LA GGPP SINTASA OBTENIDA A PARTIR DE DNA DE <i>G. JACOBAEA</i> MEDIANTE TAIL-PCR.	87
FIGURA 25: ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS POR EL GEN CRTÉ ENCONTRADAS EN LAS BASES EXISTENTES Y LA SECUENCIA OBTENIDA A PARTIR DEL DNA DE <i>G. JACOBAEA</i> POR TAIL-PCR.	88
FIGURA 26: ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LA GGPP SINTASA OBTENIDO MEDIANTE EL MÉTODO NEIGHBOR-JOINING/UPGMA.	89
FIGURA 27: MODELADO TRIDIMENSIONAL DE LA SECUENCIA DE LA GGPP SINTASA OBTENIDA A PARTIR DE <i>G. JACOBAEA</i> . A: ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA GGPP SINTASA DE <i>G. JACOBAEA</i> . B: ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL MOTIVO 1 DE LA GGPP SINTASA DE LA SECUENCIA DE <i>G. JACOBAEA</i> . C: SUPERPOSICIÓN DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DE LA GGPP SINTASA DE <i>S. GRISEUS</i> Y <i>G. JACOBAEA</i>	90
FIGURA 28: CULTIVOS DE <i>G. JACOBAEA</i> EN MEDIOS BASADOS EN SOJA Y GLUCOSA.	91
FIGURA 29: EVOLUCIÓN DE LOS PIGMENTOS PRODUCIDOS POR <i>G. JACOBAEA</i> MV-26 EN MEDIO YPD.	92
FIGURA 30: PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES DE <i>G. JACOBAEA</i> MV-26 DURANTE EL CRECIMIENTO EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO. EN LA COLUMNA DE LA IZQUIERDA SE OBSERVA LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS: (○), B-CAROTENO Y (●), CANTAXANTINA EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO: A:	

SOJA 0.5 %; B: SOJA 2 %/GLUCOSA 1.5 %; C: YPD; D: TSB; E: BHIB. EN LA COLUMNA DE LA DERECHA, SE OBSERVA LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO. LA LÍNEA DISCONTINÚA INDICA EL PICO DE MÁXIMA PRODUCCIÓN DE CANTAXANTINA (VEIGA-CRESPO <i>ET AL.</i> , 2005A). (CFUs = UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS / D. O. = DENSIDAD ÓPTICA).	93
FIGURA 31: RESULTADO OBTENIDO MEDIANTE LA TÉCNICA DE TLC REALIZADA CON LOS PIGMENTOS EXTRAÍDOS A PARTIR DE UN CULTIVO DE <i>G. JACOBAEA</i> MV-26 EMPLEANDO ETANOL.....	95
FIGURA 32: CANTIDAD DE CANTAXANTINA DE <i>G. JACOBAEA</i> MV-26 EXTRAÍDO CUANDO SE REALIZÓ CULTIVO MIXTO CON <i>M. XANTHUS</i> 422.	96
FIGURA 33: RESULTADOS DE LA TÉCNICA DE TLC REALIZADA CON LOS PIGMENTOS EXTRAÍDOS CON ETANOL A PARTIR DEL CULTIVO MIXTO DE <i>G. JACOBAEA</i> Y <i>M. XANTHUS</i> . A LA IZQUIERDA: CONTROL NEGATIVO DE <i>M. XANTHUS</i> 422. A LA DERECHA: CULTIVO MIXTO DE <i>G. JACOBAEA</i> MV-26 Y <i>M. XANTHUS</i>	97
FIGURA 34: ANÁLISIS MEDIANTE TLC DE LOS PIGMENTOS CONCENTRADOS EN UN ROTAVAPOR A DIFERENTES TEMPERATURAS Y TIEMPOS.	98
FIGURA 35: PATRÓN DE TLC DE UNA MUESTRA DE CAROTENOIDES EXTRAÍDOS A PARTIR DE <i>G. JACOBAEA</i> MV-26 CONCENTRADOS EMPLEANDO UN LIOFILIZADOR.....	99
FIGURA 36: PIGMENTO EXTRAÍDO CON ETANOL A PARTIR DEL CULTIVO MIXTO DE <i>G. JACOBAEA</i> MV-26 Y <i>M. XANTHUS</i> 422 EN UN FERMENTADOR BIOSTAT C DE 20 L.	101
FIGURA 37: CRECIMIENTO DE <i>G. JACOBAEA</i> EN MEDIO MMS CON CIS-1,4-POLIISOPRENO COMO ÚNICA FUENTE DE C.....	103
FIGURA 38: INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>G. JACOBAEA</i> PRODUCIDO POR <i>M. XANTHUS</i> . IZQUIERDA: PLACA CON CÉSPED DE <i>G. JACOBAEA</i> Y SOBRENANDANTE DEL CULTIVO DE <i>M. XANTHUS</i> 422 EN LOS POCILLOS. DERECHA: PLACA CON CÉSPED DE <i>G. JACOBAEA</i> Y CULTIVO DE <i>M. XANTHUS</i>	104
FIGURA 39: EFECTO DEL ANTIBIÓTICO TA DE <i>M. XANTHUS</i> SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>G. JACOBAEA</i>	105
 INDICE DE TABLAS	
TABLA 1: PRINCIPALES FUENTES NATURALES MICROBIANAS DE CAROTENOIDES (VEIGA-CRESPO <i>ET AL.</i> , 2005A).....	28

TABLA 2: COMBINACIONES DE LAS CÉLULAS DE <i>E. COLI</i> Y <i>G. JACOBAEA</i> PARA LLEVAR A CABO LA CONJUGACIÓN BACTERIANA.	54
TABLA 3: PAREJAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA LA FITOENO SINTASA.	62
TABLA 4: ESQUEMA DE CICLOS DE LA PCR.	62
TABLA 5: ESQUEMA DE SUPER-CICLOS.	63
TABLA 6: OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LAS REACCIONES DE LA TAIL-PCR.	64
TABLA 7: COMBINACIONES EMPLEADAS EN LOS DISTINTOS CICLOS.	65
TABLA 8: MEZCLAS DE REACCIÓN.	65
TABLA 9: EFECTO DE LAS DISTINTAS SUSTANCIAS SOBRE EL GRADO DE COMPETENCIA DE <i>G. JACOBAEA</i> . ..	73
TABLA 10: EFECTO DE LAS DISTINTAS SUSTANCIAS COMBINADAS CON ULTRASONIDOS SOBRE EL GRADO DE COMPETENCIA DE <i>G. JACOBAEA</i>	73
TABLA 11: EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE LOS POSIBLES TRATAMIENTOS SOBRE EL GRADO DE COMPETENCIA DE <i>G. JACOBAEA</i> . (VEIGA-CRESPO <i>ET AL.</i> , 2005B)	73
TABLA 12: EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE EL GRADO DE ELECTROCOMPETENCIA DE LOS CULTIVOS DE <i>G. JACOBAEA</i>	74
TABLA 13: EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ELECTROPORACIÓN SOBRE LA EFICACIA DE TRANSFORMACIÓN DE <i>G. JACOBAEA</i>	75
TABLA 14: EFICACIA DE LA TRANSFORMACIÓN EN OTRAS CORYNEBACTERIAS EMPLEANDO EL MÉTODO DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DISEÑADO PARA <i>G. JACOBAEA</i> . (VEIGA-CRESPO <i>ET</i> <i>AL.</i> , 2005B).	81
TABLA 15: PRODUCCIÓN DE CANTAXANTINA EN LOS DIFERENTES MEDIOS ANALIZADOS (VEIGA-CRESPO <i>ET</i> <i>AL.</i> , 2005A)	91
TABLA 16: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES.	94

Agradecimientos

Es un poco difícil resumir 4 años de vida en unas líneas de agradecimientos pero vamos a intentarlo:

En primer lugar, al Dr. Tomás González Villa, por su dirección científica, su apoyo y comprensión a lo largo de todo este tiempo. Gracias, además, por adentrarme en el apasionante mundo de la Evolución.

A mi co-directora, la Dra. Margarita Poza Domínguez, durante todo este tiempo siempre ha estado ahí para intentar arreglar cualquier problema técnico que surgiese. Es una gratificante sensación labrar una colaboración científica, pero siempre mucho mejor saber, que como decía Rick, “Esto es el comienzo de una bonita amistad”. Gracias.

Este proyecto científico ha sido realizado gracias a los fondos aportados por la Xunta de Galicia mediante el proyecto PGIDO1BI020302PR.

Este proyecto de Investigador, previo licenciado de grado con suficiencia investigadora, licenciado a secas, bachiller, y así hasta el parvulario, ha sido financiado por las Fundaciones Manuel Veiga y María Luisa Crespo, Agustín y Carmen, Maruja y Manolo. Gracias a ellas, hoy puedo estar aquí. Gracias a ellas, he aprendido que lo más importante de luchar por un sueño es la gente que está ahí esperando sin pedir, mientras te apoyan incondicionalmente y se plantean aprender a hablar inglés para poder leer los papers. Gracias, voy a dejar constancia por escrito, os quiero. Primos, tíos y demases, muchas gracias.

A Daniel, por darle sentido a todo lo imaginable y lo no imaginable también y contribuir día a día a que la aventura de vivir sea más emocionante, más divertida, más loca, más... Sólo espero, ejem, poder estar a la altura. ¡Qué horror!

A Manolo y a Maruja, por no ponerme nunca ni cordero ni bacalao y saber que siempre puedo pedir un huevo frito. A Carmela, porque siempre se nota cuando la comida está hecha con cariño, todo tiene otro sabor. A Daniel y a Preciosa, por las veletas y porque siempre quise ser Paquita. A Ofelia, tranquila, yo te paso la foto.

A los del laboratorio, los que están y los que estuvieron. A Trini, porque realmente y totalmente en serio, sin ti todo este trabajo no hubiese sido posible, aunque seguro que había un bicho más manejable... A Juan, por todos los buenos ratos no-científicos. A Chema, tranquilo, el mundo aún no está preparado para entender nuestro arte. A Lucía B. y Lucía F. mis “hijas científicas”, proyectos aparte, solo unos consejos maternales:

Disfrutad de la Ciencia, ojo con la sidra y el dinero se lo pedís a papá. A Manolo, Soly, Laura, Mamem, y algún que otro proyectito “despistao”.

Amigüitos variopintos, los míos pero encantadores todos ellos. Javi, grandes discusiones vitales, grandes decisiones vitales, muchos desvaríos, muchas gracias. Lini, anexiono lo anterior y añadido que el que resiste, gana. Patri, mi niña, prometo bailar encima de las barras sólo contigo. Joseph, controla a tu mujer. Pau, Susi, Ana, primas todas, a vuestra entera disposición. Mariola, conocer a alguien que tiene un caos superior al mío, ayuda y saber que en el caos siempre tiene un minuto, ayuda más. María, “pepito grillo”, mis más sinceras gracias por todo y eso sí, Boa de noche es preciosa. Juan, ¿a qué Boa de noche es preciosa?. Losi algún día conseguiremos que María no se duerma, jeje. A Edu, Rocío, Carmen y Lucía, por dejarme jugar con ellos. A todos los demás que no están nombrados pero deberían estarlos. Es un problema de espacio, lo prometo.

A todos aquellos que piensan que la Ciencia puede llegar a ser una forma de vida, por favor, que lo sigan intentando.

Gracias a los que no entienden el sarcasmo ni la ironía. Gracias por no entenderme.

A todos los que saben que esto va a ir dedicado a la Academia. Y ¡Qué viva el Poder Negro!.

Finalmente, quiero dar las gracias a *Gordonia jacobaea*, por dos razones fundamentales: sin ella esto no hubiese sido posible y porque, además, me ha enseñado que mis límites están donde yo quiera ponerlos. Gracias por ser de hormigón armado, de DNA rápidamente digerible, .. Gracias.

Abreviaturas utilizadas en este trabajo.

HPLC: High performance liquid chromatography.

°C: grados centígrados.

min: min.

h: horas.

rpm: revoluciones por minuto.

ml: mililitros.

μl: microlitros.

cm: centímetros.

mm: milímetros.

μm: micrometros.

nm: nanómetros.

ng: nanogramos.

U: unidades enzimáticas.

g/l: gramos/litro.

mg/ml: microgramos/mililitro.

mg/l : miligramos/litro.

μg/l: microgramos/litro.

μg/ml: microgramos/mililitro.

mg/g: miligramos/gramo.

μg/g : microgramos/gramo.

pg/célula: picogramos/célula.

U/ml: unidades/mililitro.

M: molar.

vol/vol: volumen/volumen

vol:vol:vol: volumen:volumen:volumen

V: voltios.

kV: kilovoltios.

pb: pares de bases.

Kb: kilobases.

Ω: ohmios.

μF: microfaradays.

λ: longitud de onda.

\emptyset : diámetro.

\emptyset_{poro} : diámetro de poro.

ml/min: mililitro/minuto.

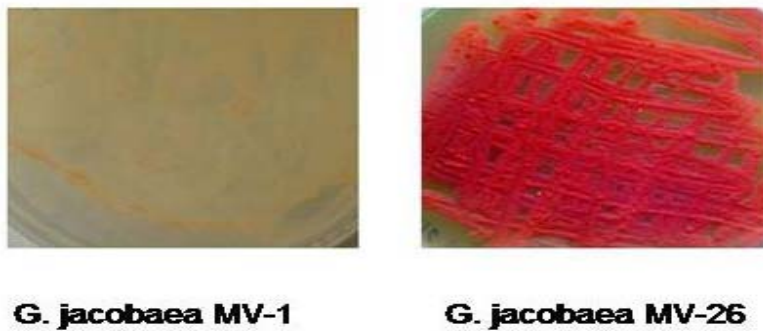


Figura 2: Cepas de *G. jacobaea* empleadas en este trabajo; silvestre (MV-1) y mutante hiperpigmentado (MV-26).

La cantaxantina (β - β -caroteno-4,4'-diona) es un ceto-caroteno de elevado interés industrial ampliamente distribuido en la naturaleza. Se ha empleado en la industria alimentaria como colorante o en la industria cosmética, combinado con el β -caroteno, como fotoprotector dérmico (Hannibal, 2000).

La especie *Gordonia jacobaea* se enmarca dentro del grupo CNM de los actinomicetos constituido por los miembros *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium* y *Gordonia* (Broker *et al.*, 2004). Dentro de este grupo aparecen especies de interés industrial como *Corynebacterium glutamicum*, así como ciertos organismos patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*.

Por su parte, dentro del género *Gordonia* se han descrito un gran número de especies con capacidad para actuar en procesos de biorremediación, biodegradación y biotransformación (Arenskötter *et al.*, 2001; Gilbert *et al.*, 1998; Oldfield *et al.*, 1998). Éstas son capaces de vivir en presencia de compuestos xenobióticos tales como propano, hidrocarburos, nitratos o aceites, degradándolos (Kim *et al.*, 2003; Koma *et al.*, 2003; Kotani *et al.*, 2003; Xue *et al.*, 2003; Fujii *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2005).

A pesar del gran potencial industrial que presentan los organismos del género *Gordonia*, sus mecanismos moleculares están escasamente caracterizados. Surge, por tanto, la necesidad de encontrar mecanismos y diseñar protocolos que permitan su manipulación genética.

Los miembros del CNM presentan como característica común la presencia en su pared bacteriana de ácidos micólicos. De hecho, la composición y estructura de los ácidos micólicos de la pared van a permitir diferenciar a las distintas especies. Estos ácidos micólicos son los responsables de que las células de este tipo bacteriano tiendan a formar agregados, lo cual dificulta enormemente su manipulación. La composición de los ácidos micólicos va a variar debido principalmente a dos factores: la fase de crecimiento en la que se encuentre el cultivo bacteriano (Kurusu *et al.*, 1990; Stratton *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2002); y, la temperatura de crecimiento del cultivo (Tomiyasu *et al.*, 1982; van der Rest *et al.*, 1999; Stratton *et al.*, 2003).

Además, la estructura del péptidoglicano en la pared bacteriana de los organismos Gram positivo también dificulta su transformación, ya que va a constituir el 90 % de su pared bacteriana, y pueden llegar a tener hasta 25 capas de péptidoglicano frente a la única capa que presentan los Gram negativos (Madigan *et al.*, 2004).

La conjugación bacteriana es un mecanismo natural de transferencia de DNA entre bacterias que depende del contacto físico entre ellas así como de la presencia de fragmentos de DNA extracromosómico tales como plásmidos conjugativos, capaces de transferirse de una bacteria a otra durante la conjugación (Prescott *et al.*, 1999). En bacterias Gram negativas anaeróbicas facultativas, la conjugación bacteriana se realiza a través de pili específicos o pelos F y consiste en una transferencia unidireccional, que transfiere el material genético desde un donador F⁺ a un receptor F⁻. Este mecanismo natural se ha estudiado y se ha tomado como base para desarrollar sistemas de

transformación bacteriana artificial cada vez más perfeccionados (Schäfer *et al.* 1990; Schäfer *et al.* 1994 a y b).

Por su parte, la electroporación fue uno de los últimos métodos de transformación artificial desarrollados. En general, la eficacia en un proceso de transformación genética va a depender de los tratamientos previos a los que se sometan las células a transformar. En el caso de la electroporación, la eficacia también va a depender de los propios parámetros de electroporación (voltaje, intensidad de corriente, etc...), que pueden llegar a afectar la integridad del DNA introducido (Arenskötter *et al.*, 2003) así como del tratamiento posterior al que se sometan las células que ya han sufrido electro-shock para que éstas se recuperen. Los tratamientos previos a una transformación están, en general, encaminados hacia el debilitamiento de la pared bacteriana de tal manera que esto favorezca la entrada del DNA exógeno.

La penicilina G y la glicocola son dos de los inhibidores de la síntesis del péptidoglicano más utilizados para la obtención de células competentes a partir de organismos Gram positivos. La isoniazida, por su parte, es un potente inhibidor de la síntesis de los ácidos micólicos. El uso de estos compuestos, bien en solitario o bien combinándolos ha de ser, por tanto, uno de los puntos clave para el desarrollo de un método eficaz de transformación de *G. jacobaea*.

Numerosas publicaciones ponen de manifiesto que para transformar organismos del grupo CNM es necesario utilizar vectores con orígenes de replicación propios de estos géneros bacterianos ya que no son capaces de reconocer orígenes de replicación de especies filogenéticamente alejadas. Sin embargo, hasta la fecha, se desconocen las características de los orígenes de replicación propios de *Gordonia*.

Por otro lado, debido a las citadas características de la pared bacteriana de los miembros del género *Gordonia*, surge también la necesidad de optimizar métodos de extracción y aislamiento de DNA genómico o plasmídico que permitan su manipulación.

Los carotenoides de *G. jacobaea*.

Los carotenoides son pigmentos terpenoidicos que presentan una amplia distribución en la naturaleza y un elevado interés industrial en distintos ámbitos tales como la cosmética o la alimentación. En la actualidad, las principales fuentes microbianas de pigmentos carotenoidicos (Tabla 1) son la levadura *Phaffia rhodozyma* que produce astaxantina (Johnson *et al.*, 1980) y la bacteria *Brevibacterium* KY-4313, productora de cantaxantina (Nelis & Leenher, 1991). Además, en la actualidad, se obtienen pigmentos sintéticos, cuyo uso se está abandonando debido a la creciente sensibilidad social contra el uso de aditivos de origen no-natural (Bhosale, 2003).

Las fuentes actuales de pigmentos carotenoides, tanto las de origen natural como de origen sintético, no son capaces de cubrir las demandas de la industria. La industria demanda organismos fácilmente manipulables, de producción rápida y con un proceso de fácil extracción de los pigmentos acumulados.

Tabla 1: Principales fuentes naturales microbianas de carotenoides (Veiga-Crespo *et al.*, 2005a).

Fuente	Carotenoide	Cantidad	Referencia
	Acumulado	Producida	
<i>Haematococcus pluviales</i>	Astaxantina	1.30 mg/l	Park <i>et al.</i> , 2001
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina	30 µg/g	Johnson <i>et al.</i> , 1980
<i>Halobacterium salinarium</i>	Astaxantina	265 µg/g	Calo <i>et al.</i> , 1995
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Cantaxantina	1 mg/g	Nelis & de Leenher, 1991
<i>Brevibacterium KY-4313</i>	Cantaxantina	2 mg/l	Nelis & de Leenher, 1991
<i>Haloferax alexandrinus</i>	Cantaxantina	2156.67 µg/g	Asker & Ohta, 2002
<i>Muriellopsis sp.</i>	Luteína	22.7 mg/g	del Campo <i>et al.</i> , 1999
<i>Blakeslea trispora</i>	Licopeno	40 mg/l	Calo & Villa, 1995
<i>Flavobacterium sp.</i>	Zeaxantina	0.09 µg/l	Alcántara & Sánchez, 1999
<i>Dunaliella salina</i>	β-caroteno	2.12 mg/l	Orset & Young, 2000
<i>Dunaliella bardawii</i>	β-caroteno	20.1 pg/célula	Ben-Amotz, 1996

Se hace necesario buscar alternativas principalmente de origen microbiano debido a la fácil manipulación y la facilidad para optimizar procesos de producción masiva mediante el empleo de fermentadores.

Es posible aumentar la producción de carotenoides por parte de un microorganismos mejorando la eficiencia de su biosíntesis. Las condiciones de cultivo y los niveles de enzimas biosintéticas van a influir directamente en la producción. Un factor a tener en cuenta que puede aumentar la producción y acumulación de carotenoides es la luz (Boshale, 2003) ya que los carotenoides van a proteger a los microorganismos de los radicales libres originados por la luz. Por su parte, la síntesis de carotenoides se ve

afectada por la temperatura ya que ésta controla la concentración de enzimas implicadas en la producción de pigmentos (Boshale, 2003). Por otro lado, es posible variar la capacidad de producción de carotenoides variando la composición del medio de cultivo. En general, los medios ricos van a favorecer la síntesis de los carotenoides (Boshale, 2003).

Debido a su naturaleza química, los carotenoides son altamente solubles en solventes orgánicos, principalmente acetona y hexano, cuyo uso está prohibido en productos destinados a la alimentación. Por eso, es necesario desarrollar métodos alternativos de extracción que permitan mantener una seguridad alimentaria y obtener la mayor rentabilidad posible. Una de las posibilidades a considerar consiste en la utilización de microorganismos con actividad bacteriolítica que sean capaces de degradar la pared de *G. jacobaea*, lo cual facilitaría la extracción de los carotenoides.

Por otro lado, *Myxococcus xanthus* es una bacteria Gram negativo que presenta un comportamiento social y un ciclo de vida complejos. Estas bacterias son capaces de formar cuerpos fructíferos que albergan a las microsporas (Fig. 3). Dentro de estas estructuras se produce una especialización celular de tal manera que algunas de las células formarán las mixoesporas o microcistes, que son formas de resistencia, mientras que otras se especializarán en mecanismos de defensa (Dworkin, 1996).

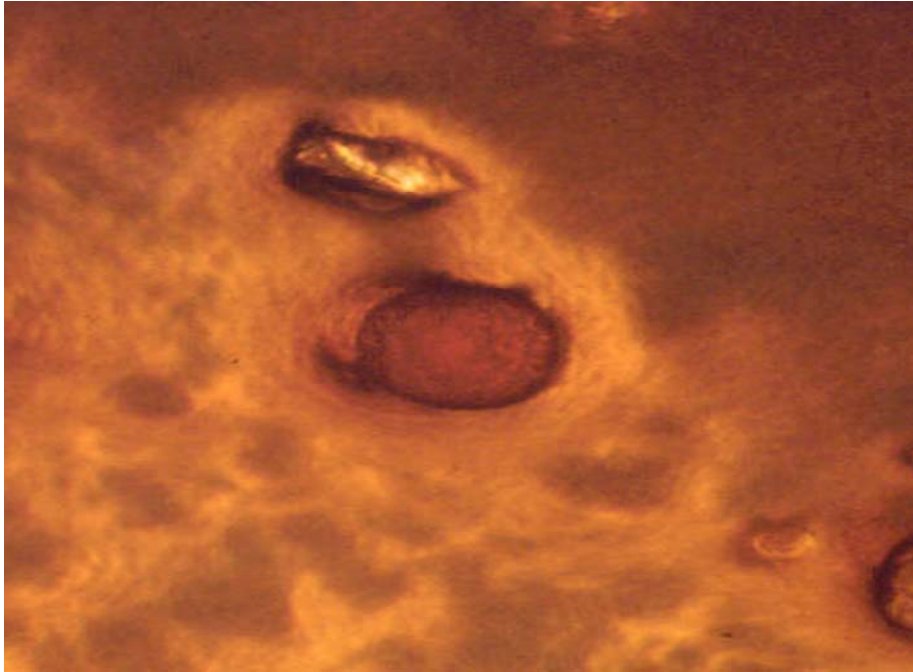


Figura 3: Detalle de un cuerpo fructífero formado por *M. xanthus* 422.

Las mixobacterias producen enzimas bacteriolíticas y proteolíticas capaces de degradar macromoléculas y paredes bacterianas (Sudo & Dworkin, 1971). Además, son capaces de producir antibióticos capaces de destruir a otras bacterias (Noren & Raper, 1962). *M. xanthus* podría emplearse, por tanto, para degradar la compleja pared de *G. jacobaea* y, así, facilitar la extracción de los pigmentos de interés.

Otro factor a considerar durante el proceso de extracción es la forma de concentrar de los pigmentos obtenidos ya que los carotenoides, debido a su estructura cíclica, son compuestos sensibles a la temperatura y en especial al pH.

La comprensión y manipulación de los mecanismos moleculares responsables de la síntesis de los carotenoides puede incrementar los índices de producción de pigmentos así como permitir el desarrollo de nuevos mutantes hiperproductores.

Bases moleculares de la síntesis de los carotenoides

La ruta de síntesis de los carotenoides se origina a partir del isoprenil difosfato (IPP), que según el organismo, se formará a través de la ruta del acetato/mevalonato (MVA), ruta mayoritaria, o a través de la ruta del gliceraldehido-3-fosfato/piruvato.

El IPP se isomeriza para dar lugar al dimetilalilpirofosfato (DMAPP). A continuación, la prenil-transferasa cataliza la unión de tres moléculas de IPP y una de DMAPP para dar lugar al geranio-geranil pirofosfato (GGPP), de 20 átomos de carbono (20 C). La unión de dos moléculas de GGPP, por acción de la fitoeno sintasa, dará lugar al fitoeno (40 C) que presenta tres dobles enlaces conjugados. Éste, debido a la acción del enzima fitoeno deshidrogenasa, va a sufrir una serie de reacciones secuenciales de deshidrogenización, para originar el ζ -caroteno lo cual conlleva dos reacciones de deshidrogenización o al licopeno que requiere cuatro reacciones de deshidrogenización. El licopeno va a ser el precursor de los carotenoides cíclicos, carotenoides y xantofilas, de elevado interés comercial. Los enzimas β -ciclasas y ϵ -ciclasas van a ser los responsables de la introducción secuencial de los anillos de tipo β o de tipo ϵ en los extremos la molécula de licopeno. Tras la introducción del primer anillo de tipo β , se forma γ -caroteno, y cuando se añade un segundo anillo se origina el β -caroteno. El producto final de los carotenoides cíclicos, zeaxantina, astaxantina, cantaxantina, es típico de cada organismo, y se debe a reacciones posteriores en los anillos de β -ionona del β -caroteno (Fig. 4). La cantaxantina se forma tras la conversión de los grupos metileno en grupos ceto en las posiciones 4 y 4' de los anillos de β -ionona, por acción del enzima β -C-4-cetolasa (Disch *et al.*, 1998; Bhosale, 2003).

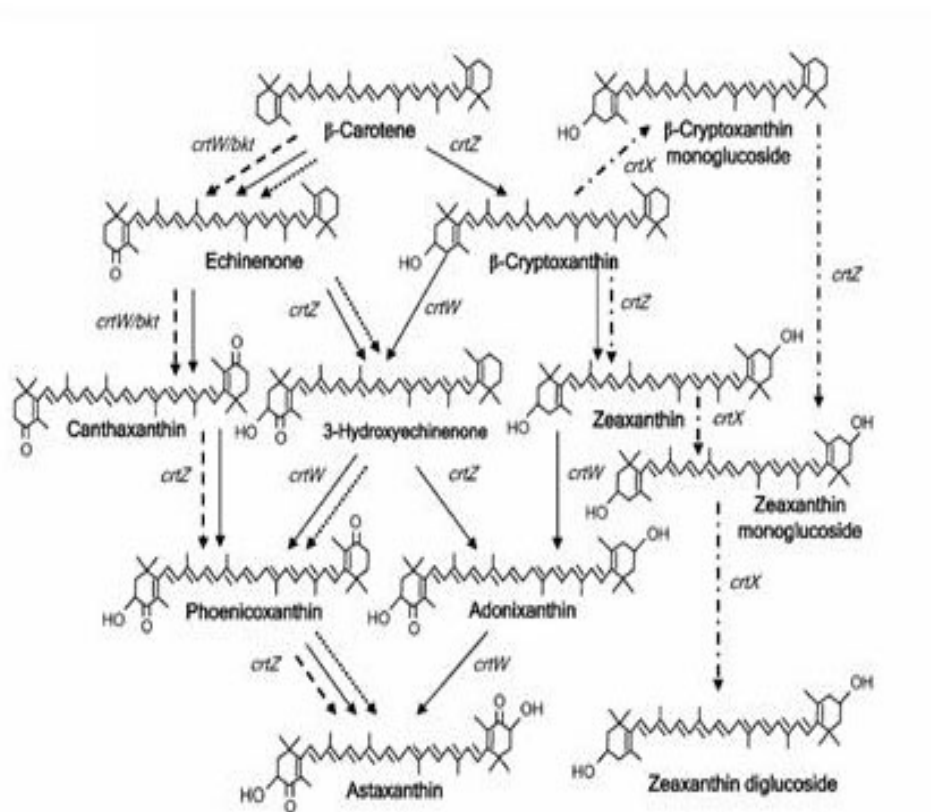


Figura 4: Divergencia de la ruta de síntesis de los carotenoides a partir del β -caroteno. (Sieiro *et al.*, 2003).

Los genes que codifican enzimas involucrados en la síntesis de los carotenoides se designan con las letras *crt* o *car*. Suelen presentar una organización típica en “clusters” (Botella *et al.*, 1995; Lang *et al.*, 1995; Ponnampalan & Bauer, 1997; Krubasik & Sandmann, 2000; Cantera *et al.*, 2002; Sieiro *et al.*, 2003). Son genes relativamente poco caracterizados en los microorganismos en contraste con lo conocido sobre sus equivalentes pertenecientes al reino vegetal.

Existen grandes dificultades para caracterizar estos genes. Por un lado, el conocimiento que se tiene de los enzimas implicados en los distintos pasos de la ruta de síntesis de

carotenoides es escaso y, por otro lado, son genes que han sufrido procesos de convergencia adaptativa, por lo que presentan una función similar pero no un ancestro común que permita caracterizarlos a nivel de su secuencia. Esto dificulta el diseño de oligonucleótidos destinados al aislamiento de los genes de interés.

De hecho, para el caso de la fitoeno sintasa, uno de los enzimas mejor caracterizados, se sabe que el centro activo presenta aminoácidos conservados en posiciones muy concretas mientras que los aminoácidos que rodean al centro activo son altamente variables entre las distintas especies (Fig. 5).

