



**Facultad de Biología**  
**Departamento de Microbiología**

Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos.  
Aislamiento y caracterización de las pectinasas  
PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*.

Margarita Soriano Lasheras

Tesis Doctoral

Barcelona, Mayo 2004





UNIVERSITAT DE BARCELONA



Dr. Francisco I. Javier Pastor Blasco, profesor titular de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “**Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*.**” y presentado como tesis doctoral por Margarita Soriano Lasheras se ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología, y que reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste, firma la presente certificación con fecha 7 de mayo de 2004.

Dr. Francisco I. Javier Pastor Blasco

Programa de Doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología (1998-2000).



## **AGRADECIMIENTOS**

En las siguientes líneas, deseo dar las gracias a quienes de alguna manera han colaborado en la realización de este trabajo, tanto por sus aportaciones científicas como humanas.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Francisco I. Javier Pastor, director de la tesis doctoral, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, tiempo durante el cual, disfruté al ver en la práctica muchos de los conocimientos que adquirí como estudiante de Biología.

A la Dra. Pilar Díaz, por su colaboración en los trabajos realizados, así como su apoyo en todo momento.

A la Dra. Ana Blanco, por su inestimable ayuda y su gran amabilidad, con quien aprendí muchas de las cosas que sé.

A Nuria Prim, Marta Sánchez, Oscar Gallardo, Cristian Ruiz, Pere Picart, Blanca Roncero, Cristina Bofill, Laura Martínez, Mari Carmen Lara, Serena y a aquellos que están ausentes, por su amistad y compañerismo en el laboratorio.

A todos los profesores del Departamento de Microbiología, al personal administrativo y técnico por haberme ayudado siempre que lo he necesitado.

A los compañeros del Departamento de Microbiología con quienes he compartido muchas horas de trabajo, y en especial a Sonia Rodríguez, Laura Villanueva y Quim Vila por su valiosísima ayuda, al Dr. Jordi Sabaté por sus grandes explicaciones, y a los Dres. Jordi Urmeneta y Tony Navarrete por la ayuda prestada en la construcción del espectrofotómetro termoestático.

A la Dra. Montserrat Busquets, del Departamento de Bioquímica, por permitir la utilización del PhastSystem. También, a aquellas personas que han ayudado siempre.

Y finalmente, a mis padres y hermana por el apoyo moral que me han dado siempre.

Saber que no se sabe  
es una noble intuición.  
Pretender saber y no saber  
es una enfermedad.  
Y el que reconoce la enfermedad  
como tal no la sufre.

A mis padres y hermana



# **ÍNDICE**



---

**ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. LA PARED CELULAR VEGETAL.....	3
1.2. PECTINA.....	8
1.2.1. Composición y estructura.....	8
1.2.2. Grado de metilación.....	12
1.2.3. Enlaces de calcio.....	13
1.2.4. Aplicación de las pectinas.....	14
1.3. PECTINASAS.....	15
1.3.1. Características bioquímicas y clasificación.....	15
1.3.2. Pectinasas del género <i>Bacillus</i> .....	19
1.4. PECTATO LIASAS.....	21
1.4.1. Clasificación.....	21
1.4.2. Características bioquímicas.....	28
1.4.3. Estructura y mecanismo catalítico.....	30
1.5. APLICACIONES DE LAS PECTINASAS.....	35
1.5.1. Pectinasas ácidas.....	36
1.5.1.1. Producción de zumos.....	36
1.5.1.2. Producción de vinos.....	37
1.5.2. Pectinasas alcalinas.....	38
1.5.2.1. Textil.....	38
1.5.2.2. Otras aplicaciones.....	39
1.6. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS POR <i>Bacillus</i> .....	42
1.7. OBJETIVOS.....	48
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
2.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	51
2.2. MEDIOS DE CULTIVO, ANTIBIÓTICOS Y OTRAS SUSTANCIAS.....	52
2.2.1. Medios de cultivo.....	52
2.2.2. Antibióticos.....	53
2.2.3. Otras sustancias.....	54