CRTB_AGRAU/128-143	YSyhVAGIVGvmMarV
CRTB_ENTAG/134-149	YCyhVAGVVGlMarV
CRTB_MYCBO/124-139	YCrrGAGTIGklClSI
CRTB_MYCTU/124-139	YCrrGAGTIGklClSI
CRTB_PANAN/134-149	YCyhVAGVVGlMaqI
CRTB_RHOCA/126-141	YSarVAAAVGamMcvL
CRTB_RHOSH/133-148	YSarVAAAVGamMcvL
CRTB_STRGR/142-157	YMhgSAAVIGlqMlpV
CRTB_SYNP7/138-153	YCyrVAGTVGlMqpV
CRTB_SYNY3/167-182	YCyrVAGTVGlMssaV
CRTB_THET2/126-141	YCyqVAGTVGrmMapI
CRTY_SPIPL/138-153	YCyrVAGTVGlMslaV
FDFE_ARATH/168-183	YChyVAGLVGlLskL
FDFE_ASHGO/178-193	YChyVAGLVGdgLthL
FDFE_CANAL/178-193	YChyVAGLVGegLtnL
FDFE_CANGA/178-193	YChyVAGLVGdgLteL
FDFE_HUMAN/171-186	YChyVAGLVGigLsrL
FDFE_MOUSE/171-186	YChyVAGLVGigLsrL
FDFE_NEUCR/181-196	YChyVAGLVGegLtrL

En mayúscula las posiciones conservadas.

Figura 5: Ejemplo de un alineamiento entre los centros activos de la fitoeno sintasa de distintas especies. (PROSITE Database of protein families and domains. www.expasy.org/prosite).

La Geranyl Geranyl pirofosfato sintasa (GGPP sintasa) está bien conservada entre las proteobacterias y las bacterias Gram-positivas y permite diferenciar dos grupos evolutivos; el de las bacterias Gram-positivo con un alto contenido en G+C y el grupo

de las proteobacterias, cianobacterias y flavobacterias. Aún así, dentro de los grupos mencionados, se pueden reconocer subgrupos. Así, en el de las Gram positivas, se diferencian las bacterias fotosintéticas, como *Rhodospirillum rubrum*, de las no-fotosintéticas dentro de las proteobacterias (Phadwal, 2005). El gen *CtrE* está mucho más conservado dentro de las bacterias fotosintéticas de las no-fotosintéticas (Phadwal, 2005).

El enzima GGPP sintasa está codificado por el gen *crtE* que presenta un dominio conservado denominado dominio poliprenil sintasa, rico en ácido aspártico y que está implicado en la unión del sustrato (Shivannad *et al.*, 1992).

Un transposón o elemento transponible es un fragmento de DNA con capacidad para moverse e insertarse dentro de cualquier secuencia de DNA debido a la existencia en sus extremos de secuencias IR que van a ser reconocidas por el enzima transposonasa. Las secuencias IR presentan una longitud aproximada entre 15-25 pb. y en los transposones naturales, la secuencia contenida entre los extremos IR es aquella que codifica para el enzima transposonasa, que cataliza la inserción (Fig 6). Sin embargo, el gen de la transposonasa puede ser sustituido por un gen marcador lo cual ha dado lugar a una poderosa herramienta para desarrollar técnicas de biología molecular. Estos transposones comerciales que han sustituido el gen de la transposonasa por genes de resistencia a antibióticos se han empleado profusamente para obtener mutantes con determinado fenotipo alterado (Prescott *et al.*, 1999; Primrose *et al.*, 2001).

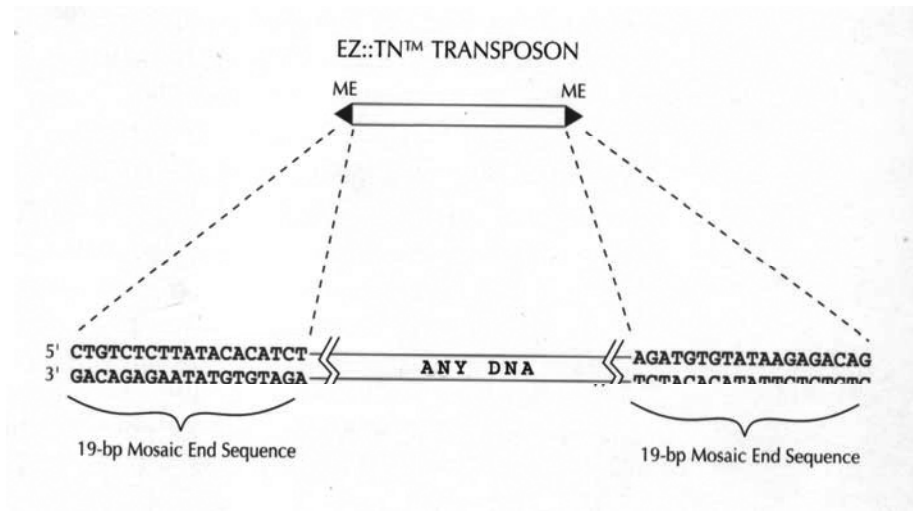


Figura 6: Esquema general de un transposón (Catálogo de Epicentre).

Para que el proceso de transposición sea eficaz, es necesario que se forme el complejo transposoma (Fig. 7), que consiste en la unión del transposón al enzima transposonasa. Este enzima es el responsable de la integración del transposón en el DNA receptor provocando la disrupción del gen en el que se quiere insertar (Lang *et al.* , 1995; Braunstein *et al.* , 2000; Gao *et al.*, 2003). El transposón, podría ser empleado, por tanto, como una herramienta eficaz para detectar los genes implicados en la síntesis de los carotenoides de *Gordonia*.

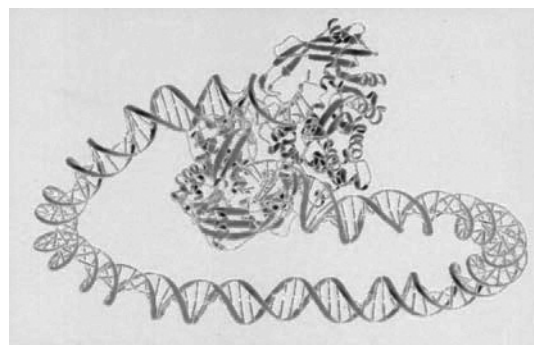


Figura 7: Estructura tridimensional de un transposoma Tn5.

Realizada por Rayment & Reznikoff (University of Wisconsin-Madison).

2.- OBJETIVOS

- I. Desarrollo de un método de transformación aplicable a *G. jacobaea*.
- II. Transposición de *G. jacobaea* e interrupción del cluster de la ceto-carotenogénesis.
- III. Análisis de posibles secuencias del cluster de la ceto-carotenogénesis de *G. jacobaea*.
- IV. Estudio de la cinética de producción de cantaxantina en *G. jacobaea*.
- V. Mejora de la producción y rendimiento en la extracción de cantaxantina en *G. jacobaea*.
- VI. Estudio de la aplicabilidad de *G. jacobaea* como microorganismo biorremediador.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Cepas, vectores y medios de cultivo empleados.

1.1. Cepas empleadas.

Gordonia jacobaea MV-1 fue aislada en nuestro laboratorio durante un muestreo rutinario de microorganismos productores de pigmentos (de Miguel *et al.*, 2000). A partir de ella, se obtuvo el mutante hiperpigmentado *G. jacobaea* MV-26 (de Miguel *et al.*, 2001).

E. coli S17-1 (*hds pro recA Tc::Mu*) (Simon *et al.*, 1983) fue cedida por la Universidad de Toronto (Canadá).

Brevibacterium lactofermentum ATCC 21798 fue cedida por la Universidad de León.

Gordonia bronquialis ATCC 25592, cepa silvestre perteneciente a la Colección América de Cultivos Tipo.

Myxococcus xanthus 422 es una cepa silvestre perteneciente a la Colección Española de Cultivos Tipo, cedida por la Universidad de Granada.

1.2. Vectores empleados

Para la transformación de *G. jacobaea* se utilizaron los vectores lanzadera: pRE-7, que contiene los orígenes de replicación de *E. coli* y *Rhodococcus equi* (Zheng *et al.*, 1997), pDBMCS-2b (Broker *et al.*, 2004), que presenta los orígenes de replicación de *E. coli* y *Gordonia westfalica* (Fig. 8) y pUC18 (Invitrogen), que presenta únicamente el origen de replicación para *E. coli*.

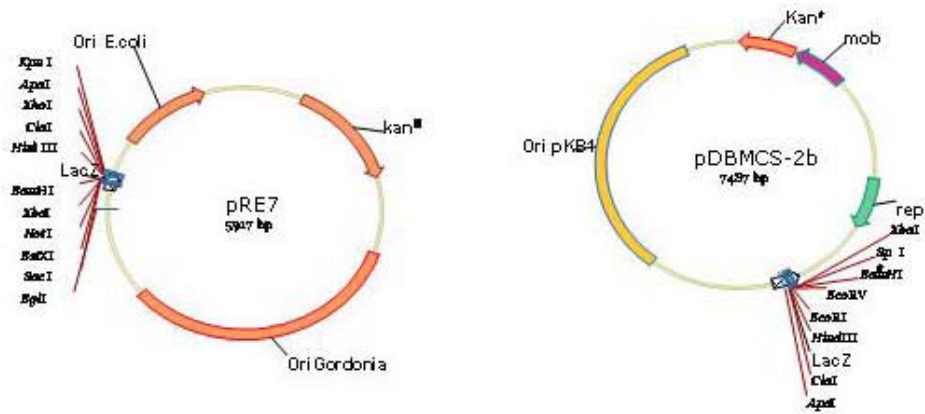


Figura 8: Plásmidos pRE7 y pDBMCS-2b.

Para los experimentos de conjugación bacteriana se empleó el plásmido pK18-mob (Schäfer *et al.*, 1994a) que presenta como marcador de selección el gen de resistencia a kanamicina (Fig. 9)

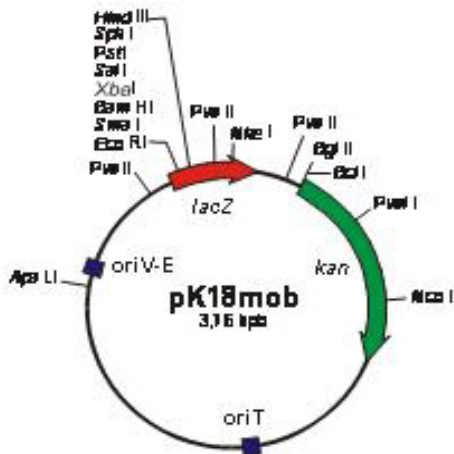


Figura 9: Plásmido pK18-mob.

Para la transposición de *G. jacobaea* se utilizó el transposoma EZ::TN™ <KAN-2> Transposome (Epicentre). Este complejo está formado por el transposón EZ::TN™ <KAN-2> Transposon de 1221 pb y que porta un gen de resistencia a la kanamicina (Fig. 10) y el enzima transposonasa.

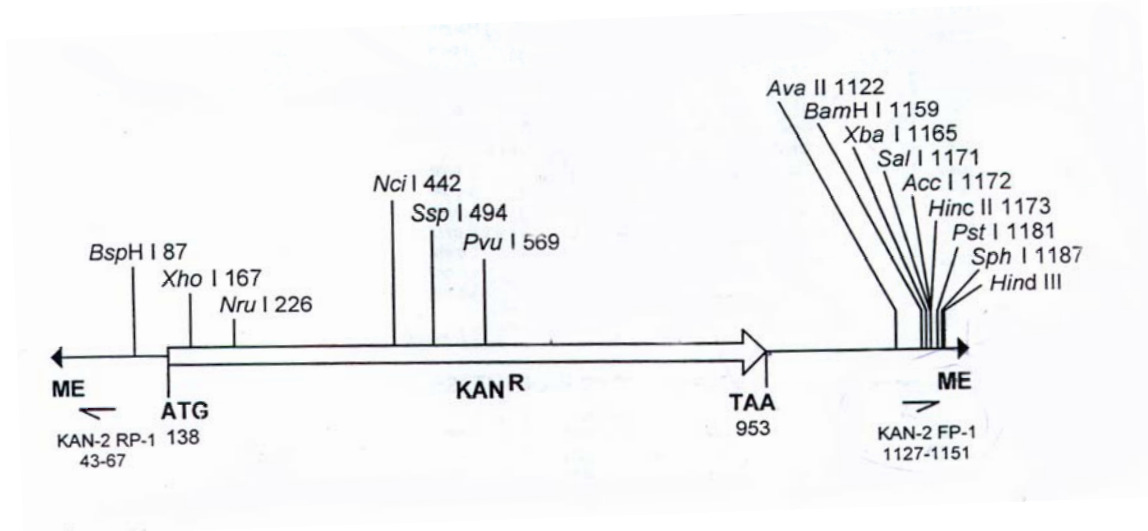


Figura 10: Transposón EZ::TN™ <KAN-2>

Para la transformación de *G. bronchialis*, se utilizó el plásmido pRE-7.

Para la transformación de *B. lactofermentum* se utilizó el plásmido pEMel-1 (Adham *et al.*, 2003) (Fig. 11).

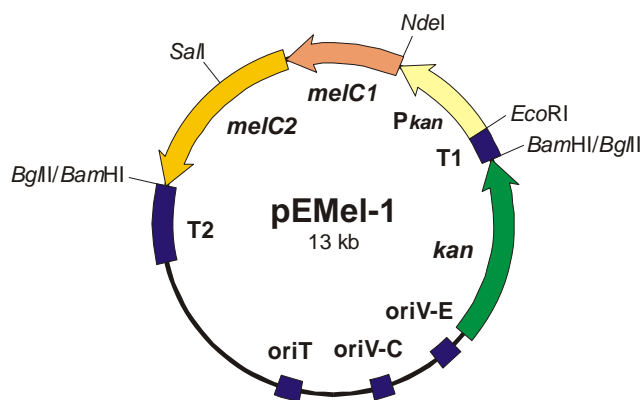


Figura 11: Plásmido pEMel-1.

1.3. Medios de Cultivo.

G. jacobaea MV-1 y *G. jacobaea* MV-26 fueron cultivadas, rutinariamente, en medio AR (Kurusu *et al.*, 1990) a 30 °C durante 4 días y 200 rpm.

Cuando se evaluó la influencia de la fuente de carbono sobre la eficacia en la obtención de células competentes, la glucosa del medio fue sustituida por sacarosa (2 %). Cuando se evaluó, asimismo, la influencia de la temperatura de crecimiento, *G. jacobaea* fue mantenida a 22, 30 y 37 °C.

El medio AR fue suplementado, asimismo, con glicocola (Sigma-Aldrich), isoniazida (Sigma-Aldrich) o penicilina G (Fluka) para optimizar el proceso de obtención de células competentes de *G. jacobaea*.

Cuando se transformó *G. jacobaea* con los plásmidos pRE-7, pDBMCS-2b y con el transposón EZ::TN™ <KAN-2> (Epicentre), el medio AR se suplementó con kanamicina (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich). Cuando se transformó *G. jacobaea* con el plásmido pUC18, el medio AR se suplementó con ampicilina (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich).

Cuando se llevó a cabo la electroporación de *G. jacobaea*, las células sometidas a electroporación fueron resuspendidas en medio SOC (Gibco-BRL).

Cuando se analizó la producción de pigmento de las cepas de *G. jacobaea* sometidas a transposición, se utilizó el medio YPD (2 % peptona, 1 % extracto de levadura, 2 % glucosa). En este caso, los cultivos se mantuvieron durante 7 días a 30°C y 200 rpm.

Cuando se analizó la conjugación bacteriana, *G. jacobaea* fue crecida en medio TSB, que se suplementó con kanamicina y ácido nalidíxico cuando fue necesario.

E. coli S17-1 fue cultivada, toda la noche, en medio LB (1 % triptona; 0,5 % de extracto de levaduras y 1 % de NaCl) a 37 °C y 200 rpm. Este medio fue suplementado con kanamicina (50 µg/ml) cuando fue necesario.

G. bronchialis y *B. lactofermentum* fueron cultivadas en medio AR suplementado con glicocola (1.6 %) e isoniazida (100 µg/ml).

Cuando se analizó la capacidad de *G. jacobaea* para reducir nitrato, se empleó el medio del nitrato descrito por Kim *et al.*, (2003) dispensado en tubos en slant.

Cuando se analizó la capacidad de *G. jacobaea* para asimilar cis-1,4-poliisopreno como fuente de C, se empleó el medio MMS (medio de sales minerales) que contenía 2.44 g/l Na_2HPO_4 , 1.52 g/l KH_2PO_4 , 0.50 g/l $(\text{NH})_2\text{SO}_4$, 0.20 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 10 ml de una solución 1 de elementos traza (0.50 g/l EDTA, 0.20 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 100 ml de solución 2 de elementos traza (0.10 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0.30 g/l H_3BO_3 , 0.20 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/l $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$). Como fuente de cis-1,4-poliisopreno se utilizó látex.

Para cuantificar de la producción de cantaxantina por *G. jacobaea* se utilizaron los medios comerciales:

- Tryptone Soy Meal Broth (TSB) (3 g/l soja peptona, 2,5 g/l glucosa, 17 g/l peptona de caseína, 5 g/l fosfato-hidrógeno dipotásico, 5 g/l NaCl).
- Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (12.5 g/l caldo de cerebro de cabra triturado, 5 g/l caldo de corazón de ternera triturado, 10 g/l proteasa peptona, 2 g/l glucosa, 5 g/l NaCl 2.5 g/l fosfato di-sódico).
- YPD (2 % peptona, 1 % extracto de levadura, 2 % glucosa).

Los medios de bajo coste empleados para el escalado semi-industrial de *G. jacobaea* fueron elaborados combinando:

- distintas concentraciones de soja (0.5 → 2 %)
- distintas concentraciones de soja (0.5 % → 5 %) y glucosa (1 % → 10 %)

- distintas concentraciones de melaza (0.5 % → 5 %).

Los medios de cultivo se suplementaron, en general y cuando fue necesario, con agar al 2 % para elaborar placas con medio sólido.

M. xanthus 422 se cultivó en medio CTT (1 % peptona pancreática de caseína, 10 mM tampón Tris-HCl pH 7.6, 1mM tampón fosfato potásico pH 7.6, 8 mM MgSO₄*7 H₂O) a 33°C y 200 rpm. Cuando fue necesario el medio CTT se suplementó con agar al 1.5 %.

Todos los medios se autoclavaron a 121 °C durante 15 min a 1.1 atm de presión antes de ser utilizados.

2.- Métodos de estudio de los pigmentos de *G. jacobaea* y su producción.

2.1. Producción de pigmentos a lo largo de la curva de crecimiento.

2.1.1. Diseño de la curva de crecimiento de *G. jacobaea*.

Mediante espectrofotometría.

La curva se estableció midiendo la variación en la densidad óptica a una longitud de onda $\lambda_{600 \text{ nm}}$ empleando un espectrofotómetro DU-40 Spectrophotometer (Beckman).

Se tomaron muestras de los distintos medios de cultivo cada 8 h hasta que *G. jacobaea* alcanzó la fase estacionaria. A partir de este momento, las muestras se tomaron cada 24 h.

No fue posible medir mediante espectrofotometría aquellas muestras procedentes de los medios de cultivo elaborados con soja y melaza debido a la interferencia de los componentes del medio de cultivo en las medidas.

Mediante recuento de Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C).

Se elaboraron placas de medio de cultivo suplementando los medios de soja, soja/glucosa y melaza con agar al 2 %.

Las placas de cultivo se inocularon con 100 µl de las muestras extraídas a partir de los medios de bajo coste y se mantuvieron durante 24 h a 30 °C. Al cabo de este tiempo, se procedió al conteo de las colonias.

El número de U.F.C. se obtuvo con la fórmula:

$$\text{U.F.C./ml} = \text{n}^\circ \text{ UFC contadas} * \text{factor de dilución} * 10$$

2.2. Métodos de extracción de pigmentos de *G. jacobaea*.

2.2.1. Extracción con hexano.

Para la valoración por HPLC de los pigmentos de *G. jacobaea*, se procedió a la extracción de los mismos por el método del hexano.

Para ello, los cultivos se centrifugaron y a las células de *G. jacobaea* se les añadieron 3 ml de tampón 0.1 M fosfato pH 7 y 10 ml de hexano-petróleo (Merck). Se agitaron vigorosamente las muestras, se centrifugaron (10 min a 5000 rpm) y se recuperó la fase orgánica. Ésta se filtró a través de membranas de teflón ($\text{Ø}_{\text{poro}} = 22 \mu\text{m}$) (Gelman Sciences Inc.). Esta extracción se realizó repetidas veces para obtener la mayor cantidad y calidad de pigmentos de los clones.

2.2.2. Extracción con etanol.

Para analizar la capacidad de extracción de los carotenoides de *G. jacobaea* con solventes orgánicos permitidos para la industria alimentaria, los cultivos de *G. jacobaea* se mantuvieron hasta que alcanzaron el pico máximo de producción. A continuación, se centrifugaron y se desechó el sobrenadante. El precipitado de células se resuspendió en

1 volumen de etanol puro (Merck). Este preparado se agitó vigorosamente. Se recuperó la fase orgánica y se procedió a sucesivos ciclos de extracción hasta que la pérdida de pigmentación del precipitado celular era evidente.

2.2.3. Extracción con acetona.

El precipitado celular obtenido tras centrifugar una muestra de cultivo, se resuspendió en un volumen de acetona. Se agitó vigorosamente y se recuperó la fase orgánica. La fase orgánica se filtró a través de membranas de teflón de 0,22 μm ϕ_{poro} .

2.3. Influencia del medio de cultivo sobre la producción de pigmentos.

2.3.1. Cultivo en medios comerciales.

G. jacobaea MV-26 se cultivó en 500 ml YPD, BHIB, TSB.

100 ml de medio fueron inoculados con 5 ml de un cultivo de *G. jacobaea* MV-26 en fase estacionaria. Estos cultivos se mantuvieron a 30°C y 150 rpm de agitación continua.

Se tomaron muestras del medio de cultivo, para la valoración de la curva de crecimiento de *G. jacobaea* mediante espectrofotometría y la curva de producción de pigmento mediante HPLC durante 7 días o 10 días dependiendo del medio de cultivo empleado.

2.3.2. Cultivo en medios de bajo coste.

Para la elaboración de los medios de bajo coste se procedió a añadir soja, melaza y mezclar soja y glucosa en las proporciones indicadas en el apartado 3.1.3 en 500 ml de agua doblemente desionizada.

Estos medios se inocularon con 5 ml de un cultivo de *G. jacobaea* MV-26 en fase estacionaria.

Los medios se mantuvieron durante 7 días a 30 °C tomándose muestras para ver la evolución de la producción de pigmento mediante HPLC y la curva de crecimiento de *G. jacobaea* MV-26 mediante recuento de UFCs.

También se elaboraron controles para cuantificar el aporte de carotenoides por parte de los componentes del medio de cultivo. Para ello, se mantuvieron los medios sin inocular.

2.3.3. Análisis estadístico.

El estudio estadístico de la influencia del medio de cultivo sobre la producción de carotenoides de *G. jacobaea* fue llevado a cabo con el programa SPSS 12.0. Se realizó una t-Student con un intervalo de confianza del 95%.

2.4. Escalado para la producción de pigmentos.

2.4.1. Escalado en matraces con agitación orbital.

Se estudió la producción de pigmentos de *G. jacobaea* cultivada en los medios comerciales YPD, BHIB y TSB y en los medios de bajo coste soja 0.5 % /glucosa 0 % y soja 2 %/glucosa 1.5 % en mayores volúmenes.

Para ello, se inoculó un 1 l de medio de cultivo con 10 ml de cultivo de *G. jacobaea* en fase estacionaria. Los cultivos se mantuvieron durante 7 días a 30 °C, excepto en el caso del YPD que se mantuvo durante 10 días.

Se tomaron muestras cada 8 h hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria. A partir de este momento, las muestras se tomaron cada 24 h.

A las muestras extraídas se las sometió a análisis de producción de carotenoides para ver si se repetían los patrones observados en menores volúmenes mediante HPLC.

2.4.2. Escalado en un fermentador.

Se llevó a cabo la optimización de la producción de carotenoides en una planta piloto de fermentación. Para ello, se utilizó el fermentador Biostat C (B. Braun Biotech International) de 30 L de capacidad.

Cultivo en un fermentador Biostat C.

Para ello, se prepararon 20 l de medio de cultivo YPD que se inocularon 3 l de un cultivo de *G. jacobaea* MV-26 en fase estacionaria. Este cultivo se mantuvo durante 10 días a 30°C, 200 rpm y con una aireación de 15 l/min.

Cada 8 h se extrajeron muestras para estudiar la curva de crecimiento de *G. jacobaea* y la producción de carotenoides según los protocolos descritos en el apartado 3.8.

Transcurrido este periodo, el cultivo recuperado desde el fermentador se centrifugó empleando una centrifuga de flujo continuo CEPA-Laboratory Centrifuge LE (Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH) a temperatura ambiente y a 30000 rpm.

El precipitado celular se resuspendió en 1 vol de etanol y se procedió a la extracción del pigmento mediante el método del etanol.

2.5. Cultivo mixto de *M. xanthus* y *G. jacobaea*.

2.5.1. En matraces con agitación orbital.

G. jacobaea se cultivó en un volumen de 1l YPD hasta alcanzar el pico máximo de producción de cantaxantina. Uno de estos cultivos de *G. jacobaea* MV-26 se inactivó cuando alcanzó el pico de máxima producción manteniendo el cultivo a 65 °C durante 15 min. El otro cultivo se mantuvo activo.

M. xanthus 422 se cultivó hasta alcanzar la fase estacionaria en 1 l de medio CTT a 33 °C con agitación continua.

Entonces se realizaron las siguientes mezclas;

- 1) Cultivo de *G. jacobaea* MV-26 : cultivo de *M. xanthus* 422 1:1 vol:vol
- 2) Cultivo de *G. jacobaea* MV-26 inactivada : cultivo de *M. xanthus* 422 1:1 vol:vol

Los cultivos 1 y 2 se mantuvieron durante 72 h a 33 °C. Cada 8 h se tomaron muestras. Paralelamente, se realizaron controles con cultivos independientes de *G. jacobaea* y *M. xanthus*.

A continuación, se procedió a valorar la cantidad de pigmento obtenido mediante los cultivos 1 y 2. Para ello se extrajeron los carotenoides mediante el método del hexano-petróleo y se realizó la valoración mediante HPLC.

Los pigmentos también fueron extraídos con etanol y se sometieron a análisis mediante TLC.

Para calcular la extractabilidad del pigmento de *G. jacobaea* en presencia de *M. xanthus*, se procedió a realizar una extracción del pigmento del cultivo con acetona y se valoraron los pigmentos extraídos mediante espectrofotometría. También se aplicó el mismo procedimiento a un cultivo de *G. jacobaea* sin *M. xanthus*.

2.5.2. En un fermentador.

Se prepararon 10 l de medio YPD. Se inocularon con 1 l de un cultivo de *G. jacobaea* MV-26 en fase estacionaria. Este cultivo se mantuvo a 30°C, 200 rpm y 15 L/min de aireación hasta el pico máximo de producción de cantaxantina.

En ese momento se introdujeron en el fermentador Biostat C 10 l de un cultivo en fase estacionaria de *M. xanthus*. Las condiciones del cultivo mixto fueron de 33 °C durante 24 h. En ese momento, se detuvo la fermentación (Fig. 12).

El cultivo recuperado desde el fermentador se centrifugó empleando una centrifuga de flujo continuo CEPA-Laboratory Centrifuge LE (Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH) a temperatura ambiente y a 30000 rpm.

Se procedió a la extracción del pigmento con etanol.



Figura 12: Cultivo mixto de *G. jacobaea* MV-26 y *M. xanthus* 422 en el fermentador Biostat C.

2.6. Técnicas de concentración del pigmento extraído.

2.6.1. Empleando un Rotavapor.

El pigmento extraído con etanol se colocó en un matraz aforado (AFORA) y se concentró empleando un rotavapor Bibby REL200 (Bibby Starlin LTD.). Para

comprobar la influencia de la temperatura en este proceso, se probó a 35, 50, 72 y 80 °C. Así se llevó a cabo una reducción de 10 veces el volumen de etanol añadido inicialmente. Las muestras se concentraron protegidas de la luz.

Los pigmentos concentrados se sometieron a TLC junto con patrones de β -caroteno y cantaxantina.

2.6.2. Empleando un liofilizador.

El pigmento extraído con etanol a partir de los cultivos de *G. jacobaea* MV-26, se dispensó en matraces aforados y se sometió durante 24 h a -70 °C. Transcurrido este tiempo, los matraces se colocaron en un liofilizador Telstar Cryodos -50 °C (Telstar). Las muestras se mantuvieron a -50°C y en vacío para la evaporación del etanol. Se llevó a cabo una reducción de 10 veces el volumen de etanol añadido inicialmente. Las muestras se concentraron protegidas de la luz.

A continuación, los pigmentos concentrados se sometieron a TLC para ver si el proceso había afectado a su integridad.

Concentración de los cultivos procedentes del fermentador.

El cultivo procedente del fermentador, tanto del cultivo de *G. jacobaea* MV-26 como el cultivo mixto *G. jacobaea* MV-26 y *M. xanthus* 422, tras la centrifugación y extracción del pigmento en etanol, se sometieron, por separado, a concentración empleando un liofilizador Telstar Cryodos -50 °C (Telstar) hasta la completa reducción del etanol (Fig. 13)

Una parte del polvo recuperado se resuspendió en 100 μ l de etanol y se sometió a TLC para ver si la duración del proceso había afectado a la integridad de los carotenoides.

La cantaxantina extraída fue cuantificada y se calculó el rendimiento industrial del proceso de acuerdo a las cantidades de aditivos colorantes permitidas en la elaboración de piensos animales (L284 D.O.C.E, 6.11.1999).



Figura 13: Concentración el liofilizador del pigmento extraído de *G. jacobaea* MV-26 y *M. xanthus* 422 empleando un liofilizador.

2.7. Valoración de la producción de carotenoides de *G. jacobaea*.

2.7.1. Mediante espectrofotometría.

Se tomaron 1.5 ml de las muestras extraídas con acetona. Se midió la D.O. a $\lambda = 480$ nm en un espectrofotómetro DU-40 Spectrophotometer (Beckman).

2.7.2. Mediante HPLC.

La valoración de los carotenoides mediante HPLC se realizó empleando una columna Teknokroma de silicagel de 5 μm de tamaño de poro, de 25 cm de longitud y 45 mm de diámetro. La fase móvil utilizada fue hexano-fracción de petróleo/acetato de etilo 1/1

(vol/vol) (Romil). El flujo fue de 1 ml/min y la presión de 0.4 kpsi. Los volúmenes de muestra inyectados fueron de 20 μ l, siendo la temperatura de análisis 25 °C. El eluyente fue monitorizado a $\lambda= 480$ nm.

Los tiempos de retención del β -caroteno y la cantaxantina se determinaron preparando soluciones puras.

Para determinar la concentración de los pigmentos extraídos se elaboraron rectas patrones con concentraciones conocidas de β -caroteno y cantaxantina. La recta patrón de β -caroteno se elaboró con 50, 100, 250 y 500 μ g/ml mientras que la de cantaxantina se elaboró con 100, 250, 500 y 1000 μ g/ml.

2.7.3. Mediante TLC.

Las muestras extraídas mediante el método del etanol se sometieron a cromatografía de capa fina (TLC) en papel (Chromatography paper 3 MM CHR, Whatman Internacional LTD.).

La fase móvil consistió en una mezcla 80:20 hexano:acetato de etilo (Merck). Los factores de retención del β -caroteno y la cantaxantina se establecieron disolviendo compuestos puros en etanol y sometiéndolos a TLC en iguales condiciones que las muestras extraídas de *G. jacobea*.

El patrón de bandeo típico de *G. jacobaea* se determinó sometiéndolo a TLC una muestra de cultivo sin concentrar y procedente de medio YPD.

3.- Técnicas de manipulación genética de *G. jacobaea*.

3.1. Técnicas de transformación.

3.1.1. Conjugación.

En primer lugar, se transformó la cepa donadora *E. coli* s17-1 con el plásmido pK18-mob mediante shock térmico. A continuación se cultivó en medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/ml) hasta una D.O. ($\lambda= 600$ nm) entre 1 y 1.5.

Paralelamente, se cultivaron las cepas MV-1 y MV-26 de *G. jacobaea* hasta que alcanzaron la fase exponencial de crecimiento.

Para llevar a cabo la conjugación bacteriana se emplearon distintas combinaciones celulares (Tabla 2). Una vez hechas las mezclas celulares, las células se centrifugaron a 300 rpm durante 2 min, se resuspendieron en 0,5 ml de TSB y se aplicaron sobre un filtro de celulosa ($\text{Ø}_{\text{poro}}= 0.45$ µm) (Millipore) que se depositó sobre el agar de una placa de medio TSA.

Las placas se mantuvieron a 30 °C durante 18, 20, 24 ó 36 h. Finalmente, se recogieron las células, se resuspendieron en 1 ml de TSB, se centrifugaron y se resuspendieron en 200 µl de TSB. Los 200 µl se inocularon en placas de TSA suplementadas con antibióticos. Estas placas se mantuvieron a 30°C durante 3 días.

Tabla 2: Combinaciones de las células de *E. coli* y *G. jacobaea* para llevar a cabo la conjugación bacteriana.

Relación celular (<i>E. coli</i> : <i>G. jacobaea</i>)	Número de células
2:1	$8 * 10^8 : 4 * 10^8$
1:1	$4 * 10^8 : 4 * 10^8$
1:2	$4 * 10^8 : 8 * 10^8$

3.1.2. Obtención de células electrocompetentes de *G. jacobaea*.

Para la obtención de células electrocompetentes de *G. jacobaea*, las cepas MV-1 y MV-26 se cultivaron en medio AR variándose la fuente de carbono. Además, este medio también fue suplementado con penicilina G en concentraciones que variaron desde 1 hasta 10 U/ml (Fluka) o con glicocola (Sigma-Aldrich) en concentraciones que variaron desde 1 % hasta 2%. El medio de cultivo también fue suplementado con isoniazida ($C_8H_7N_3O$) (Sigma-Aldrich) en concentraciones que variaron desde 50 μ g/ml hasta 100 μ g/ml.

Las células fueron cultivadas a 22, 30 y 37 °C durante 2 ó 3 días.

A continuación, fueron sometidas a un tratamiento con ultrasonidos durante 20 min. Tras este tratamiento, las células siguieron dos posibles tratamientos: o bien se incubaron durante 1 hora en hielo para luego centrifugarse y lavarse tres veces con glicerol frío al 10 % (Merck), o bien, directamente se centrifugaron y se lavaron con glicerol frío al 10 %.

Tras los lavados, se resuspendieron en 3 ml de glicerol al 10 %. Estos 3 ml se repartieron en alícuotas de 100 μ l en viales eppendorf para su inmediata congelación en nitrógeno líquido. Los viales se mantuvieron almacenados a -70 °C.

3.1.3. Electroporación.

Los experimentos de transformación se realizaron tanto con la cepa silvestre (MV-1), como con la hiperpigmentada (MV-26).

Se incubaron 100 ng de plásmido en glicerol al 10 % durante 5 min y se echó la mezcla en un vial descongelado de células electrocompetentes obtenidas tal como se describe el apartado anterior. Esta suspensión se mantuvo en hielo durante 30 min.

La electroporación fue llevada a cabo empleando un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad) y cubetas de 0.1 cm (Bio-Rad). El voltaje aplicado varió entre 1.8 y 2.5 kV y la resistencia varió desde 200 Ω hasta 600 Ω . La capacitancia del sistema se mantuvo constante con un valor de 25 μ F.

Las células ya sometidas a electroshock fueron resuspendidas en 1 ml de medio SOC (Gibco-BRL) e incubadas durante 1 h a 30 °C y 200 rpm. Finalmente, se sembraron en placas de medio AR suplementado con el antibiótico apropiado y se mantuvieron a 30 °C durante 2 ó 3 días.

Los controles negativos fueron sometidos a idéntico protocolo sin la adición del plásmido, en estos casos sólo se añadieron glicerol al 10 % o agua estéril ultrapura.

3.1.4: Transformación de *E. coli* mediante choque térmico.

Una alícuota de células quimiocompetentes de *E. coli* fue incubada durante 30 min en hielo en presencia de 15 μ l de DNA plasmídico procedente de *G. jacobaea*. A continuación la mezcla se introdujo durante 45 segundos a 42°C para finalmente incubarse durante 2 min en hielo. A continuación, las células se resuspendieron en 1 ml de medio SOC y se incubaron durante una hora a 37 °C a 210 rpm. Transcurrido ese tiempo, las células se cultivaron en placas de medio LB suplementado con kanamicina (50 μ g/ml) cuando en la mezcla de transformación estaba presente el plásmido pRE-7 o el vector pDBMCS-2b.

Las células se mantuvieron en estufa a 37 °C.

3.1.5. Transformación de otras *Corynebacterias* distintas de *G. jacobaea*.

G. bronchialis y *B. lactofermentum* fueron cultivadas en medio AR suplementado con glicina (1.6 %) e isoniazida (100 µg/ml) hasta que alcanzaron la fase exponencial de crecimiento. Después de un ciclo de ultrasonidos de 15 min de duración, las células se mantuvieron durante una hora en hielo. A continuación se sometieron a tres lavados con glicerol al 10 %. Finalmente las células fueron resuspendidas en 3 ml de glicerol al 10 % y se distribuyeron en alícuotas de 100 µl. Se congelaron empleando nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C hasta su utilización.

G. bronchialis fue transformada por electroporación con el vector pRE-7 empleando 2.5 kV y 200 Ω y *B. lactofermentum* fue transformada por electroporación con el vector pEMel-1 empleando 2.5 kV y 200 Ω.

El protocolo de recuperación de las células después de la transformación fue igual al aplicado para *G. jacobaea*.

Finalmente, las células se cultivaron en medio AR suplementado con kanamicina (50 µg/ml).

3.2. Técnicas de transposición.

3.2.1. Transposición de *G. jacobaea*.

Para la transposición, se incubaron 20 ng de EZ::TN™ <KAN-2> Transposoma (Epicentre) con 9 µl de glicerol al 10 % en hielo durante 15 min. A continuación, esta mezcla, se añadió a las células electrocompetentes de *G. jacobaea* y se mantuvo en hielo durante 30 min. Finalmente, se depositó en cubetas de electroporación 0.1 cm (Bio-Rad) y se empleó un aparato Gene-Pulser (Bio-Rad). Las condiciones de

electroporación fueron 2.5 kV, 200 Ω y 25 μ F. Las constantes de tiempo (τ) obtenidas estuvieron en torno a 3.0.

Una vez electroporadas, las células se resuspendieron en 1 ml de medio SOC y se mantuvieron durante 2 h en agitación a 30°C. Finalmente, se sembraron en placas de medio AR con kanamicina y se mantuvieron en la estufa a 30°C durante 3 días. Paralelamente se realizaron controles negativos.

3.2.2. Análisis de los clones mutantes obtenidos

Aquellos clones mutantes obtenidos mediante transposición de *G. jacobaea* que mostraron variación en la coloración, se inocularon en 100 ml de medio YPD.

Una vez los cultivos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento bacteriano y el periodo de máxima acumulación de pigmento, se realizó la extracción de pigmento de los distintos clones por el método del hexano-petróleo para su posterior valoración por HPLC.

La variación en la producción de pigmentos de los distintos clones se realizó por comparación de los espectrogramas obtenidos con los obtenidos a partir del análisis de la cepa *G. jacobaea* MV-26.

3.3 Técnicas de extracción de DNA.

3.3.1 Extracción de DNA genómico de *G. jacobaea*.

Para la extracción del DNA genómico de *G. jacobaea*, se tomaron 15 ml de cultivo en fase estacionaria. Se centrifugaron (15 min, 15000 rpm) y se desechó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 5 ml de tampón (25 mM TrisHCl pH 8, 25 mM EDTA, 300 mM sacarosa, 2 mg/ml lisozima y perlas de vidrio de 0,22 μ m \varnothing). A continuación, se

incubaron las células 45 min a 30°C en agitación continua. A esta solución, se le añadieron 2 ml de SDS al 5 %. Se agitó vigorosamente y se incubó durante 10 min a 60°C. A continuación, se incubaron de nuevo durante 5 min a temperatura ambiente y se añadieron 2 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 vol:vol:vol). Se agitaron vigorosamente y se centrifugaron durante 20 min. Se recogió la fase superior y se le añadió un décimo del volumen de acetato sódico y 1 volumen de isopropanol puro. Se centrifugó y el DNA se resuspendió en agua doblemente ionizada.

3.3.2. Extracción de DNA plasmídico.

A partir de *G. jacobaea* transformada con pRE-7 o pDBMCS-2b.

Se probaron los siguientes métodos;

a. QIApreps Spin Miniprep

Se siguieron las instrucciones del kit QIApreps Spin Miniprep (Qiagen).

b. Método de Birnboim y Doly

Según fue descrito por Birnboim y Doly, 1979.

c. Método de Hoffman y Winston

Según fue descrito por Hoffman y Winston, 1987.

d. Método de la lisis alcalina

Según fue descrito por Sambrook *et al.*, 1989.

e. Método de Takai *et al.* (1995) modificado.

Las células fueron sometidas a un tratamiento de ultrasonidos (un ciclo de 10 min), centrifugadas y resuspendidas en una solución de lisozima (0.05 M Tris-HCl, pH 8, 0.01 M EDTA, pH 8, 0.5 M NaCl, sacarosa al 20 %, y 10 mg/ml lisozima) e incubadas durante 3 h a 37°C y 210 rpm. A continuación, se les añadieron 400 µl de 0.2 N NaOH y 10 g/l SDS y se mantuvieron en hielo durante 5 min. Después de añadir sodio acetato 5 M frío (pH 4.8), las muestras se volvieron a incubar en hielo durante 30 min. Se centrifugaron y el sobrenadante se mezcló con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 vol:vol:vol) y se centrifugaron a 4°C. Se tomó la fase superior y se añadió un volumen de isopropanol. Después de 10 min a -20 °C y una centrifugación a 2600 g durante 30 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en agua ultrapura. Estas muestras se utilizaron para realizar una transformación de *E. coli* mediante choque térmico.

f. Método de Kieser (1984) modificado.

Después de un ciclo de ultrasonidos de 15 min y una centrifugación, el pellet obtenido fue resuspendido en 450 µl de solución L1 (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA, 300 mM sacarosa, 2 mg/ml lisozima y perlas de vidrio de 0.22 µm). Las células se mantuvieron en esta solución lítica durante 45 min a 30 °C, agitándolas vigorosamente cada 10 min. A continuación, se añadieron 300 µl de una solución que contenía 0.3 M NaOH y 2 % SDS, incubando las muestras durante 20 min a 80 °C. Después de 10 min a temperatura ambiente, se mezclaron con 300 µl fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 vol:vol:vol) (Sigma-Aldrich) y 70 µl de 4 M acetato sódico (Merck). Se centrifugaron a 2600 g durante 5 min, y la fase superior se mezcló con un volumen de

isopropanol. Tras una centrifugación, el DNA obtenido fue resuspendido en agua ultrapura y empleado para transformar *E. coli* empleando choque térmico.

A partir de *E. coli* transformada con pRE-7 o pDBMCS-2b.

Cuando se realizó la extracción de DNA plasmídico a partir *E. coli*, se utilizó el método de la lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989).

Los plásmidos recuperados fueron sometidos a digestión con los enzimas presentes en el sitio de clonaje múltiple (Veiga-Crespo, 2005, Veiga-Crespo *et al.*, 2005 b).

3.4. Técnicas de PCR.

3.4.1. PCR.

Se diseñaron oligonucleótidos basados en la secuencia de la región del centro activo de la fitoeno sintasa de *Corynebacterium glutamicum* (número de acceso del GenBank DataBase NC_003450). Paralelamente también se diseñaron oligonucleotidos basados en la secuencia del centro activo del mismo enzima según la secuencia de *Mycobacterium tuberculosis* (número de acceso del GenBank DataBase NC_002755) (Tabla 3).

Tabla 3: Parejas de oligonucleótidos diseñados para la fitoeno sintasa.

Microorganismo	Primer Directo (5'-3')	Primer Reverso(5'-3')
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	TTGGGAGCGGCATTCCAGA-	GGGGAAATAAAAATCGGCCCA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	CTGGGAAAGGCGTTCCAGC	GGGCAGGTACACCCGGC

La mezcla de PCR consistió en 1x buffer de PCR (Takara Shuto Co.), 2 mM Cloruro de Magnesio (Takara Shuto Co.), 0.5 μ M de primer directo, 0.5 μ M de primer reverso, 100 ng de DNA de *G. jacobaea*, 0.2 mM de la mezcla de dNTPs (Takara Shuto Co.), 1 U de Taq-polimerasa (Takara Shuto Co.) y agua estéril doblemente desionizada hasta un volumen final de 50 μ l.

La reacción de PCR consistió en el esquema de ciclos detallado en la Tabla 4.

Tabla 4: Esquema de ciclos de la PCR.

Número de ciclos	Condiciones térmicas
1	94 °C (5 min)
30	94°C (1 min), 60°C (30 s), 72 °C (1 min)
1	72 °C (10 min)

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis (70 V, 400 mA, 90 min) en geles de agarosa al 1 % y 1 mg/ml de bromuro de etidio. Los geles de agarosa se visualizaron en un transiluminador (Fotodyne UV-21).

3.4.2. TAIL-PCR.

Se siguió el protocolo de super-ciclos propuesto por Liu & Whitteir (1995) (Tabla 5).

Tabla 5: Esquema de super-ciclos.

	Número de ciclos	Condiciones térmicas
Reacción	1	92°C (2 min), 95°C (1 min)
Primaria	5	94°C (15 s), 63°C (1 min), 72°C (2 min)
	1	94°C (15 s), 30°C (3min), rampa hasta 72 °C durante 3 min, 72°C (2min)
	10	94°C (5 s), 44°C (1 min), 72°C (2 min)
	12 super-ciclos	94°C (5 s), 63°C (1 min), 72°C (2 min)
		94°C (5 s), 63°C (1 min), 72°C (2 min)
	1	94°C (5 s), 44°C (1 min), 72°C (2 min)
	1	72°C (5 min)
Reacción	10	94°C (5 s), 63°C (1 min), 72°C (2 min)
Secundaria		94°C (5 s), 63°C (1 min), 72°C (2 min)
		94°C (5 s), 44°C (1 min), 72°C (2 min)
	1	72°C (5 min)
Reacción	20	94°C (5 s), 44°C (1 min), 72°C (2 min)
Terciaria		72°C (5 min)

Los oligonucleótidos degenerados utilizados fueron diseñados sobre la secuencia del motivo 1 del centro activo del enzima Geranil Geranil pirofosfato sintasa (GGPP sintasa) (Fig. 14).

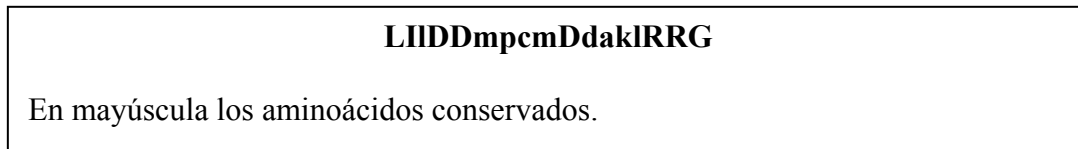


Figura 14: Motivo 1 del enzima GGPP sintasa de los organismos próximos a *G. jacobaea*.

El motivo 1 de la GGPP sintasa fue extraído de la base de datos PROSITE Database of protein families and domains (www.expasy.org/prosite).

Los oligonucleótidos específicos fueron diseñados sobre la secuencia del transposón EZ::TN™ <KAN-2> (Epicentre) (Tabla 6).

El alineamiento de las secuencias de la geranil-geranil piro sintetasa fue realizado con el programa MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004).

Los oligonucleótidos degenerados y los oligonucleótidos específicos fueron diseñados empleando el paquete informático Primer Premier v5.0 (PREMIER Biosoft Internacional) (Tabla 6).

Tabla 6: Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de la TAIL-PCR.

Oligonucleótidos específicos		Oligonucleótidos degenerados	
Secuencia		Secuencia	
FP-1	5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3'	AD-1	5'-GTNGARGCNYTNCAAYGC - 3'
FP-2	5'- TTGGTTGTAACACTGGCAGAGCA-3'	AD-2	5'- YGAYYTNCNGCNATGG -3'
FP-3	5'- ATCCTATGGAAGCTCGGTGAG-3'	AD-3	5'- GCRTGNARNGCYTCNAC-3'
RP-1	5'-GCAATGTAACATCAGAGATTTGAG-3'	AD-4	5'- GCNGGNARRTCRTCRTG-3'
RP-2	5'- CGCGAGCCCATTATACCCATAT-3'		
RP-3	5'- ACACTGCCAGCGCATCAACAATA-3'		

Los oligonucleótidos de la serie FP se combinaron con AD-3 y AD-4 mientras que los de la serie RP se combinaron con AD-1 y AD-2 tal como se describe en la Tabla 7.

Tabla 7: Combinaciones empleadas en los distintos ciclos.

Reacción Primaria	Reacción Secundaria	Reacción Terciaria
FP-3 y AD-3	FP-2 y AD-3	FP-1 y AD-3
FP-3 y AD-4	FP-2 y AD-4	FP-1 y AD-4
RP-3 y AD-1	RP-2 y AD-1	RP-1 y AD-1
RP-3 y AD-2	RP-2 y AD-2	RP-1 y AD-2

Las mezclas de reacción empleadas fueron las descritas en la Tabla 8.

Tabla 8: Mezclas de reacción.

Producto	Reacción	Reacción	Reacción
	Primaria	Secundaria	Terciaria
Tampón PCR (Takara Shuto Co.)	1 x	1 x	1 x
Cloruro de Magnesio (Takara Shuto Co.)	2.5 mM	2.5 mM	2.5 mM
Oligonucleótido específico	0.2 μ M	0.2 μ M	0.2 μ M
Oligonucleótido degenerado	2 μ M	2 μ M	2 μ M
Takara Taq polimerasa (Takara Shuto Co.)	2 U	2 U	2 U
Mezcla de dNTPs (Takara Shuto Co.)	2 mM	2 mM	2 mM
DNA	100 ng DNA <i>G. jacobaea</i> MV-26 T45	Dilución 1:40 de la Reacción Primaria	Dilución 1:20 de la Reacción Secundaria
Agua doblemente desionizada	Hasta 20 μ l	Hasta 20 μ l	Hasta 50 μ l

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis (70 V, 400 mA, 90 min) en geles de agarosa al 1 % y 1 mg/ml de bromuro de etidio. Los geles de agarosa se visualizaron en un transiluminador (Fotodyne UV-21).

Los productos específicos fueron purificados con el kit PCR Preps (Promega).

Las secuencias amplificadas se secuenciaron en Sistemas Genómicos S. L.

3.5: Análisis de las secuencias.

Las secuencias de DNA obtenidas a partir de la reacción de la Tail-PCR se analizaron con distintos paquetes informáticos:

-El análisis de la secuencia recibida y la transducción de la secuencia nucleotídica a la secuencia aminoacídica se realizó con el programa informático VectorNTI v 9.0 (Informax).

-Se empleó la herramienta BLAST del NCBI para comparar la secuencia obtenida con las bases de datos existentes (Altschul *et al.*, 1997).

-Una vez obtenida la secuencia aminoacídica, se utilizaron las herramientas InterProScan, del European Bioinformatics Institute, y PROSITE (www.expasy.org) para analizar los motivos conservados presentes en la misma.

-El paquete BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999) se utilizó para comparar la secuencia obtenida con las secuencias de la GGPP piro sintetasa de otros organismos. Este mismo programa se empleó para llevar a cabo el estudio filogenético de la secuencia.

-el programa DeepView/Swiss-PdbViewer v. 3.7 (www.expasy.org/spdbv) fue empleado durante el modelado tridimensional de la secuencia de aminoácidos obtenida.

4.- Métodos de estudios de biodegradación.

4.1. Reducción de nitratos.

G. jacobaea se cultivo en medio AR hasta alcanzar la fase estacionaria. A continuación, se inoculó el medio del nitrato. Los tubos se mantuvieron durante 7 días a 37°C.

Pasado este tiempo, se dispensó sobre el cultivo el reactivo del nitrato (1 vol/vol 50 % HCl, 2 vol/vol 0.2 % sulfamida, 2 vol/vol 0.1 % n-1-naphthylethyenediamedihydrochloride). Se produjo una reacción coloreada que permitió diferenciar las reacciones positivas de las reacciones negativas. Como control positivo, se empleó *E. coli*.

4.2. Utilización de cis-1,4-poliisopreno.

Al medio de cultivo MMS, se le añadieron fragmentos estériles de guantes de látex, lavados y autoclavados de 0.25 g.

A partir de un cultivo de *G. jacobaea* en fase estacionaria, se realizó la inoculación del medio MMS + látex. Estos cultivos se mantuvieron durante 7 días a 37 °C.

Como control negativo, se empleó medio MMS sin látex.

5.- Actividad lítica de *M. xanthus* 422 sobre *G. jacobaea*.

5.1. Medida de la actividad lítica de *M. xanthus* sobre *G. jacobaea*.

A un cultivo de *G. jacobaea* en fase estacionaria se le añadió 1 volumen de un cultivo de *M. xanthus* en fase estacionaria. Se mantuvo el cultivo mixto a 33 °C durante 24 h.

Se midió la D. O. ($\lambda= 600$ nm) del cultivo de *G. jacobaea* antes de la adición del cultivo de *M. xanthus* 422. Transcurrido el período de incubación, se hizo una nueva medición

de la D. O. y se estimó la reducción de la turbidez en el medio de cultivo (Fang *et al.*, 2002).

La reducción de la turbidez se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ decrecimiento} = [(Abs_0 - Abs_t) / Abs_0] * 100$$

donde Abs₀ es la D.O. inicial.

Abst es la D.O. a tiempo t

$$t = 24 \text{ h.}$$

La cantidad de enzima necesario que causa el 50 % de reducción en la absorbancia en 1 hora se define como 20 U líticas / ml.

5.2. Estudio de la actividad bacteriolítica de *M. xanthus* sobre *G. jacobaea*.

Se cultivó *M. xanthus* hasta alcanzar la fase estacionaria.

Una parte del cultivo se centrifugó a 4°C, 15000 rpm durante 15 min. El sobrenadante del medio de cultivo se filtro a través de filtros de celulosa de 0.45 µm ø_{poro}. A continuación, se filtró a través de filtros de 0.22 µm ø_{poro}. Todo el proceso de filtración se llevó a cabo a 4°C para evitar la pérdida de actividad bacteriolítica.

Se sembraron placas de CTT con *G. jacobaea* MV-26 sobre las que se habían realizado pocillos. En algunos pocillos, se depositaron 150 µl de sobrenadante filtrado procedente del cultivo de *M. xanthus*. En el resto de los orificios, se depositaron 150 µl del cultivo de *M. xanthus* sin filtrar.

Las placas se mantuvieron a 33 °C para ver donde aparecían halos de inhibición del crecimiento de *G. jacobaea*.

5.3. Estudio de la actividad del antibiótico TA producido por *M. xanthus* sobre *G. jacobaea*.

La extracción del antibiotico TA se llevó a cabo según el método descrito por Varon *et al.* (1992). Se tomaron 5 ml de un cultivo de *M. xanthus* en fase estacionaria y se le añadieron 18.7 ml de metanol:cloroformo (2:1 vol:vol). La mezcla se agitó y se incubó durante 1 h y media a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó durante 5 min a 10000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se añadieron 6.25 ml de cloroformo y 6.25 ml de agua. Tras una nueva centrifugación se recuperó la fase que contenía el cloroformo. Esta fase se secó al vacío y en frío y el residuo se resuspendió en 100 µl de etanol. Este volumen de etanol se dispense sobre filtros de papel.

Se sembraron placas de medio CTT con *G. jacobaea* y se dispensaron en la placa los filtros impregnados con la suspensión del antibiótico TA. Las placas se mantuvieron a 33°C para comprobar la aparición de posibles halos de inhibición del crecimiento de *G. jacobaea*.

4.- RESULTADOS

4.1. Viabilidad de *G. jacobaea*.

G. jacobaea fue capaz de crecer en los distintos medios empleados excepto en aquellos que contenían melaza. Así mismo, fue capaz de crecer en presencia de las máximas concentraciones empleadas de penicilina G, glicocola, isoniazida y ácido nalidíxico. Además, pudo crecer indistintamente en medios de cultivo donde la fuente de carbono fue sacarosa, glucosa o el cis-1,4-poliisopreno. Asimismo, fue capaz de soportar ciclos largos de ultrasonidos e intensidades de corriente altas (2.5 kV, 200 Ω). *G. jacobaea*, por último, mostró sensibilidad en medios con ampicilina y kanamicina.

4.2. Transformación de *G. jacobaea* mediante conjugación.

La conjugación de *G. jacobaea* con *E. coli* s17-1 empleando el protocolo de conjugación descrito fue ineficaz. Aún aumentando los periodos de incubación de la mezcla de conjugación o variando la proporción de células no hubo indicios de crecimiento de *G. jacobaea* en placas de TSA con ácido nalidíxico y kanamicina.

4.3. Obtención de células electrocompetentes de *G. jacobaea*.

La penicilina G, la glicocola o la isoaniazida a diferentes concentraciones, no fueron capaces de actuar sobre la pared de *G. jacobaea* cuando se emplearon por separado (Tabla 9). Estas sustancias, cuando se combinaron con ciclos de ultrasonidos, tampoco fueron eficaces (Tabla 10).

Cuando se combinaron glicocola e isoanizada en el medio de cultivo tampoco fue posible obtener células electrocompetentes. Los mismos resultados se obtuvieron cuando se combinó la penicilina G con la isoniazida.

Finalmente, fue posible obtener células electrocompetentes de *G. jacobaea* cuando se añadieron al medio de cultivo glicocola al 1,6 % y 100 µg/ml de isoniazida y sometiendo, previamente, a las células, a lavados con glicerol al 10 % y ciclos de ultrasonidos de 15 min.

Sin embargo, cuando se complementó el tratamiento con penicilina G e isoniazida con ciclos de ultrasonidos, no se obtuvieron células de *G. jacobaea* susceptibles de ser transformadas mediante electroporación (Tabla 11).

El grado de competencia de *G. jacobaea* fue diferente según la fase de crecimiento en la que se encontraba el cultivo celular. Así, los mejores resultados se obtuvieron cuando se trabajó con cultivos que se encontraban en la fase exponencial de crecimiento bacteriano ($D.O._{\lambda=600 \text{ nm}}$ entre 0.5 y 0.6). Además, se vio que aquellas células que se cultivaron a 30 °C presentaron un mayor grado de electrocompetencia que las cultivadas a 37 °C.

La fuente de carbono empleada en el medio de cultivo, sacarosa o glucosa, no influyó sobre el grado de electrocompetencia de *G. jacobaea*.

Cuando se incubaron las células de *G. jacobaea* en hielo durante 1 h, después del tratamiento con ultrasonidos, se aumentó la eficacia del proceso de obtención de células electrocompetentes (Tabla 12).

Tabla 9: Efecto de las distintas sustancias sobre el grado de competencia de *G. jacobaea*.

Tratamiento:	Penicilina G (U/ml)					Glicocola (%)			Isoniazida (µg/ml)			
Concentración	0	1	2	5	10	0	1	1,6	2	0	50	100
Transformación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 10: Efecto de las distintas sustancias combinadas con ultrasonidos sobre el grado de competencia de *G. jacobaea*.

Tratamiento:	Penicilina G (U/ml) + Ultrasonidos (15 min)					Glicocola (%) + Ultrasonidos (15 min)			Isoniazida (µg/ml) + Ultrasonidos (15 min)			
Concentración	0	1	2	5	10	0	1	1,6	2	0	50	100
Transformación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 11: Efecto de las combinaciones de los posibles tratamientos sobre el grado de competencia de *G. jacobaea* . (Veiga-Crespo *et al.*, 2005b)

Tratamiento	Penicilina G (10 U/ml) + Isoniazida (100 µg/ml)		Glicocola (1.6%) + Isoniazida (100 µg/ml)	
Ultrasonidos (15 min)	+	-	+	-
Transformación	-	-	+	-

+ = positiva / - = negativa

Tabla 12: Efectos de las condiciones de cultivo sobre el grado de electrocompetencia de los cultivos de *G. jacobaea*.

	Efecto
Fase de crecimiento de cultivo bacteriano	+
Temperatura de crecimiento del cultivo	+
Fuente de carbono del medio de cultivo	-
Incubación en hielo	+

+ = efecto sobre el grado de competencia / - = sin efecto

Las condiciones óptimas de cultivo de *G. jacobaea* para obtener células susceptibles de transformación fueron de 30 °C hasta la fase exponencial del crecimiento bacteriano e incubación en hielo durante una hora antes de los tratamientos con ultrasonidos.

4.4. Electroporación de *G. jacobaea*.

Se estudió el efecto de la resistencia y el voltaje, mientras que la capacitancia se mantuvo constante (Tabla 13).

Cuando se trabajó con el plásmido pRE-7, la mayor eficacia de transformación se obtuvo cuando se aplicó el mayor voltaje y la menor resistencia: 2.5 kV y 200 Ω . Al transformar las células con pDBMCS-2b, sin embargo, una resistencia de 600 Ω proporcionó mayor número de transformantes, manteniéndose el voltaje a 2.5 kV.

No fue posible obtener transformantes de *G. jacobaea* cuando se trabajó con el plásmido pUC18 (Tabla 13).

Tabla 13: Efecto de las condiciones de electroporación sobre la eficacia de transformación de *G. jacobaea*.

	Voltaje (kV)	Resistencia (Ω)	Transformación*
pRE-7	2.5	200	60-75
	2.5	600	40
pDBMCS-2b	2.5	200	20-30
	2.5	600	50-60
pUC18	2.5	200-600	0

(* número de UFC obtenidas por cada 100 ng de DNA plasmídico añadidos).

4.5. Recuperación del DNA plasmídico a partir de células de *G. jacobaea* transformadas.

El kit comercial QIApreps Spin Miniprep (Qiagen), el método de Birnboim y Doly (1979) ó el método de Sambrook *et al.* (1989) no permitieron recuperar el DNA plasmídico a partir de las células de *G. jacobaea* transformadas con pRE-7 o pDBMCS-2b.

Los otros métodos descritos sí permitieron la extracción del DNA plasmídico. Aún así, el método de Takai *et al.* (1995), modificado tal como se describe en Materiales y Métodos, y el método de Kieser (1984) no permitieron visualizar bandas típicas de DNA plasmídico al someter a electroforesis las muestras extraídas directamente de *G. jacobaea*. Sin embargo, al aplicar el método de Hoffman y Winston (1987), sí se visualizó la configuración típica de un plásmido sin digerir al correr las muestras de plásmido extraídas a partir de células de *G. jacobaea*. Así todo y pese a que estos métodos permitieron recuperar el DNA plasmídico, no demostraron ser métodos muy eficaces ya que arrastraban DNA genómico (Fig. 15).

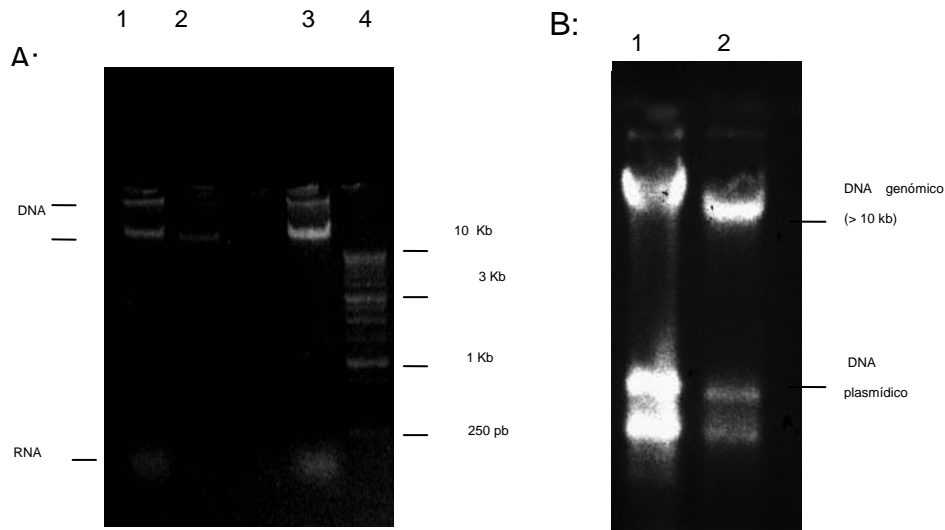


Figura 15: Aislamiento de plásmidos a partir de células transformadas de *G. jacobaea*.

A: extracciones plasmídicas del vector pRE-7 (calles 1 y 2) y del vector pDBMCS-2b (calle 3) realizadas mediante el método de Takai *et al.* (1995) modificado. Calle 4: Marcador de peso molecular. B: Extracciones plasmídicas del vector pRE-7 (calle 1) y del vector pDBMCS-2b (calle 2) obtenidos mediante el método de Hoffman y Winston (1987).

Para aislar el DNA plasmídico de los restos de DNA genómico se llevó a cabo una transformación de *E. coli* con las muestras extraídas a partir de *G. jacobaea*. Al extraer los plásmidos pRE-7 y pDBMCS-2b a partir de *E. coli* por el método de la lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), sí fue posible recuperar los plásmidos esta vez limpios de restos de DNA genómico.

Se analizó el estado de conservación de los plásmidos pRE-7 y pDBMCS-2b recuperados a partir de las células de *G. jacobaea* y *E. coli*. Se estudió el tamaño y la integridad del sitio de clonaje múltiple.

Al digerir cada uno de los plásmidos con enzimas de punto de corte único, en todos los casos estudiados, se obtuvo una única banda del tamaño adecuado (Fig. 16). Se mantenía, pues, la integridad del vector.

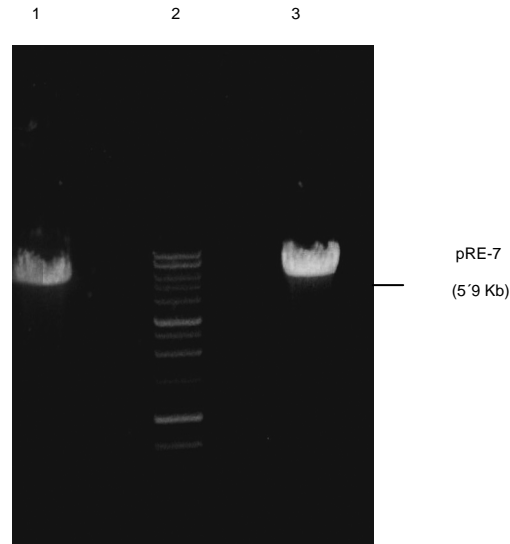


Figura 16: Análisis de los plásmidos obtenidos a partir de células de *G. jacobaea*, previo paso por *E. coli*. pRE-7 extraído a partir de *E. coli* y digerido con *Xba*I (calle 1) y *Eco*RV (calle 3). Calle 2: Marcador de peso molecular de 1 Kb.

4.6 Transposición de *G. jacobaea*.

Fue posible transformar las células de *G. jacobaea* con el transposón EZ::TNTM<KAN-2>. Los controles negativos realizados mostraron que *G. jacobaea* no desarrolló resistencia a kanamicina por lo que todas las colonias obtenidas eran colonias transformadas.

Se realizaron distintos ensayos de transposición. Los clones obtenidos presentaban variaciones en su capacidad de formar agregados, en su pigmentación y en la velocidad de crecimiento (Fig. 17).

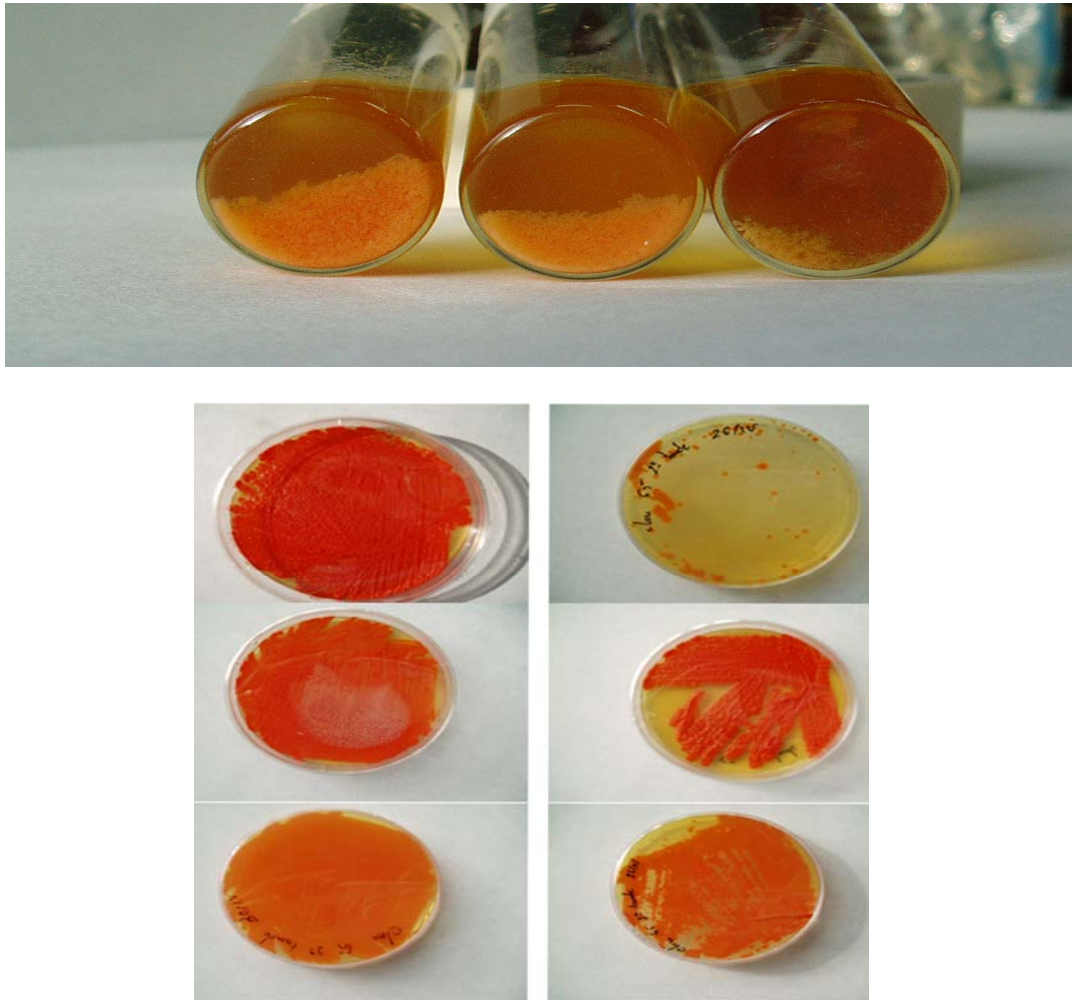


Figura 17: Clones mutantes obtenidos a partir de la transposición de *G. jacobaea* MV-26.

4.7. Análisis por HPLC de los clones obtenidos mediante transposición de *G. jacobaea*.

Los clones que presentaban variación de color con respecto a la cepa MV-26 se utilizaron para hacer un análisis cualitativo de producción de pigmentos carotenoides.

Los tiempos de retención para el β -caroteno y la cantaxantina fueron establecidos en 2.3 y 2.577 min, respectivamente.

Tras 7 días de cultivo de los clones mutantes, y por ser este el momento en el que *G. jacobaea* MV-26 alcanza el pico de máxima producción de cantaxantina en medio YPD, como se verá en la sección 4.12, se realizó la extracción de los pigmentos por el método del hexano-fracción de petróleo (Fig. 18)

A simple vista, se observaron notables variaciones entre los diferentes clones en cuanto a la coloración de los pigmentos diluidos en hexano (Fig. 18).

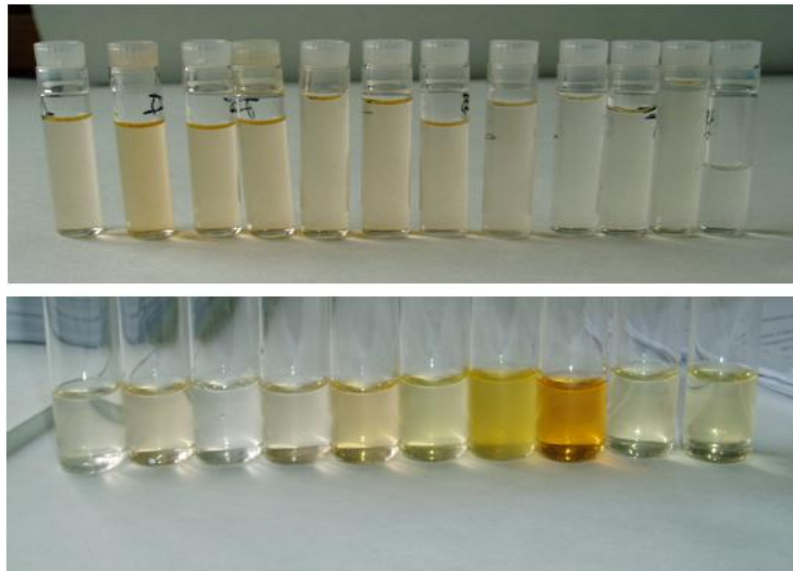


Figura 18: Pigmentos extraídos en hexano-fracción de petróleo a partir de los clones mutantes de *G. jacobaea* MV-26 obtenidos por transposición.

Un análisis cualitativo por HPLC reveló variación en el patrón de carotenoides entre el mutante hiperproductor MV-26 y algunos de los clones obtenidos tras la inserción del transposón (Fig. 19).

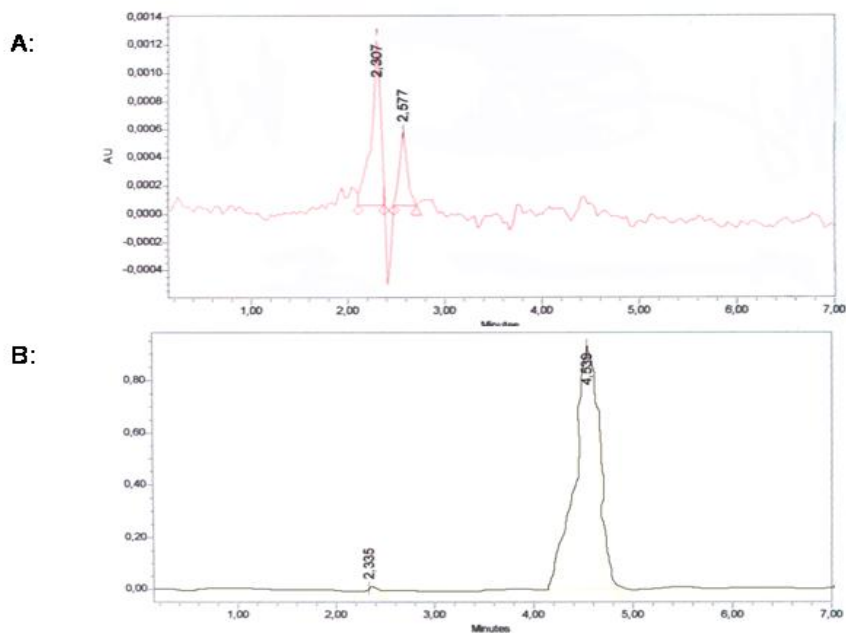


Figura 19: A: Patrón de producción de carotenoides de *G. jacobaea* MV-26. B: Patrón de producción del clon mutado por transposición MV-26-T45.

4.8. Aplicabilidad del método de transformación a otras Corynebacterias.

Fue posible obtener transformantes de *G. bronchialis* y *B. lactofermentum* mediante electroporación (2.5 kV, 200 Ω and 25 μ F) aplicando el protocolo de obtención de células electrocompetentes desarrollado para *G. jacobaea* (Tabla 14) (Veiga-Crespo *et al.*, 2005b).

Tabla 14: Eficacia de la transformación en otras Corynebacterias empleando el método de obtención de células electrocompetentes diseñado para *G. jacobaea*. (Veiga-Crespo *et al.*, 2005b).

Microorganismo + Plásmido empleado	Voltaje (kV)	Resistencia (Ω)	Transformación*
<i>G. bronchialis</i> + pRE-7	2.5	200	40-50
<i>B. lactofermentum</i> + pEMel-1	2.5	200	20-30

(* número de UFC obtenidas por cada 100 ng de DNA plasmídico añadido).

4.9. PCR

No fue posible amplificar el centro activo del enzima fitoeno sintasa de *G. jacobaea* utilizando los oligonucléotidos diseñados a partir de las secuencias existentes en las bases de datos del gen de la fitoeno sintasa de *M. tuberculosis* o de *C. glutamicum*.

4.10. TAIL-PCR.

El método de extracción de DNA genómico diseñado para *G. jacobaea* permitió recuperar el DNA genómico a partir de las células del clon mutado por transposición MV-26-T45 (Fig. 20). Debido a los productos empleados durante la extracción, además del DNA se arrastraron pigmentos, lo cual dificultó posteriores procesos de cuantificación de DNA, necesarios para llevar a cabo las reacciones de PCR.



Figura 20: DNA genómico extraído a partir de las células del clon de *G. jacobaea* mutado por transposición MV-26-T45.

Mediante el esquema de ciclos y super-ciclos y las combinaciones de oligonucleótidos mencionados en Materiales y Métodos fue posible amplificar fragmentos de DNA específicos a partir del DNA genómico extraído a partir del clon de *G. jacobaea* MV26-T45 mutado por transposición.

La combinación de los oligonucleótidos FP diseñados a partir del transposón y el oligonucleótido degenerado AD-4 diseñado a partir del motivo 1 de la GGPP sintasa fue la que permitió obtener un único fragmento de DNA en la tercera reacción de PCR. Las otras combinaciones de oligonucleótidos descritas en Materiales y Métodos sólo mostraron hibridaciones inespecíficas que desaparecieron a medida que avanzaba el proceso (Fig. 21).

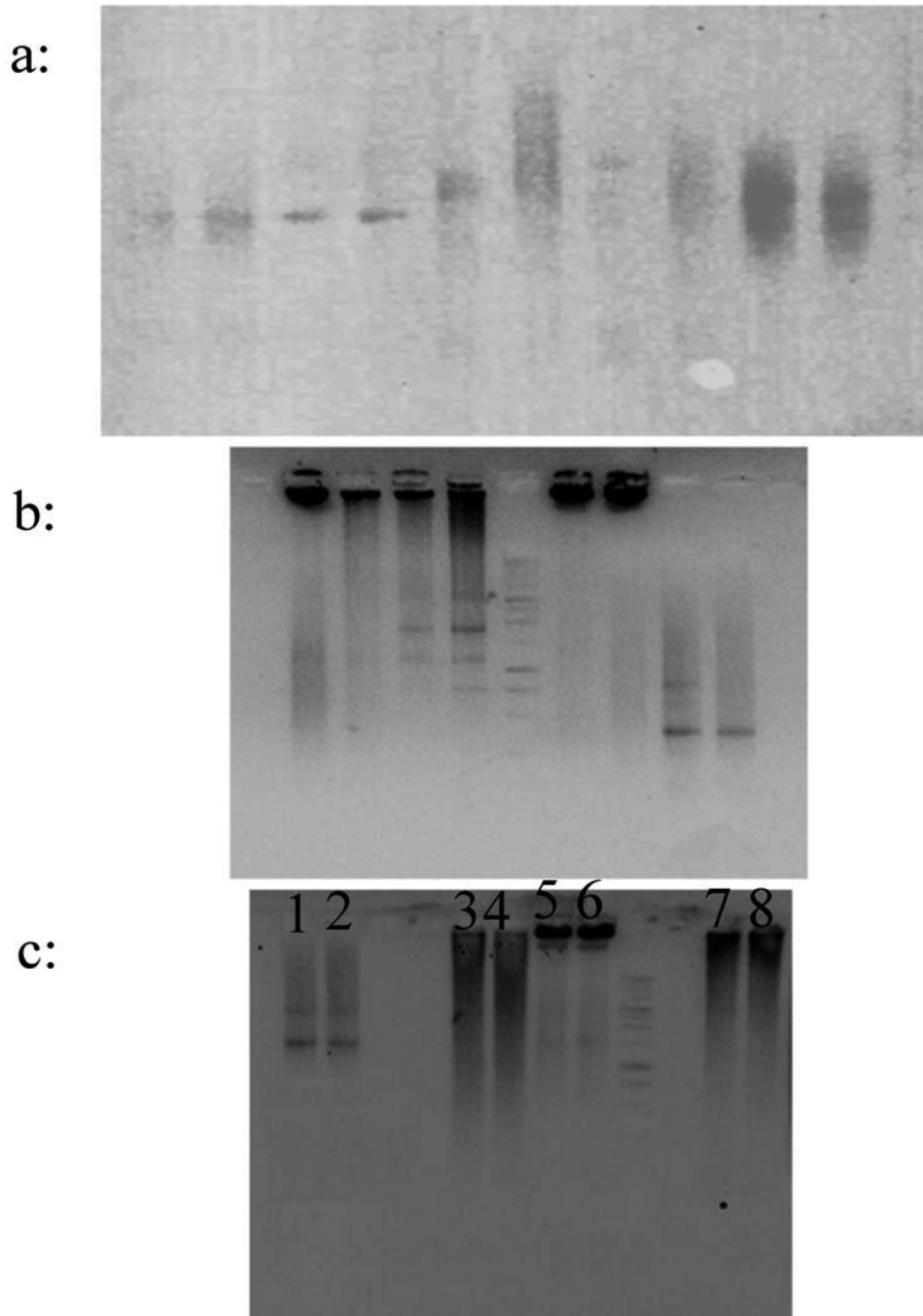


Figura 21: Ampliaciones obtenidas mediante la técnica de TAIL-PCR; a: Reacción Primaria; b: Reacción Secundaria; c: Reacción Terciaria. En las calles 1 y 2 se observa el producto específico amplificado entre 1500 y 2000 pb.

El fragmento obtenido presentaba un tamaño entre 1500 y 2000 pb.

4.11. Secuenciación y análisis del fragmento de DNA obtenido mediante TAIL-PCR.

Tras la secuenciación del fragmento obtenido, se observó que el amplicón contenía la secuencia del transposón EZ::TNTM <KAN-2> empleado y 282 nucleótidos que codificaban una proteína (Fig. 22).

1	ATGGCCCGCA	GCCTACTGGC	GGAGCGCGTG	GCATGTCAAT
	CACCAGCGAC	GCCTCGTTCT	TCCACGACAT	CGCGATTTCA
	AGATGAGATC	ACGCTAGCTG		
101	ACTGGAGGGC	GGCAAGCGCC	TTTCGCTATC	TCAACAGTGC
	AGCAGGATGC	GTTCTGTGG	TGCGGGGAGA	CGGCGGCGGC
	CCTGCGGGTC	GGGTGGCAA		
201	GTTAGCTTCC	TCGGTTTGC	CGCTCATCCA	TGACGATGTG
	ATGGACCGCT	CGCGGCTTCG	CCGGGGGAAG	CCTGCCATGC
	AC			

Figura 22: Secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA de *G. jacobaea* obtenido mediante TAIL-PCR.

Se realizó una comparativa de esta secuencia contra las bases de DNA existentes y se obtuvo que dicha secuencia presentaba homología con secuencias del gen CrtE de *Streptomyces* y *Corynebacterium*.

A continuación, se obtuvo la secuencia aminoacídica de 94 aminoácidos (Fig. 23).

1	MARSLLAERV	ACQSPATPRS	STTSRFQDEI	TLADWRAASA
	FRYLNSAAGC			
51	VPVVRGDGGG	PAGRGGKLAS	SVCALIHDDV	MDRSRLRRGK
	PAMH			

Figura 23: Secuencia aminoacídica obtenida a partir del fragmento de DNA de *G. jacobaea* obtenido mediante TAIL-PCR.

Con la secuencia proteica se llevó a cabo un nuevo análisis de homología empleando las bases de proteínas. Se observó que dicha secuencia presentaba una homología con GGPP sintetas de *Streptomyces griseous*, *Corynebacterium glutamicum*, *Mycobacterium avium*,

A continuación, se llevó a cabo un análisis de los motivos conservados presentes en la proteína obtenida (Fig. 24).

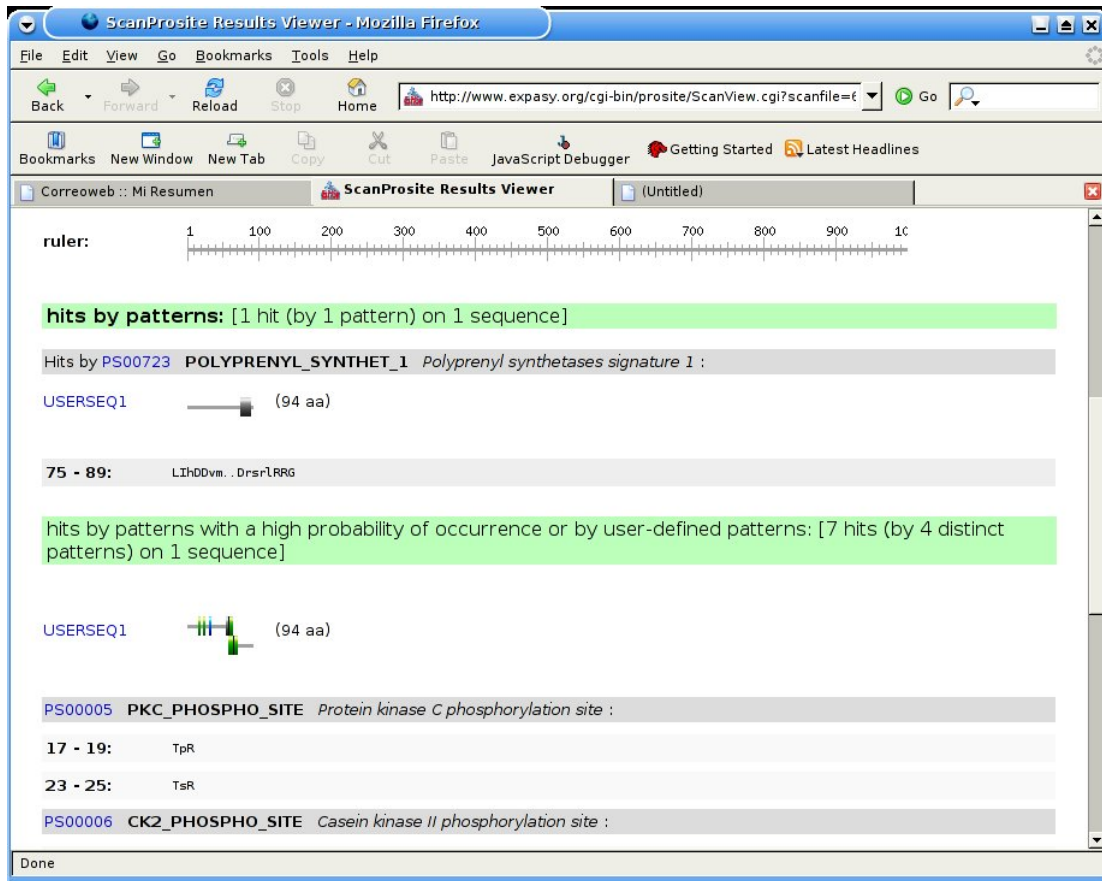


Figura 24: Análisis de los motivos conservados de la secuencia de la GGPP sintasa obtenida a partir de DNA de *G. jacobaea* mediante TAIL-PCR.

Este análisis permitió comprobar que la secuencia obtenida presentaba el motivo conservado 1 de la GGPP sintasa.

A continuación, se llevó a cabo un alineamiento de la secuencia proteica obtenida con las secuencias de las proteínas codificadas por los genes crtE existentes en las bases de datos empleando el método de análisis ClustalW (Fig. 25).

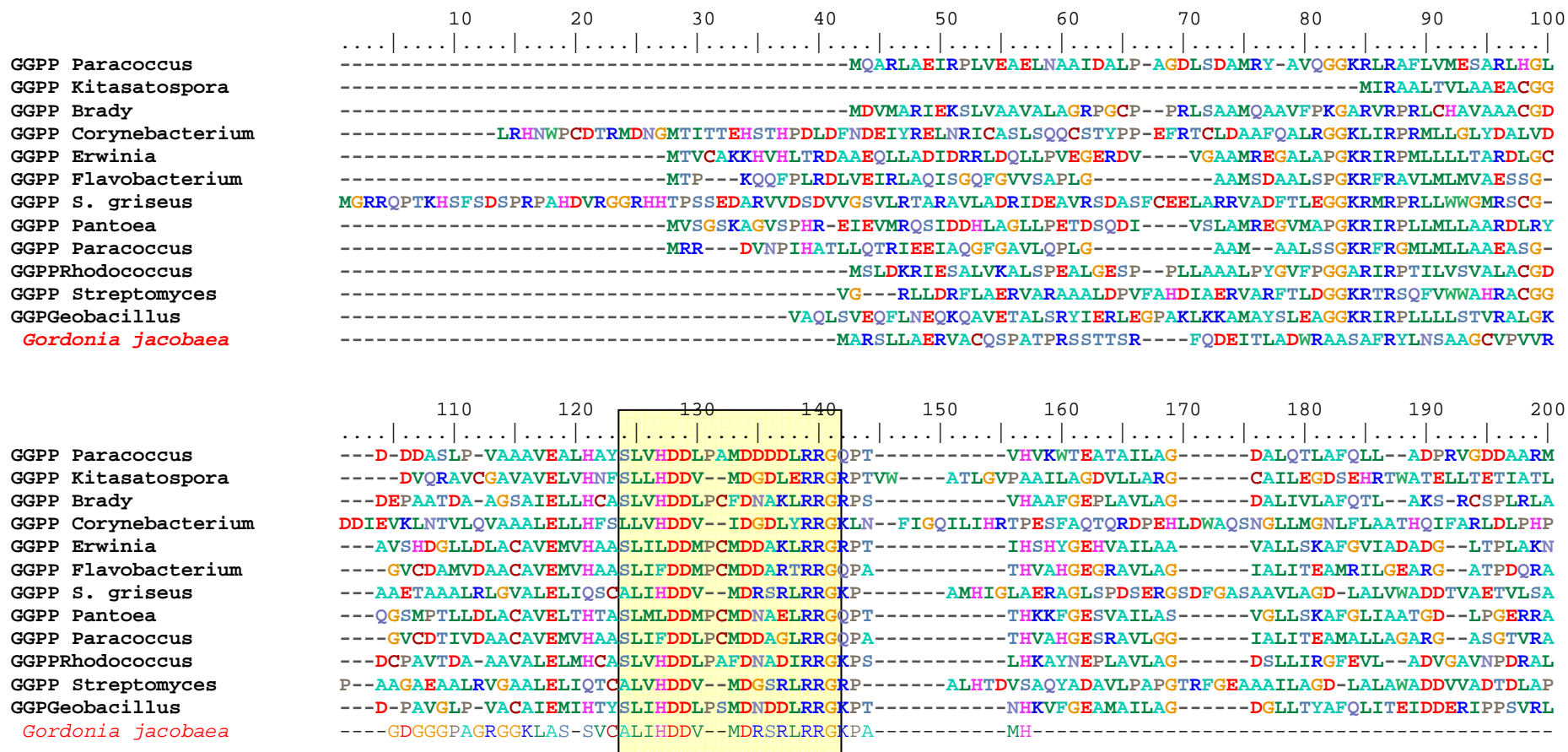


Figura 25: Alineamiento de las secuencias de las proteínas codificadas por el gen crtE encontradas en las bases existentes y la secuencia obtenida a partir del DNA de *G. jacobaea* por TAIL-PCR. Recuadrado aparece el motivo 1 de la GGPP piro sintasa.

A continuación, se llevó a cabo un estudio filogenético de las proteínas codificadas por el gen crtE y la secuencia amplificada a partir del DNA de *G. jacobaea* obtenido por TAIL-PCR mediante el método del Neighbor-Joining/UPGMA para secuencias aminoacídicas (Fig. 26) empleando el paquete informático BioEdit.

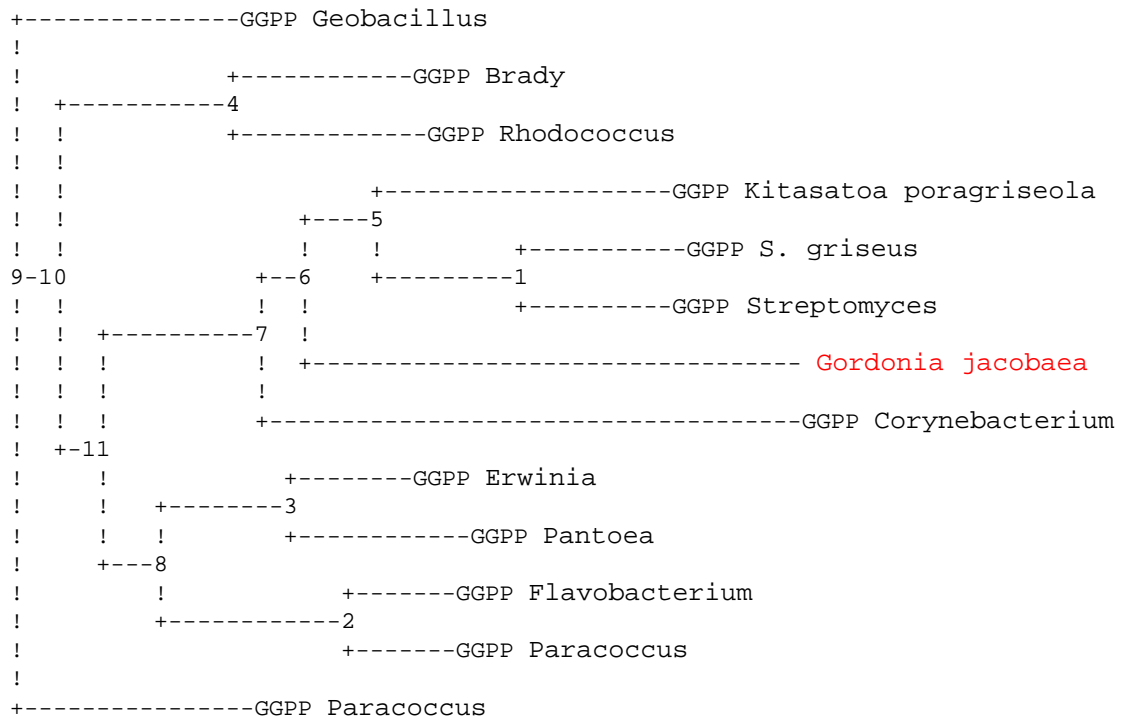


Figura 26: Árbol filogenético de la GGPP sintasa obtenido mediante el método Neighbor-Joining/UPGMA.

La secuencia aminoacídica obtenida fue modelada tridimensionalmente tomando como modelo de referencia la GGPP sintasa de *S. griseus* (Fig. 27 a y b). Se observó homología en la estructura tridimensional de ambas secuencias (Fig. 27c).

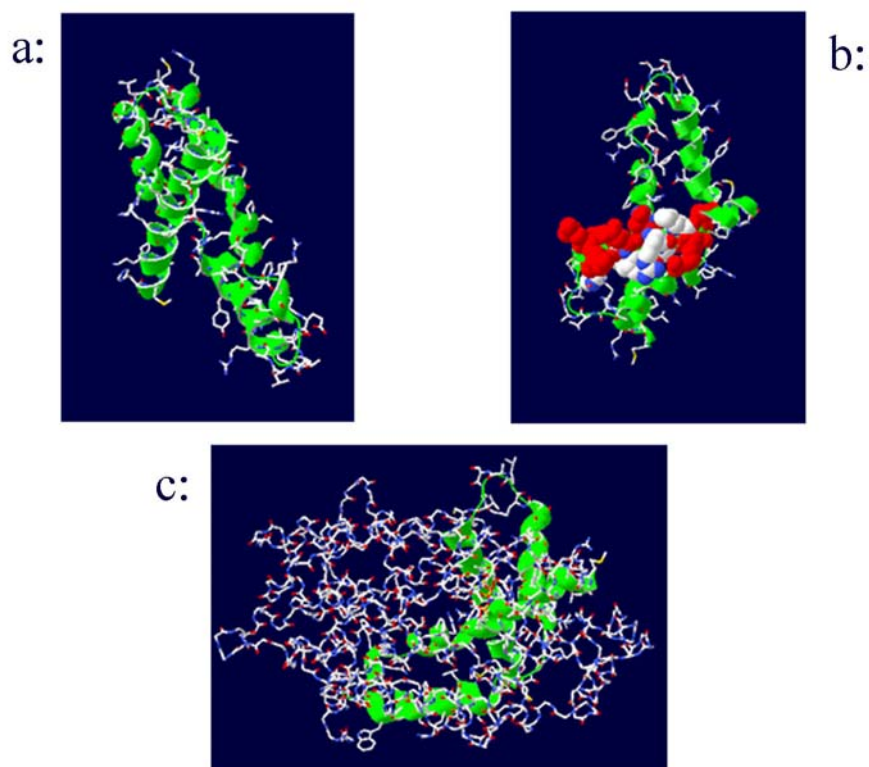


Figura 27: Modelado tridimensional de la secuencia de la GGPP sintasa obtenida a partir de *G. jacobaea*. a: Estructura tridimensional de la GGPP sintasa de *G. jacobaea*. b: Estructura tridimensional del Motivo 1 de la GGPP sintasa de la secuencia de *G. jacobaea*. c: Superposición de las estructuras tridimensionales de la GGPP sintasa de *S. griseus* y *G. jacobaea*.

4.12. Influencia del medio de cultivo sobre la producción de carotenoides.

Se vio que existían diferencias en la producción de carotenoides en función del medio de cultivo que se emplease para el cultivo de *G. jacobaea* MV-26 (Tabla 15). En los medios cuya base era la melaza, *G. jacobaea* fue incapaz de crecer (Fig. 28).



Figura 28: Cultivos de *G. jacobaea* en medios basados en soja y glucosa.

Tabla 15: Producción de cantaxantina en los diferentes medios analizados (Veiga-Crespo *et al.*, 2005a)

Medio de cultivo	Concentración de cantaxantina ($\mu\text{g/ml}$)
YPD	2140
BHIB	2489
TSB	1790
10 % glucosa / 0 % soja	1800
0 % glucosa / 0.5 % soja	2340
5 % glucosa / 1 % soja	1000
2 % glucosa / 1.5 % soja	2650
1.5 % glucosa / 2 % soja	3440
1 % glucosa / 5 % soja	13373

Cuando se analizó la producción de carotenoides durante el crecimiento se vio que, en general, el pico máximo de producción ocurría en la fase estacionaria de crecimiento si bien el momento en que se alcanzaba dicho pico variaba en función del medio de cultivo. El estudio de los controles negativos de los medios basados en soja permitió comprobar que el aumento de la producción de carotenoides no era debida al aporte extra de pigmentos procedentes de vegetal.

Se observó, en todos los casos, que la producción de β -caroteno era inversa y proporcional a la de cantaxantina (Fig. 29).

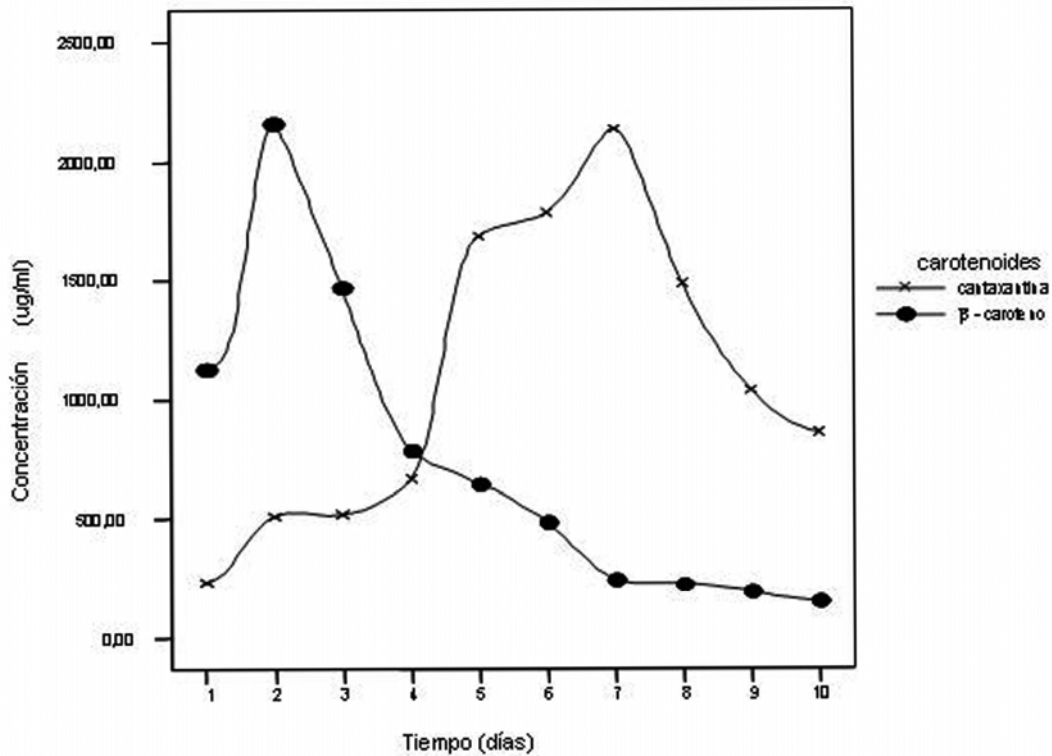


Figura 29: Evolución de los pigmentos producidos por *G. jacobaea* MV-26 en medio YPD.

Cuando se realizó el escalado de los cultivos a 1 l, se hizo una selección de aquellos medios de más bajo coste. Se descartó el medio con glucosa al 1 % y soja al 5 %, debido a su difícil manipulación, pese a que era el de mayor producción, y se eligieron el medio de soja al 0.5 % y glucosa al 0 % y el medio de al soja 2 % y al glucosa 1.5 % debido a que eran los más rentables y permitían una mejor manipulación. Se observó que el pico de máxima producción en los medios analizados se correspondía con lo observado en volúmenes menores de cultivo (Fig. 30).

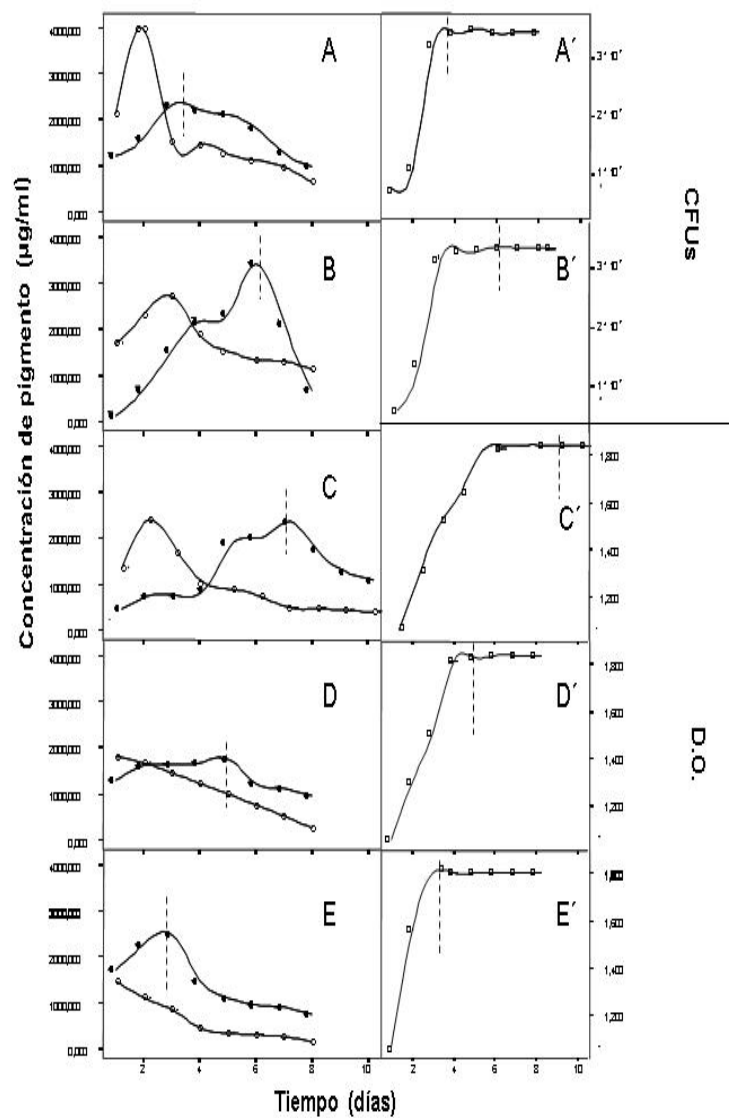


Figura 30: Producción de carotenoides de *G. jacobaea* MV-26 durante el crecimiento en diferentes medios de cultivo. En la columna de la izquierda se observa la producción de pigmentos: (○), β-caroteno y (●), cantaxantina en los diferentes medios de cultivo: A: soja 0.5 %; B: soja 2 %/glucosa 1.5 %; C: YPD; D: TSB; E: BHIB. En la columna de la derecha, se observa la curva de crecimiento bacteriano. La línea discontinúa indica el pico de máxima producción de cantaxantina (Veiga-Crespo *et al.*, 2005a). (CFUs = Unidades formadoras de colonias / D. O. = Densidad óptica).

El análisis estadístico confirmó los datos observados acerca de la influencia del medio de cultivo sobre la producción de carotenoides de *G. jacobaea* MV-26 (Tabla 16).

Tabla 16: Análisis estadístico de la influencia del medio de cultivo sobre la producción de carotenoides.

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
medio de cultivo	20,094	161	,000	3,370	3,04	3,70
Concentración de pigmento	9,810	161	,000	2022,515618	1615,38180	2429,64943

t = estadístico / gl = grados de libertad.

4.13: Aplicabilidad industrial de *G. jacobaea*.

4.13.1. Extracción con etanol.

Se observó que era posible la extracción del β -caroteno y la cantaxantina directamente a partir de un cultivo de *G. jacobaea* MV-26 tratando las células con etanol.

Al estudiar dicha extracción mediante TLC se observó que la primera extracción con etanol había de ser desechada ya que el patrón de bandeado de la muestra no se correspondía con las bandas observadas para los compuestos puros. Sin embargo, a partir de la segunda extracción con etanol del precipitado celular, aparecieron las bandas correspondientes al β -caroteno y la cantaxantina (Fig. 31).

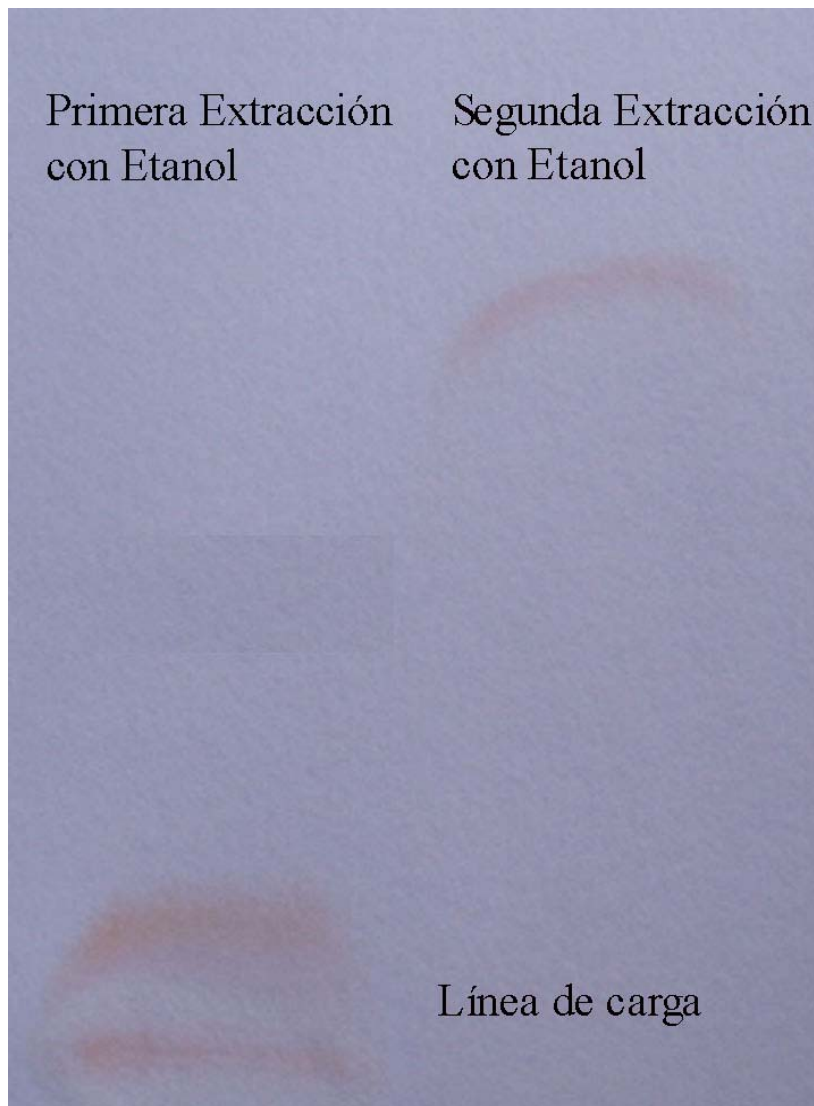


Figura 31: Resultado obtenido mediante la técnica de TLC realizada con los pigmentos extraídos a partir de un cultivo de *G. jacobaea* MV-26 empleando etanol.

4.13.2. Extractabilidad de los carotenoides de *G. jacobaea* mediante cultivo mixto con *M. xanthus*.

Cuando se analizó la cantidad de carotenoides extraídos a partir de *G. jacobaea* MV-26 tras su cultivo en presencia de *M. xanthus* 422, se observó que se producía un aumento en la extractabilidad con respecto al cultivo control de *G. jacobaea* sin la presencia de *M. xanthus*. Este aumento no se observaba, sin embargo, cuando el cultivo de *M.*

xanthus se añadía sobre un cultivo muerto de *G. jacobaea* MV-26. Incluso, en tal caso, se observó una disminución en la cantidad de cantaxantina extraída con respecto al cultivo control (Fig. 32). La mayor cantidad de cantaxantina se obtuvo tras 24 h de un cultivo mixto de *G. jacobaea* con *M. xanthus*.

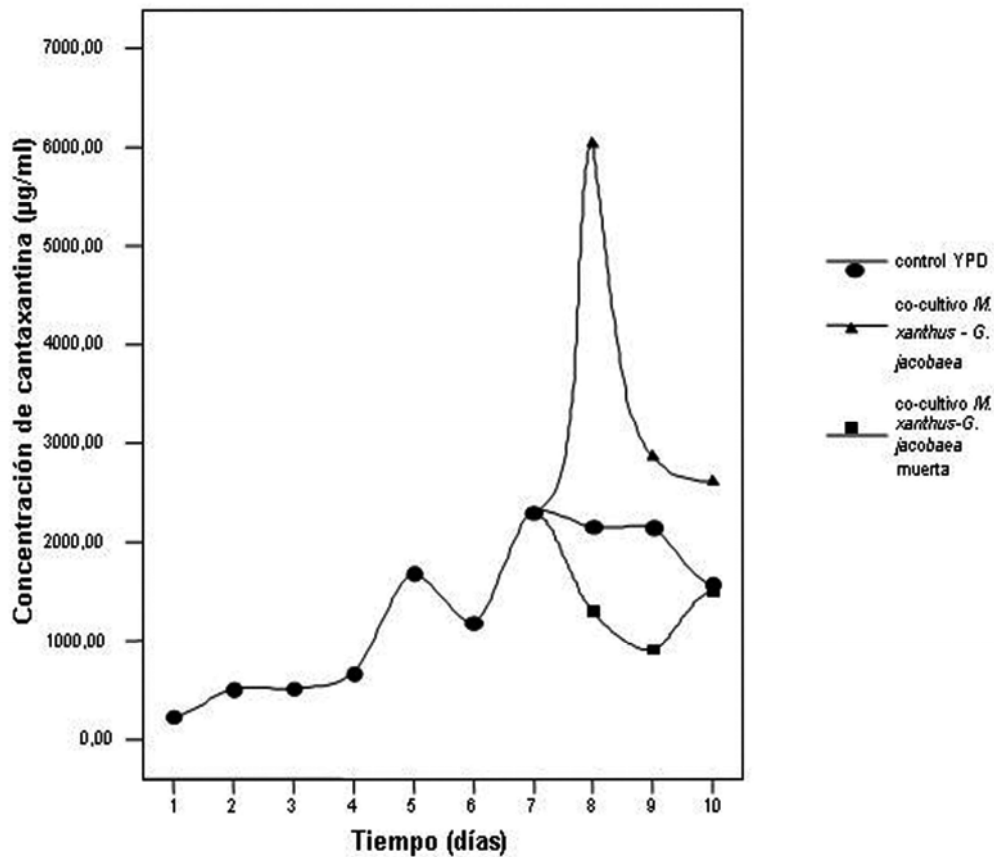


Figura 32: Cantidad de cantaxantina de *G. jacobaea* MV-26 extraído cuando se realizó cultivo mixto con *M. xanthus* 422.

Fue posible extraer el pigmento directamente a partir del cultivo mixto de ambos microorganismos empleando etanol como solvente orgánico.

Mediante TLC, y analizando los controles negativos, se pudo comprobar que el aumento de la extractabilidad no era debido a un aporte extra de carotenoides producidos por *M. xanthus* (Fig. 33).



Figura 33: Resultados de la técnica de TLC realizada con los pigmentos extraídos con etanol a partir del cultivo mixto de *G. jacobaea* y *M. xanthus*. A la izquierda: control negativo de *M. xanthus* 422. A la derecha: cultivo mixto de *G. jacobaea* MV-26 y *M. xanthus*.

El aumento en la cantidad de pigmentos extraídos a partir del cultivo mixto de *G. jacobaea* y *M. xanthus* fue de un 116,54 % con respecto al extraído a partir de un cultivo de *G. jacobaea*.

4.14. Concentración de los pigmentos extraídos a partir de *G. jacobaea* MV-26.

4.14.1. Concentración de los pigmentos empleando un rotavapor.

El análisis de los pigmentos extraídos a partir de *G. jacobaea* MV-26 sin concentrar permitió establecer un patrón de bandeo mediante TLC. Cuando se analizaron los pigmentos extraídos y concentrados empleando un rotavapor a distintas temperaturas (de 35 °C a 80 °C), la técnica de TLC mostró que los patrones no se mantenían y que se había producido una degradación de los pigmentos en todos los casos (Fig. 34).

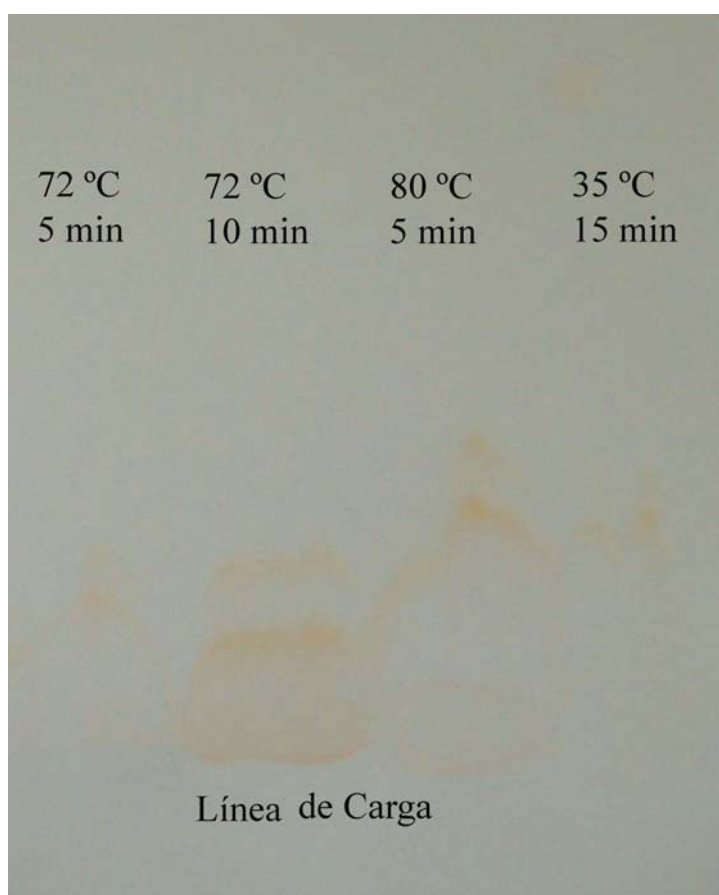


Figura 34: Análisis mediante TLC de los pigmentos concentrados en un rotavapor a diferentes temperaturas y tiempos.

4.14.2. Concentración de los pigmentos empleando un liofilizador.

La concentración de los pigmento extraídos a partir de *G. jacobaea* MV-26 empleando un liofilizador fue posible. El análisis mediante TLC de los pigmentos concentrados de esta forma mostró que, tras el proceso de concentración, se mantenía el patrón de bandas observado para las muestras de pigmentos sin concentrar.

No se observaba degradación de los pigmentos tras el proceso de liofilización, al contrario de lo que ocurría con las muestras sometidas a calor usando un rotavapor (Fig. 35).



Figura 35: Patrón de TLC de una muestra de carotenoides extraídos a partir de *G. jacobaea* MV-26 concentrados empleando un liofilizador.

4.15. Cultivo de *G. jacobaea* MV-26 en fermentador.

4.15.1. Cultivo de *G. jacobaea* MV-26.

El cultivo de *G. jacobaea* MV-26 en medio YPD en el fermentador Biostat C de 30 L se desarrolló bajo las condiciones mencionadas en Materiales y Métodos sin ningún tipo de problema de escalado.

El análisis de las muestras extraídas a lo largo de la fermentación mostró que el patrón de crecimiento y producción de carotenoides se mantenía con respecto a los trabajos llevados a cabo en matraces con agitación orbital.

Fue posible recuperar los pigmentos producidos por *G. jacobaea* MV-26 en el fermentador tratando las células con etanol y concentrarlos, posteriormente, en el liofilizador.

Los pigmentos, en este caso, se secaron y una parte del pigmento resuspendió en etanol. El análisis del pigmento resuspendido permitió comprobar que los pigmentos no habían sido dañados durante el proceso de liofilización pese a haber estado sometidos a este proceso durante 2 días.

Se obtuvieron 3.2 g de pigmento seco a partir de 20 L de un cultivo de 7 días de *G. jacobaea*.

4.15.2. Cultivo mixto de *G. jacobaea* MV-26 y *M. xanthus* 422 en un fermentador.

Se pudo realizar el cultivo mixto de *G. jacobaea* MV-26 y *M. xanthus* 422 empleando un fermentador de 20 L. En el fermentador se mantuvieron los valores observados en el cultivo mixto realizado en matraces con agitación orbital. Se observó que el pico máximo de actividad de *M. xanthus* sobre *G. jacobaea* se mantenía en 24 h de cultivo mixto como ocurría a menores volúmenes, siendo posible la extracción de los pigmentos empleando etanol (Fig.36).



Figura 36: Pigmento extraído con etanol a partir del cultivo mixto de *G. jacobaea* MV-26 y *M. xanthus* 422 en un fermentador Biostat C de 20 L.

También se pudo llevar a cabo la concentración de estos pigmentos empleando de un liofilizador sin que se produjese degradación. Se comprobó que la primera extracción de pigmento a partir del precipitado de células había que desecharla al igual que ocurrió anteriormente.

El peso seco del pigmento total recuperado fue de 4 g a partir de 20 L de un cultivo de 7 días de *G. jacobaea* y 24 h de cultivo mixto con *M. xanthus* empleando un fermentador Biostat C.

4.15.3. Rendimiento industrial del proceso de fermentación.

Se calculó cuánto pienso dedicado a alimentación animal (truchas) se podría elaborar a partir del pigmento extraído de *G. jacobaea* cultivada en un fermentador, así como a partir del cultivo mixto de *G. jacobaea* y *M. xanthus*. Para realizar este cálculo se tuvo en cuenta que la cantaxantina constituye el 80 % del total de carotenoides extraídos a

partir de *G. jacobea* MV-26 y que la ley de la Comunidad Europea sobre cantidades de aditivos colorantes permitidas en la elaboración de piensos animales (L284 D.O.C.E, 6.11.1999) establece que en piensos para la alimentación de truchas se puede añadir hasta un máximo de 100 mg/kg de cantaxantina en combinación con astaxantina, mientras que se permite añadir exclusivamente cantaxantina hasta un máximo de 25 mg/kg de pienso. Se estableció que:

-en el caso del cultivo de *G. jacobaea* del cual se recuperaron 3.2 g de pigmento seco, 2.56 g correspondieron a cantaxantina. Por lo tanto, se podrían elaborar 102 kg de pienso con cantaxantina como único aditivo colorante. Combinando cantaxantina y astaxantina en proporción 1:1 (50 mg de cada uno) se podrían elaborar 51.2 kg de pienso.

- en el caso del cultivo mixto de *G. jacobaea* y *M. xanthus*, de los 4 g de pigmento recuperado, 3.2 g correspondieron a cantaxantina. Se pudo establecer que con dicho cultivo se podrían elaborar hasta 128 kg de pienso con sólo cantaxantina o 64 kg de pienso si ésta se combinaba con astaxantina en una proporción 1:1.

4.16. Estudio de la capacidad de *G. jacobaea* de actuar como bio-degradador.

4.16.1. Reducción de nitratos.

Se observó que *G. jacobaea* MV-1 y MV-26 eran incapaces de reducir nitratos ya que no se obtuvo ninguna reacción positiva cuando se realizaron las pruebas descritas en Materiales y Métodos.

4.16.2. Utilización de cis-1,4-poliisopreno.

Se observó que *G. jacobaea* MV-1 y MV-26 eran capaces de utilizar el cis-1,4-poliisopreno ya que eran capaces de crecer en medios con este compuesto como única fuente de C (Fig. 37).



Figura 37: Crecimiento de *G. jacobaea* en medio MMS con cis-1,4-poliisopreno como única fuente de C.

No se observó crecimiento en los controles negativos.

4.17. Estudio de la actividad bacteriolítica de *M. xanthus* 422 sobre *G. jacobaea*.

4.17.1. Actividad lítica de *M. xanthus* sobre *G. jacobaea*.

Se midió la actividad lítica de *M. xanthus* sobre *G. jacobaea* tal como se describe en Materiales y Métodos.

La densidad óptica del cultivo de *G. jacobaea* antes de la adición de *M. xanthus* (Abs0) fue de 1.752. Transcurridas 24 h de cultivo mixto con *M. xanthus*, la densidad óptica del cultivo (Abst) fue de 1.342.

Tras aplicar la fórmula del cálculo de la actividad lítica:

$$\% \text{ decrecimiento} = [(Abs_0 - Abs_t) / Abs_0] * 100,$$

se obtuvo que el tanto por ciento de actividad lítica de *M. xanthus* 422 sobre *G. jacobaea* MV-26 era de 23.40.

4.17.2. Estudio de la actividad bacteriolítica de *M. xanthus* sobre *G. jacobaea*.

Se observó que aparecían halos de inhibición del crecimiento de *G. jacobaea* producidos tanto por sobrenadante de un cultivo de *M. xanthus* como por células de la mixobacteria (Fig. 38).



Figura 38: Inhibición del crecimiento de *G. jacobaea* producido por *M. xanthus*.

Izquierda: placa con césped de *G. jacobaea* y sobrenadante del cultivo de *M. xanthus*

422 en los pocillos. Derecha: placa con césped de *G. jacobaea* y cultivo de *M. xanthus*.

4.17.3. Estudio de la actividad del antibiótico TA producido por *M. xanthus* sobre *G. jacobaea*.

Se observó que aparecía halo de inhibición de crecimiento cuando sobre una placa en la que se había sembrado *G. jacobaea* se depositaba una alícuota del antibiótico TA extraído de *M. xanthus*.

Los controles negativos mostraron que esta inhibición no era debida a la presencia de etanol en la suspensión donde estaba contenido dicho antibiótico (Fig. 40).



Figura 39: Efecto del antibiótico TA de *M. xanthus* sobre el crecimiento de *G. jacobaea*.

5.- DISCUSIÓN

Manipulación genética de *G. jacobaea* MV-26.

El desconocimiento de los mecanismos moleculares del género *Gordonia* dificulta su manipulación genética.

De todos los factores analizados, se comprobó que la fase de crecimiento en la que se encuentra el cultivo bacteriano, la temperatura de crecimiento y el grado de interferencia en la biosíntesis de los ácidos micólicos y el péptidoglicano de la pared celular bacteriana influir en la obtención de células de *G. jacobaea* susceptibles de ser transformadas mediante electroporación.

El hecho de no observar variaciones en el grado de competencia entre la cepa silvestre MV-1 y la cepa hiperpigmentada MV-26 indicó que el proceso de mutagénesis llevado a cabo con la cepa MV-26 (de Miguel *et al.*, 2001) no había afectado a genes que intervienen en la síntesis de la pared celular. La cepa silvestre MV-1 no produce la cantidad de cantaxantina suficiente para hacer rentable su aplicación en la industria. El hecho de que los genes que codifican la síntesis de la pared no estuviesen alterados en la cepa hiperpigmentada MV-26 permitió extrapolar los métodos desarrollados para MV-1 a MV-26.

El efecto de la temperatura sobre la capacidad de electrocompetencia de las células de *G. jacobaea* podría estar relacionado con la variación en la distribución y composición de los ácidos micólicos de la pared bacteriana (Tomiyasu *et al.*, 1982; Kurusu *et al.*, 1990; Stratton *et al.*, 1993; van der Rest *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002; Stratton *et al.*, 2003). La temperatura óptima de crecimiento para obtener células competentes fue de 30 °C.

Se concluyó, asimismo, que los tratamientos de ultrasonidos son fundamentales para conseguir células electrocompetentes de *G. jacobaea*. Estos microorganismos tienden a crecer formando agregados celulares, de tal modo que los tratamientos de ultrasonidos favorecen la disgregación celular incrementándose, así, la eficacia de cualquier tratamiento aplicado sobre las células. Además, en la formación de los agregados celulares intervienen los ácidos micólicos de la pared por lo que se ha de hacer hincapié en la importancia de interferir sobre su síntesis para conseguir células electrocompetentes.

No es suficiente interferir únicamente en la síntesis del péptidoglicano de la pared bacteriana. Los tratamientos basados únicamente en la adición de penicilina G o glicocola fueron incapaces de originar células electrocompetentes. Tampoco es suficiente interferir exclusivamente en la síntesis de los ácidos micólicos ya que los tratamientos exclusivos con isoniazida también se revelaron ineficaces. Se extrae de este trabajo que es necesario actuar sobre ambos componentes de la pared celular.

El método más eficaz para conseguir células electrocompetentes de *G. jacobaea* consiste en la adición al medio de cultivo de glicocola (1.6 %) e isoniazida (100 µg/ml) y en detener el cultivo en la mitad de la fase exponencial del crecimiento bacteriano. Además, se observó, que la incubación en frío tras el ciclo de ultrasonidos favorece el debilitamiento de la pared bacteriana facilitando, posteriormente, la transformación.

Fue imposible conseguir la transformación de *G. jacobaea* mediante la conjugación bacteriana con *E. coli* s17-1 empleando el vector pK18mob. La ineficacia observada en el proceso de conjugación bacteriana se debió, probablemente, a la incapacidad de *G. jacobaea* de reconocer los orígenes de replicación del plásmido empleado. Sería, pues, necesario un mayor conocimiento de los plásmidos endógenos para poder considerar la

conjugación como una alternativa para la transformación de organismos del género *Gordonia*.

La transformación de *Gordonia jacobaea* fue posible mediante electroporación. Las condiciones en las que se llevó a cabo la electroporación afectaron al número de transformantes obtenidos. Así, la resistencia eléctrica empleada fue determinante. Se observó que los valores más bajos favorecían la entrada del plásmido pRE-7 mientras que aquellos más altos favorecían la entrada de pDBMCS-2b. Este hecho, junto con los resultados obtenidos durante la electroporación con el transposón, parece estar relacionado con el tamaño del DNA exógeno a introducir en la bacteria, dado que pRE-7 y el transposón presentan un tamaño menor que pDBMCS-2b.

Mediante los estudios de electroporación se confirmó la necesidad de utilizar vectores con orígenes de replicación específicos para microorganismos próximos al género *Gordonia*. Tanto pRE-7 como pDBMCS-2b son vectores lanzadera que portan orígenes de replicación derivados de plásmidos obtenidos a partir de miembros del género *Gordonia* así como orígenes de replicación de *E. coli*.

El grado de dificultad consiste en la escasez del conocimiento acerca de los orígenes de replicación de los plásmidos propios de este género. Son escasos los vectores caracterizados para este género pese al enorme potencial que demuestra en distintas áreas de la industria.

La recuperación del DNA plasmídico a partir las células de *G. jacobaea* transformada fue difícil y requirió tratamientos agresivos contra la pared bacteriana. Ni el método de Takai *et al.* (1995), ni el de Hoffman y Winston (1987), ni el de Kieser (1984) aún modificados tal como se describió previamente, fueron métodos precisos sino que en todos ellos se arrastró DNA genómico. Incluso, en alguno de los casos debido a la utilización de solventes orgánicos se arrastraron carotenoides. Fue necesario la

transformación ulterior de *E. coli* con el DNA plasmídico contaminado para eliminar los restos de DNA genómico para poder manipular los plásmidos. Esta transformación de *E. coli* como paso de limpieza del DNA plasmídico fue posible porque se trataba de plásmidos lanzadera con origen de replicación de *E. coli* y origen de replicación del género *Gordonia*.

Al contrario que en otros estudios (Arenskötter *et al.*, 2003), cuando se recuperaron los plásmidos a partir de *G. jacobaea* no se encontró que las condiciones de electroporación hubiesen afectado ni a las dianas de restricción ni a su tamaño ya que, en las condiciones ensayadas, siempre se mantuvo la integridad de los vectores.

El método desarrollado para la obtención de células electrocompetentes de *G. jacobaea* junto con el protocolo de electroporación para su transformación fue eficaz en otros individuos del grupo CNM tales como *G. bronquialis* y *B. lactofermentum*. Este dato tiene una importancia más allá de validar el método desarrollado ya que existen hoy en día pocos protocolos eficaces para manipular a este tipo de microorganismos. Este método amplía, pues, el abanico de protocolos existentes.

Análisis de las secuencias de los genes implicados en la ceto-carotenogénesis.

La transposición de *G. jacobaea* permitió obtener distintos clones que presentaron un patrón de carotenoides distinto al del mutante hiperpigmentado MV-26. Esta variación en los espectros de HPLC indicó que el transposón ha interrumpido alguno de los genes pertenecientes al cluster de la ceto-carotenogénesis. Esta alteración en la expresión de estos genes no anuló la síntesis de los carotenoides completamente ya que el clon hipopigmentado seleccionado para ulteriores estudios, el clon MV26-T45, no presentaba una ausencia total de color.

La inserción del transposón en el genoma de *G. jacobaea* y la consiguiente alteración en la producción de los carotenoides permitió el diseño de oligonucleótidos específicos a

partir de su secuencia. Mediante los oligonucleótidos diseñados para las secuencias del transposón y el motivo 1 de la GGPP sintasa, gen implicado en la cetocarotenogénesis, fue posible obtener un único fragmento de DNA mediante TAIL-PCR. Dicha secuencia presentaba, a nivel de DNA, una cierta homología con la GGPP sintasa de *S. griseus* y *C. glutamicum*. Sólo cuando se hizo el análisis de la secuencia aminoacídica fue posible hallar homología con la mayoría de las secuencias conocidas de la GGPP sintasa. Cuando se analizaron en detalle los resultados del análisis obtenidos mediante la aplicación BLAST, se observó que la homología se encontraba únicamente a nivel de la secuencia del motivo 1. Esto no hace sino confirmar los estudios anteriores acerca de que los genes implicados en la ceto-carotenogénesis son genes que han surgido a través de fenómenos de convergencia adaptativa (Sieiro *et al.*, 2003; Phadwal, 2005). Este hecho dificulta enormemente el aislamiento y la caracterización de genes implicados en estas rutas en nuevos organismos.

Se comprobó que el motivo 1 de la secuencia aislada a partir de *G. jacobaea* presentaba ciertas regiones internas muy conservadas. Sin embargo, el resto de aminoácidos implicados presentaba el patrón de variación típico del motivo. Se vio, asimismo, que cuando se compararon las secuencias de la GGPP sintasa conocidas y la amplificada a partir de *G. jacobaea* mediante el método del ClustalW ni la longitud ni la posición del motivo 1 eran similares.

Los estudios filogenéticos permitieron observar que la secuencia obtenida se agrupa dentro de las secuencias de organismos Gram + ricos en G y C lo cual concuerda tanto con las características de *G. jacobaea* como con los estudios previos de evolución y relación filogenética de la GGPP sintasa (Phadwal, 2005).

Si bien no es posible conocer la estructura tridimensional de una proteína hasta que se conoce toda la secuencia de la misma, la modelización de la secuencia obtenida

permitió comprobar que ésta adquiriría una disposición espacial similar a la GGPP sintasa de *S. griseus*, tomada como modelo, y que era posible superponer ambas modelizaciones.

Todo ello permitió concluir que el fragmento de DNA amplificado pertenecía a la secuencia parcial de la GGPP sintasa de *G. jacobaea*. Es decir, el fragmento amplificado corresponde a un fragmento del gen CrtE de *G. jacobaea* que codifica para la GGPP sintasa. Por tanto, es el primer fragmento del cluster de la ceto-carotenogénesis de *G. jacobaea*.

Si analizamos el árbol filogenético obtenido a partir las proteínas CRTE, o GGPP sintasas, vemos que los organismos más próximos a *G. jacobaea* son los miembros del género *Streptomyces* y *C. glutamicum*. Sin embargo, cuando se trató de amplificar la secuencia de la fitoeno sintasa de *G. jacobaea* a partir de oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de *C. glutamicum* no se obtuvo ningún resultado. Este hecho refrenda una vez más los fenómenos de convergencia adaptativa de los genes implicados en la ceto-carotenogénesis y la divergencia existente entre las distintas especies, observándose sólo conservación en los sitios activos del enzima.

Sólo un mayor conocimiento del genoma de los miembros del género *Gordonia* podría permitir desarrollar nuevas estrategias para la caracterización del cluster de la ceto-carotenogénesis de *G. jacobaea*.

Análisis del proceso de producción y aplicabilidad industrial de cantaxantina en *G. jacobaea*.

La producción de cantaxantina en *G. jacobaea* se vio afectada, principalmente por dos factores: la fase de crecimiento bacteriano en la que se encontraba el cultivo celular y el medio de cultivo.

En todos los casos analizados, se vio que era necesario que *G. jacobaea* alcanzase la fase estacionaria de crecimiento para originar los valores máximos de concentración de cantaxantina en el cultivo. Hasta esta fase del ciclo, la producción de cantaxantina es paralela al crecimiento bacteriano. Cuando se alcanza la fase estacionaria, se produce una acumulación de cantaxantina.

La producción de cantaxantina y β -caroteno sigue un patrón inverso, lo cual no es sino un reflejo de que la cantaxantina es el paso final de la ruta de síntesis mientras que el β -caroteno es un intermediario de la misma.

El valor máximo de producción no se alcanza en los distintos medios a igual tiempo de cultivo. Esto es debido a la diferente composición de los medios y a la capacidad de *G. jacobaea* para asimilar los distintos nutrientes.

La incapacidad de *G. jacobaea* para crecer en medios basados en melaza puede ser debida a dos factores: la presencia en dicho compuesto de algún producto nocivo para el microorganismo, o bien, que la gran concentración de azúcares presentes en la muestra sature las rutas metabólicas de *G. jacobaea*, por tanto incapaz de desarrollarse.

El mayor valor de producción se detectó en el medio con glucosa al 1 % y soja al 5 %. Sin embargo, este medio se descartó para posteriores estudios debido a su difícil manipulación por la alta concentración de soja.

Se vio que medios basados en la soja, como el medio de soja al 5 % sin glucosa, pueden ser utilizados a nivel industrial para producir cantaxantina a bajo coste a nivel industrial. El único problema a considerar en este tipo de medios con soja es la difícil manipulación de la misma, por lo que para su aplicación a nivel industrial primero debe desarrollarse una técnica que permita un empleo más cómodo de la soja.

La capacidad de la soja de incrementar la producción de pigmento por *Gordonia* puede ser debida a la presencia en la soja de precursores de la ruta de la carotenogénesis tales

como el ácido mevalónico. Estos, junto con las cantidades extras de glucosa presentes en el medio, actuarían incrementando la producción de cantaxantina durante los primeros días de la fase estacionaria de crecimiento, un efecto que es claramente visible cuando se analizan los resultados obtenidos en el medio BHIB, rico en terpenoides. Sin embargo, este medio, debido a su alto coste, no es recomendable para su aplicación en la industria. Los análisis estadísticos confirmaron la influencia del medio de cultivo en la producción de cantaxantina.

Los controles negativos llevados a cabo permitieron descartar que los aumentos observados en las concentraciones de cantaxantina no fuesen debidos a carotenoides presentes en el medio de cultivo.

La extrapolación de los resultados obtenidos a la fermentación a escala semi-industrial fue posible sin que se observaran variaciones en el patrón de producción de cantaxantina. Por tanto, es factible considerar a *G. jacobaea* como una alternativa a otras fuentes microbianas productoras de carotenoides.

La posibilidad de extraer directamente los pigmentos a partir de *G. jacobaea* con etanol representa una gran ventaja con respecto a otros organismos productores de carotenoides, como *Phaffia rhodozyma*, en los cuales no es posible. La extractabilidad del pigmento con etanol es menor que con otros compuestos orgánicos como el hexano. Sin embargo, el hexano no está permitido en productos destinados a la alimentación debido a su toxicidad potencial. El etanol, sin embargo, disminuye la posibilidad de toxicidad e intoxicación animal.

Cuando se realizó un cultivo mixto de *M. xanthus* y *G. jacobaea* se recuperó una mayor cantidad de pigmento. Se comprobó que era más efectivo añadir *M. xanthus* sobre un cultivo vivo de *G. jacobaea* ya que cuando se llevaba a cabo sobre un cultivo inactivado, la cantidad de cantaxantina recuperada disminuía. Posiblemente, este efecto

no es debido a una acción negativa de *M. xanthus* sobre *G. jacobaea* sino que se debe al proceso de inactivación por calor de las células de *G. jacobaea*.

Los controles de extracción de pigmentos con etanol a partir de cultivos exclusivos de *M. xanthus* permitieron descartar que el aumento observado en la extracción tras el cultivo mixto no fuera debido al aporte extra de carotenos de *M. xanthus*.

Cuando se llevó a cabo el cultivo mixto de los organismos a escala semi-industrial, se comprobó que era posible extrapolar los resultados. Este hecho refuerza la aplicabilidad industrial de *G. jacobaea*.

M. xanthus es un organismo productor de una gran variedad de enzimas con capacidad lítica así como antibióticos. Los análisis llevados a cabo permitieron concluir que aquello que estaba atacando la pared de *G. jacobaea* se estaba produciendo de manera constitutiva en *M. xanthus* ya que tanto los cultivos de *M. xanthus* en presencia de *G. jacobaea* como extractos del medio de cultivo que no habían estado en contacto con células de *G. jacobaea* durante el crecimiento fueron capaces de causar halos de lisis en presencia de *Gordonia*. Uno de los productos sintetizados por *M. xanthus* que podría ser responsable del efecto observado en *G. jacobaea* puede ser el antibiótico TA. Este antibiótico interfiere en la síntesis de la pared celular ya que obstruye la polimerización del lípido-disacárido-pentapéptido (Paitan *et al.*, 1999). Los experimentos llevados a cabo permitieron observar que dicho antibiótico causaba halos de lisis en cultivos de *G. jacobaea*.

Durante la optimización de la extracción de los pigmentos de *G. jacobaea* se comprobó que en todos los casos era necesario desechar la primera extracción realizada. Probablemente, este fenómeno es debido a que los restos de la pared y de las membranas celulares actúan formando agregados con los pigmentos, lo cual origina las variaciones en los patrones de TLC entre la primera extracción y las sucesivas.

Los estudios de concentración del pigmento extraído a partir de *G. jacobaea* permitieron comprobar la influencia de la temperatura a la que se llevaba a cabo el proceso sobre el estado del pigmento y, por tanto, sobre su capacidad de pigmentación. Se observó que la concentración por calor en el rotavapor aún empleando temperaturas tan bajas como 35 °C, afectaba al patrón de TLC observado para los pigmentos extraídos de tal manera que las bandas correspondientes a la cantaxantina y al β -caroteno dejaban de ser reconocibles. Sin embargo, cuando se llevó a cabo la concentración del pigmento en frío empleando un liofilizador, la alteración de bandas no se observó, aún cuando el proceso era más largo.

La temperatura es, pues, un factor decisivo en el proceso de concentración de los pigmentos. El fenómeno observado frente a temperaturas positivas puede ser debido a una degradación de los pigmentos por efecto del calor o bien debido a la formación de agregados macro-moleculares entre las distintas moléculas presentes en la mezcla. El resultado final de esta alteración va a ser una disminución en la capacidad de pigmentación de la mezcla.

El hecho de que la liofilización no presentase el mismo efecto permite seguir considerando a *G. jacobaea* como un organismo adecuado para la industria, ya que la mezcla final va a conservar los pigmentos intactos ya sea para la elaboración de piensos animales o aplicaciones para la industria cosmética.

Por lo tanto, se puede concluir que *G. jacobaea* es un organismo adecuado para la industria ya que se pueden obtener cantidades importantes de pigmento a partir de medios de bajo coste, como la soja. Además, es posible extraer el pigmento usando compuestos orgánicos no tóxicos, como el etanol, sin que haya que aplicar tratamientos previos, lo cual, también, disminuye el coste económico del proceso de extracción. Es posible llevar a cabo una concentración del pigmento extraído sin que se alteren las

características de los pigmentos presentes en la mezcla, obteniendo un rendimiento adecuado de cara a la industria.

Si, además, se considera el cultivo mixto de *G. jacobaea* con *M. xanthus*, el rendimiento del proceso se ve aumentando de manera considerable. El inconveniente de este proceso es la especial sensibilidad de *M. xanthus* a los medios de cultivo.

En este caso, la mezcla de ambos microorganismos sólo resultó eficaz cuando se realizó con cultivos de *G. jacobaea* procedentes de medio YPD, que no es el medio en el que se produjo una mayor producción de cantaxantina. Sin embargo, probablemente, este inconveniente podría ser solventado añadiendo al proceso un paso intermedio que consista en lavar las células de *G. jacobaea* antes de añadirlas al cultivo de *M. xanthus*.

Capacidad de *G. jacobaea* de actuar como biorremediador.

La mayoría de las especies del género *Gordonia* han sido aislados a partir de sustratos contaminados y se ha demostrado su capacidad para actuar como organismos biorremediadores.

Se comprobó que *G. jacobaea* es un potencial biorremediador ya que es capaz de crecer en un medio cuya única fuente de carbono es el cis-1,4-poliisopreno procedente de los fragmentos de latex presentes en el medio de cultivo.

Si bien estudios más completos han de ser llevados a cabo, y nuevas pruebas deben ser realizadas, el hecho de que *G. jacobaea* sea un potencial organismo biorremediador es un dato muy positivo debido a la gran cantidad de fuentes de contaminación existentes en la actualidad. A lo largo de este trabajo, además, se observó la capacidad de *G. jacobaea* para crecer en medios muy diversos y en condiciones muy diferentes. Esta habilidad del microorganismo es muy interesante si se considera que la mayoría de los

estudios de biorremediación fallan cuando las condiciones *in vitro* del laboratorio se extrapolan al medio contaminado donde el microorganismo encargado de llevar a cabo el proceso de descontaminación no se va a encontrar en las condiciones ideales.

6.- CONCLUSIONES

- I. Los miembros del genero *Gordonia* sólo reconocen orígenes de replicación propios o de organismos muy cercanos evolutivamente a ellos..
- II. Para conseguir células electrocompetentes de *G. jacobaea* es necesario actuar sobre la síntesis de ácidos micólicos y el péptidoglicano de la pared bacteriana.
- III. Los factores que más afectan a la capacidad de electrocompetencia de *G. jacobaea* son: la fase de crecimiento bacteriano, la temperatura de crecimiento y los tratamientos encaminados a la interferencia en la síntesis de los componentes de la pared bacteriana de *G. jacobaea*.
- IV. Los genes implicados en la ceto-carotenogénesis presentes en *G. jacobaea* se han originado mediante procesos de convergencia adaptativa.
- V. Ha sido posible caracterizar parte del gen de la GGPP sintasa (CrtE) de *G. jacobaea*.
- VI. El medio de cultivo influye sobre la producción de cantaxantina de *G. jacobaea*.
- VII. Es posible aumentar el rendimiento en la extracción de pigmento utilizando a *M. xanthus* ya que éste presenta actividad lítica sobre *G. jacobaea*.
- VIII. La liofilización es un método adecuado para concentrar el pigmento extraído de *G. jacobaea*.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Adham, S. A., Rodriguez, S., Ramos, A., Santamaria, R. I., Gil, J. A. 2003. Improved vectors for transcriptional/translational signal screening in corynebacteria using the melC operon from *Streptomyces glaucescens* as reporter. Arch. Microbiol. 180, 53-59.

Alcántara, S., Sánchez, S., 1999. Influence of carbon and nitrogen sources of *Flavobacterium* growth and zeaxanthin biosynthesis. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 23, 697-700.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., 25, 3389-3402.

Alves, L., Salgueiro, R., Rodrigues, C., Mesquita, E., Matos, J., Girio, F.M. 2005. Desulfurization of dibenzothiophene, benzothiophene, and other thiophene analogs by a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* strain 1B. Appl. Biochem. Biotechnol. 120, 199-208.

Arenskötter, M., Baumcister, D., Berekaa, M.M., Pötter, G., Kroppenstedt, R.M. Linos, A., Steinbüchel, A., 2001. Taxonomic characterization of two rubber-degrading bacteria belonging to the species *Gordonia polyisoprenivorans* and analysis of hypervariable regions of 16S rDNA sequences. FEMS Microbiol. Lett. 205, 277-282.

Arenskötter, M., Baumeister, D., Kalscheuer, R., Steinbüchel, A., 2003. Identification and application of plasmids suitable for transfer of foreign DNA to members of the genus *Gordonia*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 4971-4974.

Asker, D., Ohta, Y., 2002. Production of canthaxanthin by *Haloferax alexandrinus* under non-aseptic conditions and a simple, rapid method for its extraction. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 743-750.

Ben-Amotz, A., 1996. Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chloropyta). *J. Phycol.* 32, 272-275.

Bhosale, P., 2004. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 351-361.

Botella, J.A., Murillo, F.J., Ruiz-Vázquez, R., 1995. A cluster of structural and regulatory genes for light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Eur. J. Biochem.* 233 (1), 238-248.

Braunstein, M, Griffin, T.J., Kriakov, J.I., Friedman, S.T., Grindley, N.D.F., Jacobs, W.R., 2000. Identification of genes encoding exported *Mycobacterium tuberculosis* proteins using a Tn522'phoA in vitro transposition system. *J. Bacteriol.* 182 (10), 2732-2740.

Bröker, D., Arenskötter, M., Legatzki, A., Nies, D.H., Steinbüchel, A., 2004. Characterization of the 101-Kilobase-Pair megaplasmid pKB1, isolated from the rubber-degrading bacterium *Gordonia westfalica* Kb1. *J. Bacteriol.* 186 (1), 212-215.

Calo, P., Villa, T.G., 1995. The yeast *Phaffia rhodozyma* as an industrial source of astaxanthin. *Microbiología SEM* 11, 386-388.

Calo, P., de Miguel, T., Sieiro, C. Velázquez, J. B., Villa, T.G., 1995. Ketocarotenoids in halobacteria: 3'-hydroxy-echinenone and astaxanthin. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 282-285.

Cantera, J.J.L., Kawasaki, H., Seki, T., 2002. Farnesyl diphosphate synthase gene of three phototrophic bacteria and its use as a phylogenetic marker. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1953-1960.

de Miguel, T., Sieiro, C., Poza, M., Villa, T.G., 2000. Isolation and taxonomic study of a new canthaxanthin-containing bacterium, *Gordonia jacobaea* MV-1 sp. nov. Int. Microbiol. 3, 107-111.

de Miguel, T, Sieiro, C., Poza, M. and Villa, T. G., 2001. Analysis of canthaxanthin and related pigments from *Gordonia jacobaea* mutants. J. Agric. Food Chem., 48, 1200-1202.

Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodríguez, H., Angeles Vargas, M., Rivas, J., Guerrero, M. G., 1999. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis sp.* (Chloropyta). J. Biotechnol. 76, 51-69.

Diario Oficial de las Comunidades Europeas (D.O.C.E.) 6.11.1999. L284/1-L284/40. Reglamento (CE) N° 2293/1999 De la Comisión del 14 de Octubre de 1999 relativo a la ampliación de las autorizaciones provisionales de determinados aditivos en alimentación animal.

Disch, A., Schwender, J., Müller, C., Lichtenthaler, H.K. and Rohmer, M., 1998. Distribution of the mevalonate and glyceraldehydes phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechosystis* PCC 6714. Biochem. J. 333, 381-388.

Dworkin, M., 1996. Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. Microbiol. Rev. 60, 70-102.

Fang, T.J., Wang, J-M., 2002. Extractability of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. Process Biochemistry, 37, 1235-1245.

Fujii, T., Narikawa, T., Takeda, K., Kato, J., 2004. Biotransformation of various alkanes using the *Escherichia coli* expressing an alkane hydroxylase system from *Gordonia* sp. TF6. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 2171-2177.

Gao, L.Y., Groger, R., Cox, J.S., Beverley, S.M. Lawson, E.H., Brown, E.J., 2003. Transposon mutagenesis of *Mycobacterium marinum* identifies a locus linking pigmentation and intracellular survival. Infect. Immunol. 71 (2), 922-929.

Gilbert, S.C., Morton, J., Buchanan, S., Oldfield, C., McRoberts, A., 1998. Isolation of a unique benzothiophene-desulphurizing bacterium, *Gordonia* sp. strain 213E (NCIMB 40816), and characterization of desulphurization pathway. Microbiology. 144, 2545-2553.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: an user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser., 41, 95-98.

Hannibal, L., Lorquin, J., D'Ortoli, N.A., García, N., Chaintreuil, C, Masson-Boivin, C., Dreyfus, B. and Giraud, E., 2000. Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS278. J. Bacteriol, 182, 3850-3853.

Hoffman, C.S., Winston, F., 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently release autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. Gene. 57, 267-272.

Johnson, E. A., Villa, T. G. and Lewis, M. J., 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. Aquaculture 20, 123-134.

Kim, K.K., Lee, C. S., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E., Lee, S. T., 2003. *Gordonia sihwensis* sp. nov., a novel nitrate-reducing bacterium isolated from a wastewater-treatment bioreactor. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53 (Pt. 5), 1427-1433.

- Kieser, T.**, 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces livida* and *Escherichia coli*. *Plasmid*. 12 (1), 19-36.
- Koma, D., Sakashita, Y., Kubota, K., Fujii, Y., Hasumí, F., Chung, S. Y., Kubo, M.**, 2003. Degradation of car engine base-oil by *Rhodococcus* sp. NDKK48 and *Gordonia* sp. NDKY76A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (7), 1590-1593.
- Kotani, T., Yamamoto, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, N.**, 2003. Propane monooxygenase and NAD⁺-dependent secondary alcohol dehydrogenase in propane metabolism by *Gordonia* sp. strain TY-5. *J. Bacteriol.*, 185 (24), 7120-7128.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M.**, 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163.
- Kurusu, Y., Kainuma, M., Inui, M., Satoh, Y., Yukawa, H.**, 1990. Electroporation-transformation system for Coryneform Bacteria by auxotrophic complementation. *Agric. Biol. Chem.* 54(2), 443-447.
- Krubasik, P., Sandmann, G.**, 2000. A carotenogenic gene cluster from *Brevibacterium linens* with novel lycopene cyclase genes involved in the synthesis of aromatic carotenoids. *Mol. Gen. Genet.*, 263 (3), 423-432.
- Lang, H.P., Cogdell, R.J., Takaichi, S., Hunter, C. N.**, 1995. Complete DNA sequence, specific Tn5 insertion map, and gene assignment of the carotenoid biosynthesis pathway of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 177 (8), 2064-2073.
- Lee, S.H., Cheung, M., Irani, V., Carroll, J.D., Inamine, J.M., Howe, W.R., Maslow, J.N.**, 2002. Optimization of electroporation conditions for *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis*. 82, 167-174.

Liu, Y.G., Whittier, R.F., 1995. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*. 25, 674-681.

Madigan, M. T., Martinko, J.M., Parker, J., 2004. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson Educación. S. A. Madrid. 10ª Ed.

Maslow, J.N., 2002. Optimization of electroporation conditions for *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis*. 82, 167-174.

Nelis, H. T. and de Leenher, A. P., 1991. Microbial sources of carotenoid pigments used in food and feed. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 181-191.

Norén, B., Raper, K.B., 1962. Antibiotic activity of mixobacteria in relation to their bacteriolytic capacity. *J. Bacteriol.* 84, 157-162.

Oldfield, C., Wood, N.T., Gilbert, S.C., Murray, F.D., Faure, F.R., 1998. Desulphurisation of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomycete organisms belonging to the genus *Rhodococcus*, and related taxa. *Antonie van Leeuwenhoek* 74, 119-132.

Orset, S.C., Young, A. J., 2000. Exposure to low irradiances favors the synthesis of 9-cis- β , β -carotene in *Dunaliella salina*. *Plant. Physiol.* 122, 609-618.

Paitan, Y., Orr, E., Ron, E. Z., Rosenberg, E., 1999. Genetic and functional analysis of genes required for the post-modification of the polyketide antibiotic TA of *Myxococcus xanthus*. *Microbiology*, 145, 3059-3067.

Park, E. K., Seo, M.W., Lee, C.G., 2001. Effects of medium compositions for the growth and the astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Sanop. Misaengmul. Hakhoechi*, 29, 227-233.

Phadwal, K., 2005. Carotenoid biosynthetic pathway: molecular phylogenies and evolutionary behaviour of *crt* genes in eubacteria. *Gene*, 345, 35-43.

Ponnampalam, S.N., Bauer, C. E., 1997. DNA binding characteristics of CtrJ. J. Biol. Chem. 272 (29), 18391-18396.

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 1999. Microbiology. Mac-Graw Hill Companies. 4th. Edition.

Primrose, S.B., Twyman, R.M., Old, R.W., 2001. Principles of Gene Manipulation. Blackwell Science Ltd. 6th. Edition.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, New York, 2nd. Ed.

Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A-H. Puhler, A., 1990. High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. J. Bacteriol, 172(3), 1663-1666.

Schäfer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Puhler, A, 1994a. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmid pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene, 145, 69-73.

Schäfer, A., Schwarzer, A., Kalinowski, J., Puhler, A., 1994b. Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and analysis of its role in intergeneric conjugation with *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176 (23), 7309 - 7319.

Shivanand, K.M., Hearst, J.E., Poulter, C.D., 1992. The *crtE* gene in *Erwinia herbicola* encodes geranylgeranyl diphosphate synthase. Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 6761-6764.

Simon, R. Priefer, U., Pühler, A., 1983. A broad-host-range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. Biotechnology 1, 784-794.

Sieiro, C., Poza, M., de Miguel, T., Villa, T.G., 2003. Genetic basis of microbial carotenogenesis. *Int. Microbiol.* 6, 11-16.

Stratton, H.M., Seviour, R.J., Soddell, J.A., 1993. Effect of culture conditions on cell surface hydrophobicity of nocardioforms. *Actinomycetes.* 4, 40-46.

Stratton, H.M., Brooks, P.R., Carr, E.L., Seviour, R.J., 2003. Effects of culture conditions on the mycolic acid composition of isolates of *Rhodococcus spp.* from activated sludgefoams. *System. Appl. Microbiol.* 26, 165-171.

Sudo, S., Dworkin, M., 1972. Bacteriolytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 110, 236-245.

Takai, S., Ikeda, T., Sasaki, Y., Watanabe, Y. Ozawa, T., Tsubaki, S. Sekizaki, T., 1995. Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15- to 17 Kilodalton antigens. *J. Clin. Microbiol.* 33 (6), 1624-1627.

Tomiyasu, M., 1982. Mycolic acid composition and thermally adaptative changes in *Nocardia asteroides*. *J. Bacteriol.* 151, 828-837.

van der Rest, M.E., Lange, C. Molenaar, D., 1999. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogenic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 541-545.

Varon, M., Fuchs, N., Monosov, M., Tolchinsky, S., Rosenberg, E., 1992. Mutation and mapping of genes involved in production of the antibiotic TA in *Myxococcus xanthus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 2316-2321.

Veiga Crespo, P. 2005. Desarrollo de métodos de transformación y transposición de *Gordonia jacobaea*. Caracterización del cluster de ceto-carotenogénesis. Licenciatura de Grado. Universidad de Santiago de Compostela.

- Veiga-Crespo, P., Blasco, L., Rosa dos Santos, F., Poza, M., Villa, T. G.** 2005a. Influence of culture conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on canthaxanthin production. *Int. Microbiol.* 8, 55-58.
- Veiga-Crespo, P., Feijoo-Siota, L., de Miguel, T., Poza, M., Villa, T. G.** 2005b. Proposal of a method for the genetic transformation of *Gordonia jacobaea*. *J. Appl. Microbiol.* In press.
- Xue, Y., Sun, X., Zhou, P., Liu, R., Liang, F., Ma, Y.** 2003. *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading actinomycete isolated from an oil-producing well. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (Pt. 5), 1643-1646.
- Zheng, H., Tkachuk-Saad, O., Prescott, J.F.**, 1997. Development of a *Rhodococcus equi*-*Escherichia coli* plasmid shuttle vector. *Plasmid.* 38, 180-187.

8.-PUBLICACIONES ORIGINADAS A PARTIR DE ESTE TRABAJO

Rosa dos Santos, J. F., Poza, M., Veiga-Crespo, P., de Miguel, T., Villa, T. G., Torres-Labandeira, J. J. comunicación-poster. "Estudio de la evolución de la pigmentación de *Gordonia jacobaea* MV-26 mediante proceso de fermentación y análisis por HPLC". XIX Congreso de la SEM, Santiago, 2003.

Veiga-Crespo, P., Feijoo-Siota, L., Blasco, L., Poza, M. y Villa, T. G. comunicación-póster. "Desarrollo de un método de transformación para *Gordonia jacobaea*", Congreso de Biotecnología, Biotec, 04. Oviedo, 2004.

Feijoo-Siota, L., Blasco, L., Veiga-Crespo, P., Poza, M. y Villa T. G. comunicación-poster. " Aislamiento y caracterización de un plásmido endógeno de *Gordonia jacobaea*". , Congreso de Biotecnología, Biotec, 04. Oviedo, 2004.

Blasco, L., Feijoo-Siota, L., Veiga-Crespo, P., Poza, M. y Villa T. G. comunicación-póster. "Optimización de la producción de cantaxantina a partir de *Gordonia jacobaea*", Congreso de Biotecnología, Biotec, 04. Oviedo, 2004.

Patricia Veiga Crespo. "Desarrollo de métodos de transformación y transposición de *Gordonia jacobaea*. Caracterización del cluster de ceto-carotenogénesis." Licenciatura de Grado. 2005.

Veiga-Crespo, P., Blasco, L., Rosa dos Santos, F., Poza, M. and Villa, T. G. Influence of culture conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on canthaxanthin production. *International Microbiology* 8, 55-58, 2005.

Feijoo-Siota, L., Veiga-Crespo, P., Blasco, L., Poza, M., Villa, T.G. comunicación-poster. “Aislamiento y caracterización de un plásmido endógeno de *Gordonia jacobaea*”. XX Congreso de la SEM, Cáceres, 2005.

Veiga-Crespo, P., Feijoo-Siota, L., de Miguel, T., Poza, M. and Villa, T. G. “Proposal of a method for the genetic transformation of *Gordonia jacobaea*”. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 608-614, 2006.

Se depositó en la base de datos GeneBank la secuencia parcial del gen CrtE de *G. jacobaea*. El número de acceso provisional para esta secuencia es: bankit814373; siendo el definitivo DQ784826.

ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LA PIGMENTACIÓN DE *Gordonia jacobaea* M-26 MEDIANTE PROCESO DE FERMENTACIÓN Y ANÁLISIS POR HPLC

La cantaxantina es un cetocarotenoide que suele ser punto final, junto con la astaxantina de la ruta de los carotenoides. Se ha empleado como aditivo alimentario de peces y aves de corral con el mismo propósito que la astaxantina, y especialmente, para pigmentar el músculo de la trucha arco iris. La regulación sobre la seguridad de los aditivos alimentarios se ha vuelto cada vez mas estricta, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de pigmentos naturales. *Gordonia jacobaea* M-26, aislada y caracterizada en nuestro laboratorio, ha demostrado ser una buena fuente de cantaxantina. En este trabajo, se optimizó la producción de cantaxantina de esta bacteria a escala semi-industrial, con el fin de analizar, mediante HPLC, la evolución de la pigmentación, para poder determinar un método de extracción de cantaxantina, adecuado para destinarlo, posteriormente, en forma de aditivo alimentario.

Se empleó un fermentador modelo Biostat-D para analizar la producción de cantaxantina a escala semi-industrial de la cepa *G. jacobaea* M-26. Para ello, 80 L de medio YPD se inocularon con 5 L de un cultivo de la bacteria. La agitación se mantuvo a 100 rpm, con el fin de evitar un exceso de espuma, y el flujo de aire varió de 10 a 20 L/min. Al tercer día de la inoculación se alcanzó la fase estacionaria. Se extrajeron alícuotas a lo largo de 12 días con el fin de describir la curva de crecimiento y la de carotenogénesis. Transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó, se lavaron las células y se extrajeron los pigmentos empleando lavados sucesivos en etanol y ultrasonificación, hasta conseguir sobrenadantes incoloros. Se empleó un equipo rota-vapor para concentrar las muestras de pigmento,

manteniendo siempre temperaturas inferiores a 45°C para evitar su degradación. El concentrado de pigmentos fue, finalmente, liofilizado y se mantuvo guardado en oscuridad. Este pigmento liofilizado será destinado posteriormente como aditivo alimentario, por lo que, en un primer momento, se planteó su análisis mediante HPLC. Para ello, las muestras liofilizadas se disolvieron en una mezcla de etanol, hexano y tampón fosfato. La mezcla se centrifugó y se recogió la fase superior; el hexano con los pigmentos en solución. Estas muestras fueron analizadas mediante HPLC empleando una columna Teknokroma de sílica de 5 µm (250 x 4.6mm). Como eluyente se empleó una mezcla de hexano y acetato de etilo y el flujo fue de 1mL/min.

El proceso se monitorizó a 476 nm. Este análisis reveló la presencia de β-caroteno (13%), cantaxantina (65%) y astaxantina (22%). Por otro lado, con el fin de estudiar la evolución de la carotenogénesis, se analizaron las alícuotas extraídas a lo largo del proceso de fermentación. Para ello, se extrajo pigmento a partir de una cantidad fija de células y se observó que a lo largo del proceso, la concentración de β-caroteno y cantaxantina aumentan de forma inversamente proporcional, revelando así, una posible dependencia recíproca entre estas dos sustancias durante el proceso de carotenogénesis. Así, se obtuvo un pico máximo de β-caroteno al cuarto día de la fermentación, lo cual representa el 83% de los carotenos totales y, por el contrario, la cantaxantina presentó su concentración máxima al décimo día, lo cual representó el 79.5% de los carotenoides totales. Finalmente, este estudio demostró la necesidad de mantener los cultivos un mínimo de 10 días para obtener niveles de cantaxantina suficientemente elevados para su uso posterior como aditivos alimentarios.

1 Rosa dos Santos J. F., 2 Poza, M., 2 Veiga-Crespo, P.
2 de Miguel, T., 2 Villa, T. G., 1 Torres-Labandeira J.L.
1 Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
2 Dpto. de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN PARA *GORDONIA JACOBAEA* **7P**
36

Veiga-Crespo, P., Feijoo-Siota, L., Blasco, L., Poza, M. y Villa, T. G.

Universidad de Santiago de Compostela
Facultad de Farmacia. Dpto. de Microbiología y Parasitología. Lab. T.G. Villa
Campus Sur s/n
15782 Santiago de Compostela
España

Gordonia jacobaea, organismo Gram + de gran interés en la industria alimentaria por ser capaz de producir *trans*-cantaxantina, presenta la pared bacteriana típica de las corinebacterias, rica en ácidos micólicos y péptidoglicano. Estas características, junto con la escasez de datos sobre sus mecanismos moleculares, dificultan gravemente su manipulación.

En este trabajo, se describe un protocolo de transformación de *G. jacobaea* basado en el tratamiento de las células empleando combinaciones de glicina e isoaniazida. Estos componentes permiten el deterioro de la pared mediante su interferencia en la síntesis de los ácidos micólicos y el péptidoglicano; originándose, por tanto, células electrocompetentes. Así mismo, se optimizaron las condiciones de transformación de estas células mediante electroporación empleando plásmidos específicos.

7P **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN**
33 **PLÁSMIDO ENDÓGENO DE *Gordonia jacobaea*.**

Feijoo-Siota,L., Blasco,L., Veiga-Crespo,P., Poza, M., Villa,T.G.

Universidad de Santiago de Compostela
Facultad de Farmacia. Dpto. de Microbiología y Parasitología. Lab. T.G. Villa
Campus Sur s/n
15782 Santiago de Compostela
España

El género *Gordonia*, perteneciente al grupo CMN (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*), presenta un gran interés industrial debido a su capacidad para actuar en procesos de biodegradación y biorremediación.

Gordonia Jacobaea, además, es una bacteria productora de pigmentos cetocarotenoides.

Pese a todas las posibilidades que ofrece este género, los conocimientos de sus mecanismos moleculares son muy escasos. Por ello surge la necesidad de la búsqueda de plásmidos endógenos específicos que permitan su manipulación.

En este trabajo se describe el aislamiento de un plásmido críptico de *Gordonia Jacobaea*. Se pretende caracterizar este vector teniendo en cuenta su espectro de hospedador, sus posibles orígenes de replicación así como sus secuencias promotoras o de resistencia a antibióticos, mediante la introducción de un transposón y posterior análisis de su secuencia.

**OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE
CANTAXANTINA A PARTIR DE *GORDONIA
JACOBAEA*** **7P
32**

Blasco, L., Feijoo-Siota, L., Veiga-Crespo, P., Poza, M., y Villa, T.G.

Universidad de Santiago de Compostela
Facultad de Farmacia. Dpto. de Microbiología y Parasitología. Lab. T.G. Villa
Campus Sur s/n
15782 Santiago de Compostela
España

El uso generalizado en la industria alimentaria de los colorantes naturales ha aumentado mucho en los últimos tiempos. En la actualidad la principal fuente microbiana natural de pigmento es la levadura *Phaffia rhodozyma*. Sin embargo, Surge la necesidad de la búsqueda de fuentes alternativas de pigmento así como la mejora de su producción. *Gordonia jacobaea* es una bacteria capaz de producir cantaxantina (β - β -caroteno-4,4'-diona), carotenoide de interés industrial por su utilización como colorante natural. En este trabajo se ha estudiado la influencia de los distintos medios de cultivo sobre la producción de cantaxantina obtenida a partir de *Gordonia jacobaea*. Los medios que contenían una base de soja fueron los que proporcionaron una mayor producción de pigmento, sobre todo aquellos que contenían un aporte extra de glucosa. De todas las combinaciones de soja y glucosa que se utilizaron, se obtuvo el mejor resultado con soja al 2% y glucosa al 1,5%, este resultado fue mejor incluso que los obtenidos empleando medios comerciales.



Universidad de Santiago de Compostela

Facultad de Biología

**Desarrollo de métodos de transformación
y transposición de *Gordonia jacobaea*.**

**Caracterización del
cluster de ceto-carotenogénesis.**

Patricia Veiga Crespo

Licenciatura de Grado, 2005

Aislamiento y caracterización de un plásmido endógeno de *Gordonia jacobaea*.

Feijoo-Siota, L., Veiga-Crespo, P., Blasco, L., Poza, M. y Villa, T.G.

Dpto Microbiología .Fac. Farmacia-Campus Sur s/n. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. La Coruña C.P.15782.

feijoosiota@mixmail.com

El género *Gordonia* presenta un gran potencial en distintas áreas industriales debido a su capacidad para actuar en procesos de biodegradación, biorremediación y biotransformación. Así mismo *Gordonia jacobaea*, presenta gran interés para las industrias alimentaria y cosmética por ser productora de carotenoides como es la cantaxantina.

Pese a este enorme interés y aplicabilidad en diversos campos de las diferentes especies del género *Gordonia* el conocimiento de sus mecanismos moleculares es muy escaso.

Para desarrollar investigaciones con las cepas del género *Gordonia* es necesario emplear vectores con origen de replicación propios.

El desconocimiento de las secuencias y características diferenciadoras de los orígenes de

replicación propios de estos géneros provoca que el número de plásmidos lanzadera sea muy escaso.

Por otra parte, debido a la estructura de la pared celular de *Gordonia jacobaea* es necesario desarrollar un método que permita el estudio de sus posibles plásmidos endógenos.

En este trabajo se describe el desarrollo de un protocolo para el aislamiento del plásmido críptico de *Gordonia jacobaea*, y su purificación mediante centrifugación en gradiente de cloruro de cesio para su posterior secuenciación y su caracterización: estudio de la promiscuidad del plásmido en *E. coli*, *Mycobacterium phlei* y *Corynebacterium glutamicum*, termosensibilidad, estudio de la estabilidad estructural y segregacional.

Patricia Veiga-Crespo¹
Lucía Blasco²
Fernando Rosa dos Santos³
Margarita Poza¹
Tomás G. Villa^{1,2*}

Influence of culture conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on canthaxanthin production

¹Department of Microbiology,
Faculty of Pharmacy, University
of Santiago de Compostela,
Spain

²School of Biotechnology,
University of Santiago de
Compostela, Spain

³Department of Pharmaceutical
Technology, Faculty of Pharmacy,
University of Santiago de
Compostela, Spain

Received 3 November 2004

Accepted 11 January 2005

*Corresponding author:

T.G. Villa

Department of Microbiology

Faculty of Pharmacy, Campus Sur

15782 Santiago de Compostela, Spain

Tel.: +34-981563100 ext.14949.

Fax: +34-981592490

E-mail: mpvilla@usc.es

Summary. Commercial interest in the use of natural pigments isolated from microorganisms has increased in recent years; hence, molecules belonging to the polyisoprenoid group (i.e. β -carotene, astaxanthin, and canthaxanthin) have been the focus of much attention. The bacterium *Gordonia jacobaea* readily synthesizes and accumulates large amounts of canthaxanthin (β - β' -carotene-4,4'-dione), which is widely used in the food and cosmetics industries. In the present work, the effects of different low-cost raw materials on fermentation and canthaxanthin accumulation by a hyperpigmented strain of *G. jacobaea* were studied. Canthaxanthin production and peak levels of accumulation varied according to the different media used. [Int Microbiol 2005; 8(1):55-58]

Key words: *Gordonia jacobaea* · canthaxanthin · carotenoids · soy-meal · fermentation

Introduction

Canthaxanthin (β - β' -carotene-4,4'-dione) is a ubiquitous keto-carotene that is of considerable industrial interest because of its widespread use in both the food and cosmetic industries [12]. While synthetic forms of canthaxanthin and many other pigments are currently available, their use in the food industry has been questioned by consumer agencies, so that the development of new sources of natural pigments has become essential to meet the increasing demand.

Due to their ease of manipulation, microorganisms provide an excellent system for the large-scale production of carotenoids, as has been shown with the yeast *Phaffia rhodozyma* [13] and the bacterium *Brevibacterium* KY-4313 [14], which accumulate the natural carotenoids astaxanthin and canthaxanthin, respectively. However, the inability of these two sources to meet world-wide demand has spurred

research aimed at finding new sources (Table 1) and at optimizing fermentation technologies.

Gordonia jacobaea MV-1 (gram-positive, catalase negative, G + C 61%), which was isolated in this laboratory during a routine screening of pigmented microorganisms, is able to accumulate several carotenoids, including the keto-carotenoid *trans*-canthaxanthin [8]. However, its low carotenoid content (200 μ g/g dry weight) does not support its industrial application. After several rounds of mutations, a hyperpigmented mutant (MV-26) with enhanced canthaxanthin and β -carotene accumulation was obtained. This mutant accumulates six-fold more canthaxanthin than the wild-type strain [9].

The influence of growth conditions and medium composition on the carotenoid synthesis pathway has been reported previously. This pathway begins with isoprenyl pyrophosphate (IPP), which may be formed either from mevalonic acid (MVA) or through the glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathway [4,11]. Thus, media rich in these or related pre-

Table 1. Microbial sources of carotenoids

Microorganism	Main carotenoid	Yield	Reference
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxanthin	1.30 mg/l	[16]
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxanthin	30 µg/g	[13]
<i>Halobacterium salinarium</i>	Astaxanthin	265 µg/g	[7]
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Canthaxanthin	1 mg/g	[14]
<i>Brevibacterium</i> KY-4313	Canthaxanthin	2 mg/l	[14]
<i>Haloferax alexandrinus</i>	Canthaxanthin	2156.67 µg/g	[2]
<i>Muriellopsis</i> sp.	Lutein	22.7 mg/g	[10]
<i>Blakeslea trispora</i>	Lycopene	40 mg/l	[6]
<i>Flavobacterium</i> sp.	Zeaxanthin	0.09 µg/l	[1]
<i>Dunaliella salina</i>	β-Carotene	2.12 mg/l	[15]
<i>Dunaliella bardawil</i>	β-Carotene	20.1 pg/cell	[3]

cursors can be used to increase the carotenoid yield in industrial fermentations. In the present study, different media and low-cost raw materials were assayed in order to determine the optimal conditions of canthaxanthin production by *G. jacobaea* MV-26.

Materials and methods

Strains and culture conditions. The strain employed was the hyperpigmented *Gordonia jacobaea* MV-26 [9]. The bacterium was grown in different commercial media: yeast extract peptone dextrose (YPD) (20 g peptone/l, 10 g yeast extract/l, 20 g glucose/l), tryptone soy-meal broth (TSB) (3 g soy-meal peptone/l, 2.5 g glucose/l, 17 g casein peptone/l, 5 g dipotassium hydrogen phosphate/l, 5 g NaCl/l) and brain heart infusion broth (BHIB) (12.5 g calf-brain infusion solids/l, 5 g beef-heart infusion solids/l, 10 g protease peptone/l, 2 g glucose/l, 5 g NaCl/l, 2.5 g di-sodium phosphate/l). Low cost media consisting of different proportions of soy meal (0.5%–2%), beet molasses (0.5%–5%), and a mixture of soy meal (0%–5%) and glucose (0%–10%) were also assayed.

G. jacobaea MV-26 was grown in 1-l flasks containing 250 ml of the appropriate medium at 30°C or 37°C in a rotary shaker (150 rpm) for 8 days. In the case of YPD medium, screening was implemented for 10 days. Every other day, aliquots were withdrawn, and the levels of β-carotene and canthaxanthin (Fig. 1) were evaluated. After this first screening, *G. jacobaea* was grown in 2 l of each medium: BHIB, TSB, YPD, 0.5% soy meal, and 1.5% glucose/2% soy meal at 30°C in a rotary shaker (150 rpm) since these media resulted in the highest levels of canthaxanthin production. When necessary, *G. jacobaea* was plated on medium supplemented with agar (2%).

Growth curve of *Gordonia jacobaea* MV-26. Growth curves were established either by determining the optical density at 600 nm in a Beckman DU-40 spectrophotometer or by plate counting (colony-forming units, CFU) when complex media were used (i.e. soy-meal-based).

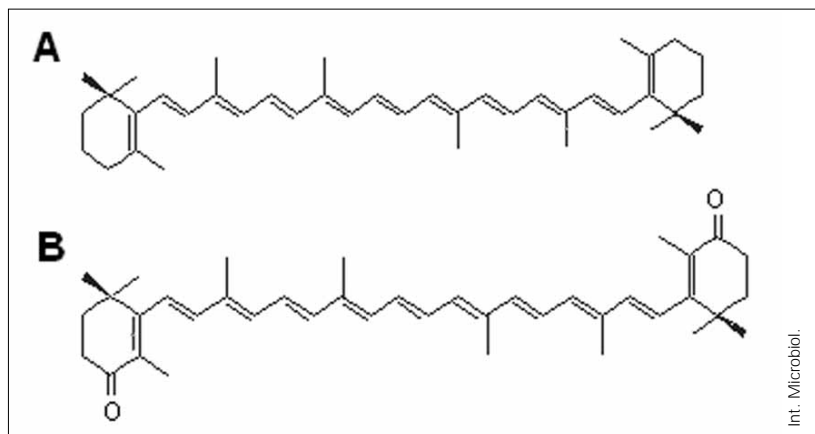
Analysis of pigment production. Samples (3 ml) were withdrawn every 24 h and 1 ml of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7) and 3 ml hexane (Merck) were added. After vigorous vortexing, the samples were centrifuged for 10 min at 5000 rpm to allow phase formation. The organic phase was filtered through a 0.22-µm filter (Gelman Sciences) and the pigment content was evaluated. When pigment production was analyzed in 2-liter cultures, an additional ethanol extraction was performed. In this case, following maximum canthaxanthin production, the biomass was harvested at 4°C by means of continuous-flow centrifugation at 15000×g. The pigments were subsequently extracted by resuspending the cells in pure ethanol.

Carotenoid pigments were analyzed by HPLC using a silica-gel column (Teknokroma, 5-µm pore size, 25-cm length and 45-mm diameter). The mobile phase was hexane/ethyl acetate (1:1 v/v) (Romil). The flow was 1 ml/min and the pressure was 0.4 kpsi; the injection volume was 30 µl and the temperature was 25°C. HPLC analysis of carotenoid pigments extracted with ethanol was carried out by adding one volume of hexane plus 1 ml 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7). After centrifugation for 10 min at 5000 rpm, the hexane phase was recovered and filtered as described previously. The peaks were evaluated based on their absorption at 480 nm. Retention times and concentrations of the samples were compared with pure standards of β-carotene and canthaxanthin.

Statistical analysis. The results of the influence of the growth media on canthaxanthin production were subjected to statistical analysis with the SPSS 12.0 program.

Results and Discussion

G. jacobaea MV-26 grew in all of the media, except those containing only beet molasses. While in all media supporting growth the production of carotenoids varied, maximum canthaxanthin accumulation consistently occurred in the stationary phase of growth (Fig. 2). Moreover, pigment production in *G. jacobaea* followed a pattern in which peak canthaxanthin production was inversely correlated with peak β-carotene production. Thus, as observed in other organisms [5], the keto-carotene canthaxanthin is the end-product of the carotenoid pathway, and β-carotene is an intermediate.



Int. Microbiol.

Fig. 1. β-Carotene (A) and canthaxanthin (B) molecules.

Standard calibration curves prepared with known amounts of pure β -carotene and *trans*-canthaxanthin allowed quantification of these pigments in the different media (Table 2). The highest levels of canthaxanthin were produced in soy-meal-based media, especially when supplemented with glucose as carbon source. In a previous study [8], an effect of the carbon source on carotenoid synthesis and accumulation was observed. Among all the carbon sources tested, glucose induced the highest level of canthaxanthin synthesis, probably by favoring the overproduction of mevalonic acid, which is a key metabolite in the synthesis of polyprenoid-derived carotenoids. Accordingly,

beet molasses should have been a good medium for canthaxanthin production. Thus, the inability of *G. jacobæa* to grow on molasses-based media was most likely due to the presence of an inhibitor in the industrial raw material.

The production profile varied both in quantity and timing depending on the medium used. Thus, in BHIB media the maximum pigment concentration (2600 $\mu\text{g/ml}$) was measured on day 3 of fermentation (stationary phase), whereas in TSB medium the maximum (1500 $\mu\text{g/ml}$) was attained on day 6 (stationary phase). In the case of YPD medium, a maximum yield was obtained on day 9 (stationary phase), but it was always lower than the yield from BHIB medium. When soy-meal-containing media were compared, 5% soy meal/1% glucose was found to elicit a peak of around 13000 $\mu\text{g/ml}$, while 2% soy meal/1.5% glucose afforded a peak of nearly 3500 $\mu\text{g/ml}$. However, despite the higher level of canthaxanthin production, the use of 5% soy meal/1% glucose medium was ruled out because of the difficulties involved in handling this mixture. Instead, it was concluded that the addition of 0.5% soy meal/0% glucose could be implemented in order to increase canthaxanthin production. The ability of soy meal to increase pigment production was most likely due to the presence of precursors of the carotenoid pathway, such as mevalonic acid or related substances, which, together with the extra amounts of glucose present in the media, could have increased canthaxanthin production. These putative precursors might also have been responsible for the increases in β -carotene and canthaxanthin that occurred during the first few days of the stationary phase of growth, an effect that was particularly observable using BHIB medium, which is rich in terpenoid precursors, this leading to the emergence of an earlier peak of pigment production.

Varying the temperature from 30°C to 37°C had little effect on canthaxanthin production (data not shown). However, a larger range of temperatures should be tested before an effect of temperature on canthaxanthin synthesis can be completely ruled out.

Statistical analysis, based on Student's *t*-test (95% confidence interval), confirmed the observations on the differential effects of the tested media on pigment production by *G. jacobæa* MV-26.

Table 2. Yields of canthaxanthin production by *Gordonia jacobæa* MV-26 in different production media

Medium	Canthaxanthin ($\mu\text{g/ml}$)
YPD	2140
BHIB	2489
TSB	1760
10% glucose/0% soy	1800
0% glucose/0.5% soy	2340
5% glucose/1% soy	1000
2% glucose/1.5% soy	2650
1.5% glucose/2% soy	3440
1% glucose/5% soy	13373

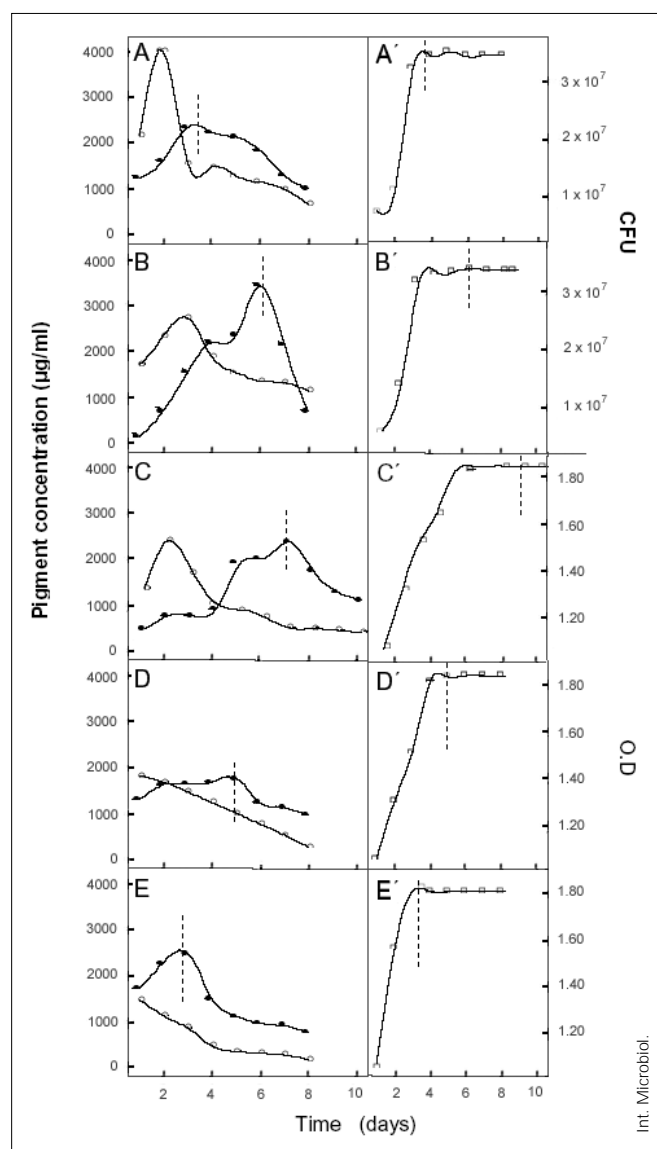


Fig. 2. Concentrations of canthaxanthin ($\mu\text{g/ml}$) (●) and β -carotene ($\mu\text{g/ml}$) (○) produced by *Gordonia jacobæa* MV-26 in different production media: (A) 0.5% soy meal/0% glucose; (B) 2% soy meal/1.5% glucose; (C) YPD; (D) TSB; (E) BHIB. (A'-E') represent the evolution of growth of *G. jacobæa* (□) in the different media. The dashed vertical line marks the peak of production and the bacterial growth phase.

A comparison of the abilities of hexane and ethanol to extract canthaxanthin showed that the extraction capacity of hexane was 50% higher than that of ethanol. However, since hexane is not allowed in foods, ethanol extraction must be optimized for *G. jacobaea*. Nonetheless, ethanol extraction of carotenoids from this bacterium is an advantage compared to other carotenoid-producing microorganisms, such as *Phaffia rhodozyma*, in which this solvent is ineffective unless the yeast has previously been disrupted. Moreover, the use of ethanol in pigment extraction lowers the possibility of toxicity and animal intoxication due to contamination with residual organic solvents in downstream processes.

Taking into account that higher concentrations of soy meal hampered fermentations because of its insolubility, the medium containing 0.5% of soy meal was chosen as the optimum to obtain the highest and the more profitable pigment production. The production profiles in higher volumes were similar to those observed for lower volumes. In general, soy meal alone, even without glucose added, promoted pigmentation and the amount of carotenoids was also higher.

The current widespread concern about the use of genetically modified organisms (GMO) in processes related to the food industry makes classical approaches, such as the one described here, of commercial relevance as the best and safest way for increasing the concentrations of important biomolecules.

Acknowledgements. M. Poza wishes to thank the University of Santiago de Compostela for a post-doctoral fellowship. The authors also wish to thank the Xunta de Galicia for Grant Reference PGIDO1BI020302PR and PETRI for Grant Reference PTR1995-0572-OP. The authors wish to thank Nick Skinner for his language revisions.

References

- Alcántara S, Sánchez S (1999) Influence of carbon and nitrogen sources of *Flavobacterium* growth and zeaxanthin biosynthesis. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:697-700
- Asker D, Ohta Y (2002) Production of canthaxanthin by *Haloferax alexandrinus* under non-aseptic conditions and a simple, rapid method for its extraction. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:743-750
- Ben-Amotz A (1996) Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *J Phycol* 32:272-275
- Bhosale P (2004) Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:351-361
- Calo P, Velázquez JB, Sieiro C, Blanco P, Longo E, Villa TG (1995) Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. *J Agric Food Chem* 43:1396-1399
- Calo P, Villa TG (1995). The yeast *Phaffia rhodozyma* as an industrial source of astaxanthin. *Microbiología SEM* 11:386-388
- Calo P, de Miguel T, Sieiro C, Sieiro C, Velázquez JB, Villa TG (1995) Ketocarotenoids in halobacteria: 3'-hydroxy-echinenone and astaxanthin. *J Appl Bacteriol* 79:282-285
- de Miguel T, Sieiro C, Poza M, Villa TG (2000). Isolation and taxonomic study of a new canthaxanthin-containing bacterium, *Gordonia jacobaea* MV-1 sp. nov. *Int Microbiol* 3:107-111
- de Miguel T, Sieiro C, Poza M, Villa TG (2001) Analysis of canthaxanthin and related pigments from *Gordonia jacobaea* mutants. *J Agric Food Chem* 48:1200-1202
- Del Campo JA, Moreno J, Rodríguez H, Angeles Vargas M, Rivas J, Guerrero MG (1999) Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *J Biotechnol* 76:51-69
- Disch A, Schwender J, Müller C, Lichtenthaler HK, Rohmer M (1998) Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem J* 333:381-388
- Hannibal L, Lorquin J, D'Ortoli NA, García N, Chaintreuil C, Masson-Boivin C, Dreyfus B, Giraud E (2000) Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS278. *J Bacteriol* 182:3850-3853
- Johnson EA, Villa TG, Lewis MJ (1980) *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture* 20:123-134
- Nelis HT, de Leenher AP (1991) Microbial sources of carotenoid pigments used in food and feed. *J Appl Bacteriol* 70:181-191
- Orset SC, Young AJ, (2000) Exposure to low irradiances favors the synthesis of 9-cis β , β -carotene in *Dunaliella salina* (Teod.). *Plant Physiol.* 122:609-618
- Park EK, Seo MW, Lee CG (2001) Effects of medium compositions for the growth and the astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Sanop Misaengmul Hakhoechi* 29:227-233 (In Korean with English abstract)

Influencia de las condiciones de cultivo de *Gordonia jacobaea* MV-26 en la producción de cantaxantina

Resumen. El interés comercial del uso de pigmentos naturales aislados a partir de microorganismos se ha incrementado en los últimos años y las moléculas pertenecientes al grupo de los poliisoprenoides (p.e. β -caroteno, astaxantina y cantaxantina) se han convertido en un foco de atención. La bacteria *Gordonia jacobaea* es capaz de sintetizar y acumular grandes cantidades de cantaxantina (β - β' -caroteno-4,4'-diona), muy usada en la industria alimentaria y de cosméticos. En este trabajo estudiamos la influencia de diferentes materias primas de bajo coste en la fermentación y la acumulación de cantaxantina por una cepa mutante hiperpigmentada de *G. jacobaea*. Se ha observado que la producción de cantaxantina y el momento en el que se alcanza la máxima producción varía según los diferentes medios empleados. [*Int Microbiol* 2005; 8(1):55-58]

Palabras clave: *Gordonia jacobaea* · cantaxantina · carotenoides · medio de soja · fermentación

Influencia das condições de cultivo de *Gordonia jacobaea* MV-26 na produção de cantaxantina

Resumo. O interesse comercial do uso pela indústria alimentar de pigmentos de origem natural isolados a partir de microorganismos experimentou um aumento considerável nos últimos anos, em especial aqueles com uma estrutura carotenóide (β -caroteno, astaxantina e cantaxantina) A bacteria *Gordonia jacobaea* apresenta uma grande capacidade para produzir e acumular grandes quantidades de cantaxantina (β - β' -caroteno-4,4'-dione), muito usada pela indústria alimentar e cosmética. O presente trabalho utiliza cepas hiperpigmentadas de *Gordonia jacobaea* modificadas geneticamente para analisar a influência de diferentes matérias primas de baixo custo, na fermentação e acumulação de cantaxantina. A produção de cantaxantina e o momento em que esta é máxima variou consoante o meio de cultivo utilizado. [*Int Microbiol* 2005; 8(1):55-58]

Palavras chave: *Gordonia jacobaea* · cantaxantina · carotenóides · meio de cultivo de soja · fermentação

ORIGINAL ARTICLE

Proposal of a method for the genetic transformation of *Gordonia jacobaea*

P. Veiga-Crespo, L. Feijoo-Siota, T. de Miguel, M. Poza and T.G. Villa

Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, A Coruña, Spain

Keywords

carotenoids, Corynebacterias, *Gordonia*, electroporation, *Gordonia*, plasmids, transformation.

Correspondence

T.G. Villa, Department Microbiology, Faculty of Pharmacy, Campus Sur, 15782 Santiago de Compostela, A Coruña, Spain.
E-mail: mpvilla@usc.es.

2005/0355: received 5 April 2005, revised 8 June 2005 and accepted 8 June 2005

doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02806.x

Abstract

Aims: *Gordonia jacobaea* is a recently isolated bacterial species with potential industrial application on account of its ability to store large quantities of trans-canthaxanthin. Its genetic manipulation is, however, difficult and cumbersome owing to the presence of mycolic acids in the cell wall and, especially, because of current lack of knowledge about its basic genetics. The present work describes a method for the genetic transformation of *G. jacobaea*.

Methods and Results: *Gordonia jacobaea* was grown in media supplemented with different glycine, penicillin G and isoniazid concentrations. The temperature, carbon source, growth phase and ultrasounds were analyzed for improving the method efficiency. The cells were finally transformed by electroporation. Finally, the method was applied to *Brevibacterium lactofermentum* and *Gordonia bronchialis*.

Conclusions: The growth of *G. jacobaea* in the presence of glycine and isoniazid is essential for obtaining electrocompetent cells. The temperature, growth phase and ultrasounds appeared as the main factors for increasing the transformation efficiency. The use of shuttle plasmids became necessary. The method described can be used with other Corynebacteria species.

Significance and Impact of the Study: Because of the importance of the CNM group (*Corynebacteria*, *Nocardia* and *Mycobacteria* genera) in different areas such as industry, bioremediation improve the knowledge of their molecular mechanisms are becoming essential. The method described here improves the genetic manipulation of this group of bacteria.

Introduction

The interest in the genus *Gordonia* has increased lately due to the possibility of using some of its members for bioremediation and biotransformation processes (Gilbert *et al.* 1998; Arenskotter *et al.* 2001). Most *Gordonia* species described have been isolated from contaminated soil samples and their capacity to synthesize aromatic compounds has been demonstrated (Xue *et al.* 2003; Fujii *et al.* 2004; Alves *et al.* 2005). However, methods for its genetic manipulation are barely known and its metabolic pathways remain to be elucidated.

The genus *Gordonia* belongs to the CNM group of actinomycetes (*Corynebacterium*, *Nocardia* and *Mycobacterium*), which synthesize large amounts of mycolic

acids (Broker *et al.* 2004) and which show a tendency to clump upon aging. There is growing evidence supporting the notion that changes in the growth temperature affect the properties of the mycolic acids of the cell wall (Tomiyasu 1982; Van Der Res *et al.* 1999; Stratton *et al.* 2003), as well as the growth rate (Kurusu *et al.* 1990; Stratton *et al.* 1993; Lee *et al.* 2002).

Gordonia jacobaea MV-1 synthesizes several carotenoids, including the keto-carotenoid trans-canthaxanthin (β - β' -carotene-4-4'-dione) (De Miguel *et al.* 2000). Random mutation with ethyl methanesulfonate (EMS) led to the isolation of several carotenoid-hyperaccumulating mutants (De Miguel *et al.* 2001). One of these mutants is *G. jacobaea* MV-26. *Gordonia jacobaea* has been recently described as a potential micro-organism for use

in bioremediation as other species of the same genus (Xue *et al.* 2003; Fujii *et al.* 2004; Alves *et al.* 2005).

The actual sources of carotenoids for cosmetic and food industries cannot supply the demand and also there is a growing sensitivity against the use of synthetic pigments and natural ones are preferred. *Gordonia jacobaea* is a good candidate because of its accumulating ability, as well as its easy manipulation.

Because of its potential industrial interest as a source of carotenoids, the design of genetic methods for strain improvement is of importance. One such method is the definition of a genetic transformation protocol applicable to *G. jacobaea* able to facilitate the uptake of heterologous replicons since current methods designed for coryneforms have been found to be useless for *G. jacobaea*.

All treatments designed for the collection of electrocompetent coryneform cells must take into account two aspects: cell wall composition and the clumping tendency. Both penicillin G and glycine have been extensively used in coryneforms to obtain strains in which the cell wall is partly degraded (Kurusu *et al.* 1990; Zheng *et al.* 1997).

Additionally, the efficiency of electroporation will depend on the previous treatments of the cells, on the electroporation parameters themselves and on other later treatments administered to the cells. Finally, it must be borne in mind that modifying electrotransformation conditions may alter the actual structure of the plasmids (Arenskotter *et al.* 2003), this in turn stressing the origins of replications.

The present work reports the development of a protocol that can be applied to *G. jacobaea* and similar coryneforms, thus opening a way for future genetic manipulation.

Materials and methods

Strains, vectors and culture conditions

Gordonia jacobaea was isolated in the laboratory during routine air-sampling for pigmented micro-organisms (De Miguel *et al.* 2000). The wild-type strain (MV-1) and hyperpigmented mutant (MV-26) were grown in AR medium (Kurusu *et al.* 1990) at 30°C for 4 days in a rotary shaker at 200 rev min⁻¹.

When evaluating the influence of the carbon source, glucose was replaced by sucrose (2 g l⁻¹) and when testing the influence of growth temperature, values of 22 and 37°C were used.

Gordonia bronchialis was routinely grown in AR medium at 30°C for 3 days in a rotary shaker at 200 rev min⁻¹.

Brevibacterium lactofermentum was routinely grown in AR medium at 30°C for 3 days in a rotary shaker at 200 rev min⁻¹.

Escherichia coli S17-1 was grown overnight in LB broth (1% tryptone; 0.5% yeast extract; 1% NaCl) at 37°C and 200 rev min⁻¹; the medium was supplemented with kanamycin (50 µg ml⁻¹) when needed.

Cell transformation of *G. jacobaea* was optimized with the shuttle plasmid pRE-7 containing origins of replication for *E. coli* and *Rhodococcus equi* (Zheng *et al.* 1997) and also with the shuttle plasmid pDBMCS-2b (Broker *et al.* 2004), having origins of replication for *Gordonia westfalica* and *E. coli*. Plasmid pUC18 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was also used. For the transformation of *G. bronchialis*, plasmid pRE-7 was employed and for the transformation of *B. lactofermentum*, plasmid pEMel-1 (Adham *et al.* 2003) was used.

After cell transformation with the vectors pRE-7, pDBMCS-2b and pEMel-1, *G. jacobaea*, *G. bronchialis* and *B. lactofermentum* were plated on AR medium containing kanamycin (50 µg ml⁻¹) and on ampicillin (100 µg ml⁻¹)-supplemented AR medium when pUC18 was to be used for *G. jacobaea* transformation.

Collection of electrocompetent cells of *Gordonia jacobaea*

As indicated above, *G. jacobaea* MV-1 or MV-26 were grown in AR medium supplemented with penicillin G in a range from 1 to 10 U ml⁻¹ (Fluka, Buchs, Switzerland) or with glycine (Sigma-Aldrich) from 1 to 2 g l⁻¹. The media were also supplemented with isoniazid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) from 50 to 100 µg ml⁻¹. The cells were inoculated at 22, 30 and 37°C for 2–3 days and were subjected to ultrasonic treatment for 15 min. Following this, the cells were centrifuged and washed three times with 10 g l⁻¹ chilled glycerol (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) or incubated for 1 h on ice and then washed three times with 10 g l⁻¹ chilled glycerol (Merck). Finally, the cells were resuspended in 3 ml of 10 g l⁻¹ glycerol, aliquoted into 100 µl samples, and frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until use.

Transformation of *Gordonia jacobaea* by electroporation

Transformation was accomplished with electrocompetent cells of both the MV-1 and MV-26 strains. About 100 ng of plasmid was kept in 10 g l⁻¹ glycerol for 5 min and then added to electrocompetent cells; the cell suspension was maintained on ice for 30 min. Electroporation was carried out with a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in 0.1 cm cuvettes. The voltage applied ranged from 1.8 to 2.5 kV and resistance

from 200 to 600 Ω ; capacitance was kept constant at 25 μF .

The cells were then resuspended in 1 ml of SOC medium (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) and incubated for 1 h at 30°C at 200 rpm. Finally, they were plated on AR medium supplemented with the appropriate antibiotic and incubated for 2–3 days at 30°C. Negative controls were subjected to the same manipulations, except that no vector was used; only 10 g l⁻¹ glycerol or ultrapure water was added.

Extraction of plasmid DNA from transformed *Gordonia jacobaea*

The following protocols were used:

- i QIApreps Spin Miniprep Kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands).
- ii The method described by Birnboim and Doly (1979).
- iii The method described by Hoffman and Winston (1987), where the diameter of the glass beads was changed from 0.45 to 0.22 μm .
- iv The alkaline lysis method (Sambrook *et al.* 1989).
- v The method described by Takai *et al.* (1995), modified as follows: the cells were subjected to one ultrasonic treatment (10 min), centrifuged, and resuspended in lytic lysozyme (0.05 mol l⁻¹ Tris-HCl, pH 8, 0.01 mol l⁻¹ EDTA, pH 8, 0.5 mol l⁻¹ NaCl, sucrose at 20 g l⁻¹, and 10 mg ml⁻¹ lysozyme) and incubated for 3 h at 37°C at 210 rev min⁻¹. Then, 400 μl of 0.2 N NaOH and 10 g l⁻¹ SDS were added and the samples were kept on ice for 5 min. Next, 5 mol l⁻¹ chilled sodium acetate (pH 4.8) was added, and the samples were kept on ice for 30 min. After centrifugation, the supernatant was mixed with one volume of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25 : 24 : 1 vol: vol: vol) and centrifuged at 4°C. One volume of isopropanol was added to the upper phase, and the mixture was incubated for 10 min at -20°C and centrifuged at 2600 g for 30 min at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in ultrapure water. These samples were employed for heat-shock *E. coli* transformation.
- vi Finally, a modification of the method described by Kieser (1984). The modifications were done as follows. After a single ultrasonic cycle of 15 min and the corresponding centrifugation described, the pellet was resuspended in 450 μl a solution containing 0.025 mol l⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 0.025 mol l⁻¹ EDTA, 0.3 mol l⁻¹ sucrose, 2 mg ml⁻¹ lysozyme and 0.22 μm glass beads. The cells were incubated in this lytic solution for 45 min at 30°C, vortexing vigorously every 10 min. Then, 300 μl of a solution containing 0.3 mol l⁻¹ NaOH and 2 g l⁻¹ SDS was added and the mixture incubated for a further 20 min at 80°C. After 10 min at room temperature, 300 μl of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25 : 24 : 1

vol: vol: vol) (Sigma-Aldrich) and 70 μl of 4 mol l⁻¹ sodium acetate (Merck) were added. After centrifugation at 2600 g, the upper phase was mixed with a volume of isopropanol. After centrifugation, the DNA was resuspended in ultrapure water and, finally, employed for *E. coli* transformation.

Enzymic digestion of plasmids rescued from *Gordonia jacobaea*

About 500 ng of rescued plasmid were incubated with 5 U of the appropriate restriction endonuclease at a final volume of 20 μl for 60 min at 37°C. After enzyme inactivation at 65°C for 15 min, the samples were subjected to electrophoresis 60 min at 70 V using 0.9% agarose (Sigma-Aldrich) and 1 mg ml⁻¹ ethidium bromide (Sigma-Aldrich) gels. The restriction fragments were visualized using a transilluminator (Fotodyne UV-21). Plasmid pRE-7 was restricted with *KpnI*, *ApaI*, *XhoI*, *ClaI*, *HindIII*, *BamHI*, *XbaI*, *NotI*, *BstXI*, *SacI* and *BglI* (Promega, Madison, WI, USA) and plasmid pDBMCS-2b with *ApaI*, *HindIII*, *BamHI*, *XbaI*, *SpeI*, *ClaI*, *EcoRI* and *EcoRV* (Promega).

Test of the transformation method in other *Corynebacteria*

In order to broaden the usefulness of the method, *G. bronchialis* and *B. lactofermentum* were grown in AR medium supplemented with glycine (1.6 g l⁻¹) and isoniazid (100 μg ml⁻¹) in exponential growth phase. After one 15-min cycle of ultrasound treatment, the cells were maintained for 1 h on ice and then washed three times with 10 g l⁻¹ glycerol. Finally, the cells resuspended in 3 ml 10 g l⁻¹ glycerol aliquoted into 100 μl samples, and frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until use.

Gordonia bronchialis was transformed with pRE-7 at 2.5 kV, 200 Ω whereas *B. lactofermentum* was transformed with pEMel-1 at 2.5 kV, 200 Ω . The protocol for cell recuperation after transformation was the same as for *G. jacobaea*.

Finally, the cells were plated in AR medium supplemented with kanamycin (50 μg ml⁻¹).

Results

Survival of *Gordonia jacobaea*

First, the capacity of *G. jacobaea* to grow at the highest concentrations of penicillin G, glycine and isoniazid was tested. Also its resistance to ultrasounds (30 min maximum) and electrical conditions of 2.5 kV and 200 Ω was analyzed.

It was observed that *G. jacobaea* did not have spontaneous resistance to the antibiotics employed.

The response to the different factors analyzed and protocols assayed were the same for both strain MV-1 and strain MV-26.

Effect of penicillin G, glycine, isoniazid, and ultrasound on the electrocompetence of *Gordonia jacobaea*

Penicillin G, glycine or isoniazid – used alone and at the concentrations employed here – did not cause any appreciable effect on *G. jacobaea* in terms of electrocompetence; not even when combined with cycles of ultrasound. Likewise, combining penicillin G and isoniazid (with or without ultrasound cycles) did not cause any effect either. Only a combination of 1.6 g l⁻¹ glycine and isoniazid (100 µg ml⁻¹) and an ultrasound treatment (15 min) led to a positive result (Table 1) in the terms of the electrotransformation of *G. jacobaea*.

Optimization of *Gordonia jacobaea* growth conditions to increase electroporation efficiency

Differences in the collection of electrocompetent cells were studied at several stages of growth. It was observed that the highest level of electrocompetence was achieved in the exponential phase of growth when O.D. λ_{600 nm} was about 0.5–0.6 and that the optimum temperature was 30°C. No differences were observed when different carbon sources were used.

Optimization of electroporation conditions

Electrocompetent cells were subjected to electroporation. The parameters studied were resistance (Ω) and voltage (V). It was observed that the best conditions for successful transformation with plasmid pRE-7 were 200 Ω and 2.5 kV, whereas the best conditions for plasmid pDBMCS-2b were same voltage but 600 Ω (Table 2). No transformants were obtained when the pUC18 vector was used.

Table 1 Effect of combination of penicillin G, glycine, isoniazid and ultrasounds on *Gordonia jacobaea* transformation

Treatment	Penicillin G (10 U ml ⁻¹) + isoniazid (100 µg ml ⁻¹)		Glycine (1.6 g l ⁻¹) + Isoniazid (100 µg ml ⁻¹)	
	Yes	No	Yes	No
Ultrasound (15 min)	Yes	No	Yes	No
Transformation	–	–	+	–

–, transformation negative; +, transformation positive.

Table 2 Electroporation conditions of *Gordonia jacobaea*

Plasmid	Voltage (kV)	Resistance (Ω)	Transformation*
PRE-7	2.5	200	60–75
	2.5	600	40
pDBMCS-2b	2.5	200	20–30
	2.5	600	50–60
PUC18	1.8–2.5	200–600	0

*Numbers reflect transformant colonies obtained per 100 ng plasmidic DNA.

Recovery of plasmid DNA from *Gordonia jacobaea*

It was not possible to recover plasmid DNA from *G. jacobaea* cells using commercial kits, the method described by Birnboim and Doly (1979), or the method described by Sambrook *et al.* (1989). However, the methods described by Kieser (1984), Hoffman and Winston (1987) and Takai *et al.* (1995) did allow plasmid recovery from *G. jacobaea* (Fig. 1).

When the restriction analyses were subsequently done to cells obtained along several generations, identical restriction patterns were found, thus indicating the high stability concerning the plasmid replication.

Analysis of plasmid DNA extracted from *Gordonia jacobaea*

Plasmid DNA was first checked for the appropriate size and treated with the different restriction enzymes. In all cases, a single band of the appropriate size appeared for each plasmid (Fig. 2).

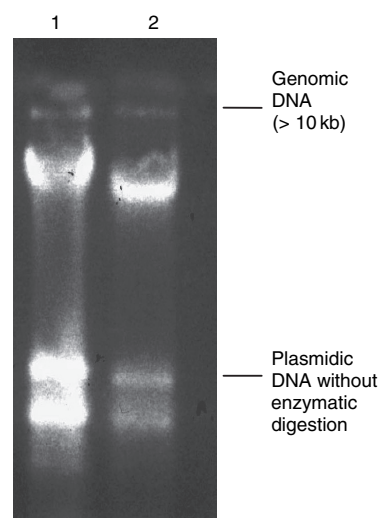


Figure 1 Recovery of pRE-7 from *Gordonia jacobaea*. Line 1: Hoffman and Winston method; Line 2: Takai *et al.* method.

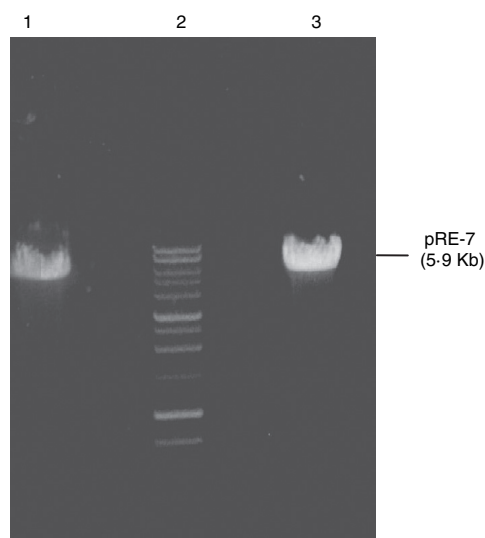


Figure 2 Enzymatic digestion of pRE-7 recovered from *Gordonia jacobaea*. Line 1, Digestion with *NotI*; Line 2, 1 Kb DNA size marker; Line 3, digestion with *XbaI*.

Table 3 Efficiency of transformation in other *Corynebacteria*

Micro-organism + plasmid employed	Voltage (kV)	Resistance (Ω)	Transformation*
<i>Gordonia bronchialis</i> + pRE-7	2.5	200	40–50
<i>Brevibacterium lactofermentum</i> + pEMel-1	2.5	200	20–30

*Numbers reflect transformant colonies obtained per 100 ng plasmidic DNA.

Electroporation of other *Corynebacteria*

Gordonia bronchialis and *B. lactofermentum* were grown in AR medium supplemented with glycine and isoniazid. The cells collected were treated with the same protocol as for *G. jacobaea*. It was possible to obtain transformant cells with pRE-7 and pEMel-1, respectively, by electroporation (2.5 kV, 200 Ω and 25 μ F) (Table 3).

Discussion

The wild type strain MV-1 and the overproducing mutant MV-26 exhibited the same electroporation potential. The EMS used to obtain the mutant MV-26 did not affect cell wall integrity and, in fact, no differences were observed between either strain in terms of their physiology. This being an important fact attending to their industrial application because the MV-26 mutant is a hyperproducer of carotenoids.

In order to obtain electrocompetent cells of *G. jacobaea* for further genetic manipulations, several factors that could affect the process were studied. The results revealed that the main factors that should be taken into account were the growth phase, the growth temperature, and the later treatments designed to break down the integrity of peptidoglycan and mycolic acids. When the effect of temperature was studied, 30°C proved to be the best one. This could be related to the distribution and composition of mycolic acids, which could, in turn, modify the cell wall structure, leading the cells to be more susceptible to electroporation as previous works suggests (Tomiyasu 1982; Kurusu *et al.* 1990; Stratton *et al.* 1993, 2003; Van Der Res *et al.* 1999). No differences were found using different carbon sources as other works suggested (Stratton *et al.* 2003).

Ultrasound was also a basic parameter studied for enhancing genetic transformation. This treatment unequivocally helped to disrupt cell clumping, helping DNA entry during the electroporation process.

While, in other *Corynebacteria* family members is enough to interfere in the peptidoglycan synthesis (Kurusu *et al.* 1990), in *G. jacobaea* is not enough. Interference of peptidoglycan synthesis by treatment with either penicillin G or glycine at different concentrations was not enough to obtain electrocompetent cells. The same results were obtained when done using isoniazid, which alters the normal synthesis of mycolic acids. It was necessary to act on both cell wall components in order to increase the number of electrocompetent cells. The best protocol involved growing *G. jacobaea* in AR medium supplemented with 1.6 g l⁻¹ glycine and 100 μ g ml⁻¹ isoniazid, applying ultrasound (10 min cycle) and incubating the cells for 1 h on ice before 10 g l⁻¹ glycerol washes.

As expected, it was necessary to work with plasmids containing origins of replication of *Corynebacteria* species as reflected by the fact that it was not possible to obtain transformants with plasmids with replication origin from *E. coli*.

It was found that variations in the resistance parameter did alter the number of transformants obtained. The lowest resistance afforded the highest numbers for plasmid pRE-7 while the opposite was the case of plasmid pDBMCS-2b. These data point to the effect of DNA size in electroporation experiments. Similar results were obtained when transposon electroporation was performed: i.e. the lower the resistance the higher the number of transformants (data not shown).

The low transformation frequency obtained could be related to two main factors; first, the used shuttle-plasmids (pRE-7 and pDBMCS-2b) have been obtained from *G. westfalica* and *R. equi*, thus replication origins

could not be the best for *G. jacobaea* and second, the tendency to clump of *G. jacobaea* which, in general, makes it difficult to be manipulate.

The recovery of plasmid DNA from *G. jacobaea* may be difficult and requires aggressive steps against the cell wall. The method described by Hoffman and Winston worked fairly well, although an extra transformation of *E. coli* was needed for final plasmid analysis. Because of this, it is important to develop shuttle plasmids with both origins of replication: the Corynebacteria origin and the *E. coli* origin.

It was not found that the electroporation protocol used affected plasmid integrity as described before (Arenskotter *et al.* 2003) since it was not found any alterations in the restriction pattern or variations in size. The methods able to recover plasmids from *G. jacobaea* were aggressive but not enough to affect the integrity of the plasmids.

The possibility of applying the method described in the present work to obtain cells of Corynebacteria susceptible of being transformed by electroporation is important because of these group of bacteria have interest in different areas of Biology, including industrial applications or bioremediation.

Acknowledgements

The authors wish to express their acknowledgment to Dr. Prescott (University of Guelph, Canada), Dr. Steinbuchel (University of Munster, Germany) and Dr. Gil (University of Leon, Spain) for supplying the plasmids used in this work. They also wish to thank the Xunta de Galicia for Grant No. PGIDO1BI020302PR. The authors are indebted to Dr. Nicholas Skinner for critically reading and correcting the English manuscript.

References

- Adham, S.A., Rodriguez, S., Ramos, A., Santamaria, R.I. and Gil, J.A. (2003) Improved vectors for transcriptional/translational signal screening in corynebacteria using the *melC* operon from *Streptomyces glaucescens* as reporter. *Arch Microbiol* **180**, 53–59.
- Alves, L., Salgueiro, R., Rodrigues, C., Mesquita, E., Matos, J., Girio, F.M. (2005) Desulfurization of dibenzothiophene, benzothiophene, and other thiophene analogs by a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* strain 1B. *Appl Biochem Biotechnol* **120**, 199–208.
- Arenskotter, M., Baumeister, D., Berekaa, M.M., Potter, G., Kroppenstedt, R.M., Linos, A. and Steinbuchel, A. (2001) Taxonomic characterization of two rubber degrading bacteria belonging to the species *Gordonia polyisoprenivorans* and analysis of hyper variable regions of 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* **205**, 277–282.
- Arenskotter, M., Baumeister, D., Kalscheuer, R. and Steinbuchel, A. (2003) Identification and application of plasmids suitable for transfer of foreign DNA to members of the genus *Gordonia*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4971–4974.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513–1516.
- Broker, D., Arenskotter, M., Legatzki, A., Nies, D.H. and Steinbuchel, A. (2004) Characterization of the 101-kilobase-pair megaplasmid pKB1, isolated from the rubber-degrading bacterium *Gordonia westfalica* Kb1. *J Bacteriol* **186**, 212–225.
- de Miguel, T., Sieiro, C., Poza, M. and Villa, T.G. (2000) Isolation and taxonomic study of a new canthaxanthin-containing bacterium, *Gordonia jacobaea* MV-1 sp. nov. *Internat Microbiol* **3**, 107–111.
- de Miguel, T., Sieiro, C., Poza, M. and Villa, T.G. (2001) Analysis of canthaxanthin and related pigments from *Gordonia jacobaea* mutants. *J Agric Food Chem* **49**, 1200–1202.
- Fujii, T., Narikawa, T., Takeda, K. and Kato, J. (2004) Biotransformation of various alkanes using the *Escherichia coli* expressing an alkane hydroxylase system from *Gordonia* sp. TF6. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 2171–2177.
- Gilbert, S.C., Morton, J., Buchanan, S., Oldfield, C. and McRoberts, A. (1998) Isolation of a unique benzothio-phene-desulfurizing bacterium, *Gordonia* sp. strain 213E (NCIMB 40816), and characterization of desulphurization pathway. *Microbiology* **144**, 2545–2553.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently release autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**, 267–278.
- Kieser, T. (1984) Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces livida* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**, 19–36.
- Kurusu, Y., Kainuma, M., Inui, M., Satoh, Y. and Yukawa, H. (1990) Electroporation-transformation system for Coryneform Bacteria by auxotrophic complementation. *Agric Biol Chem* **54**, 423–432.
- Lee, S.H., Cheung, M., Irani, V., Carroll, J.D., Inamine, J.M., Howe, W.R. and Maslow, J.N. (2002) Optimization of electroporation conditions for *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis* **82**, 167–174.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stratton, H.M., Seviour, R.J. and Soddell, J.A. (1993) Effect of culture conditions on cell surface hydrophobicity of non-radioforms. *Actinomyces* **4**, 40–46.
- Stratton, H.M., Brooks, P.R., Carr, E.L. and Seviour, R.J. (2003) Effects of culture conditions on the mycolic acid composition of isolates of *Rhodococcus* spp. from activated sludgefoams. *Syst Appl Microbiol* **26**, 165–171.

- Takai, S., Ikeda, T., Sasaki, Y., Watanabe, Y., Ozawa, T., Tsubaki, S. and Sekizaki, T. (1995) Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15- to 17 Kilodalton antigens. *J Clin Microbiol* **33**, 1624–1627.
- Tomiyasu, M. (1982) Mycolic acid composition and thermally adaptative changes in *Nocardia asteroides*. *J Bacteriol* **151**, 828–837.
- van der Res, M.E., Lange, C. and Molenaar, D. (1999) A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogenic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**, 541–545.
- Xue, Y., Sun, X., Zhou, P., Liu, R., Liang, F. and Ma, Y. (2003) *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading actinomycete isolated from an oil-producing well. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1643–1646.
- Zheng, H., Tkachuk-Saad, O. and Prescott, J.F. (1997) Development of a *Rhodococcus equi*-*Escherichia coli* plasmid shuttle vector. *Plasmid* **38**, 180–187.

LOCUS bankit814373 282 bp DNA linear BCT 16-JUN-2006
 DEFINITION *Gordonia jacobaea* geranyl geranyl pyrosynthase (GGPP) CrtE gene,
 partial sequence.
 ACCESSION 814373
 VERSION
 KEYWORDS .
 SOURCE *Gordonia jacobaea*
 ORGANISM *Gordonia jacobaea*
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
 Corynebacterineae; Gordoniaceae; Gordonia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 282)
 AUTHORS Veiga-Crespo,P., Poza,M. and Villa,T.G.
 TITLE Characterization of carotenoid cluster of *Gordonia jacobaea*
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 282)
 AUTHORS Veiga-Crespo,P., Poza,M. and Villa,T.G.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (16-JUN-2006) Microbiology and Parasitology, University
 of Santiago de Compostela, Fac. Farmacia - Campus sur s/n, Santiago
 de Compostela, La Corunha 15782, Spain
 COMMENT Bankit Comment: veiga_patricia@yahoo.es.
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..282
 /organism="*Gordonia jacobaea*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:122202"
 /note="Organelle: nucleomorph"
 gene 1..>282
 /gene="CrtE"
 CDS 1..>282
 /gene="CrtE"
 /note="[intronless gene]"
 /codon_start=1
 /protein_id="PROT_1_bankit814373"
 /translation="MARSLLAERVACQSPATPRSSTTSRFQDEITLADWRA
 ASAFRYL
 NSAAGCVPVVRGDGGGPAGRGGKCLASSVCALIHDDVMDRSRLRR
 GKPAMH"
 BASE COUNT 47 a 84 c 95 g 56 t
 ORIGIN
 1 atgcccgcga gcctactggc ggagcgcgtg gcatgtcaat caccagcgac gcctcgttct
 61 tccacgacat cgcgatttca agatgagatc acgctagctg actggagggc ggcaagcgcc
 121 ttctgctatc tcaacagtgc agcaggatgc gttcctgtgg tgcggggaga cggcggcggc
 181 cctgcggggtc ggggtggcaa gttagcttcc tcggtttgcg cgctcatcca tgacgatgtg
 241 atggaccgct cgcggcttcg ccgggggaag cctgcatgc ac