2.3. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	55
2.3.1. Esterilización.....	55
2.3.2. Mantenimiento de microorganismos.....	55
2.3.3. Cultivo en medio líquido de microorganismos.....	55
2.4. MANIPULACIÓN DE ADN.....	56
2.4.1. Plásmidos utilizados.....	56
2.4.2. Obtención de ADN plasmídico.....	57
2.4.2.1. Minipreparación de ADN plasmídico.....	57
2.4.2.2. Aislamiento de ADN mediante columnas comerciales.....	58
2.4.3. Obtención de ADN cromosómico.....	58
2.4.4. Amplificación de ADN por PCR.....	60
2.4.5. Electroforesis en geles de agarosa.....	61
2.4.5.1. Desarrollo de la electroforesis.....	61
2.4.5.2. Tinción de ADN.....	62
2.4.5.3. Marcadores de peso molecular.....	62
2.4.6. Aislamiento de fragmentos de ADN.....	63
2.4.6.1. Electroelución.....	63
2.4.6.2. Purificación rápida de fragmentos de ADN.....	63
2.4.7. Tratamientos enzimáticos.....	64
2.4.7.1. Digestión con enzimas de restricción.....	64
2.4.7.2. Tratamiento con RNAsa.....	64
2.4.7.3. Tratamiento con fosfatasa alcalina.....	65
2.4.8. Hibridación Southern.....	65
2.4.8.1. Marcaje de fragmentos de ADN.....	65
2.4.8.2. Transferencia e hibridación de ADN.....	66
2.4.8.3. Detección de ADN marcado.....	67
2.4.9. Ligación de moléculas de ADN.....	68
2.4.10. Secuenciación de ADN.....	68
2.4.11. Análisis informático de secuencias.....	70
2.5. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS.....	71
2.5.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	71
2.5.2. Transformación de <i>Bacillus subtilis</i> .....	72

---

2.6. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	73
2.6.1. Clonación en vectores de expresión.....	73
2.6.2. Purificación por cromatografía de afinidad.....	74
2.6.3. Eliminación de colas de histidina.....	75
2.7. FRACCIONAMIENTO DE CULTIVOS BACTERIANOS.....	76
2.8. VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.....	77
2.9. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES MOLECULARES.....	77
2.9.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	77
2.9.1.1. Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie.....	78
2.9.1.2. Zimograma.....	79
2.9.2. Isoelectroenfoque.....	80
2.9.2.1. Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie.....	80
2.9.2.2. Zimograma.....	81
2.10. DETECCIÓN Y VALORACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	81
2.10.1. Detección de actividades enzimáticas en placa.....	81
2.10.2. Valoración de actividad hidrolasa.....	82
2.10.3. Valoración de actividad liasa.....	83
2.10.3.1. Influencia del grado de metilación en la actividad.....	84
2.10.3.2. Estudio de la influencia del ión calcio.....	84
2.10.3.3. Determinación de la temperatura óptima.....	84
2.10.3.4. Determinación del pH óptimo.....	84
2.10.3.5. Determinación de la termoestabilidad.....	85
2.10.3.6. Determinación del efecto del pH sobre la estabilidad.....	85
2.10.3.7. Efecto de diversos cationes sobre la actividad enzimática.....	85
2.11. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS.....	86
2.12. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	86
2.12.1. Cromatografía en capa fina.....	86
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS PECTINOLÍTICOS DE <i>Paenibacillus</i> sp. BP-23 Y <i>Bacillus</i> sp. BP-7.....	91
3.1.1. Selección de las cepas.....	91

3.1.2. Estudio de la producción de pectinasas.....	92
3.1.2.1. Producción de pectinasas por <i>Paenibacillus</i> sp. BP-23.....	93
3.1.2.2. Producción de pectinasas por <i>Bacillus</i> sp. BP-7.....	97
3.1.3. Caracterización de las actividades pectato y pectina liasa.....	101
3.1.3.1. Caracterización de las actividades pectato y pectina liasa de <i>Paenibacillus</i> sp. BP-23.....	101
3.1.3.2. Caracterización de las actividades pectato y pectina liasa de <i>Bacillus</i> sp. BP-7.....	104
3.1.4. Determinación de la composición enzimática de los sistemas pectinolíticos.....	106
3.1.4.1. Análisis zimográfico del sistema pectinolítico de <i>Paenibacillus</i> sp. BP-23.....	106
3.1.4.2. Análisis zimográfico del sistema pectinolítico de <i>Bacillus</i> sp. BP-7.....	108
3.2. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PECTATO LIASA A (PelA) DE <i>Paenibacillus</i> sp. BP-23.....	111
3.2.1. Clonación de <i>pelA</i> .....	111
3.2.2. Caracterización del plásmido recombinante.....	113
3.2.3. Determinación de las propiedades moleculares.....	115
3.2.3.1. Determinación del peso molecular.....	115
3.2.3.2. Determinación del punto isoeléctrico.....	117
3.2.4. Secuenciación y caracterización del gen <i>pelA</i> .....	118
3.2.5. Purificación de PelA.....	125
3.2.6. Caracterización enzimática de PelA.....	128
3.2.6.1. Estudio de la influencia del grado de metilación de la pectina en la actividad enzimática.....	128
3.2.6.2. Determinación del efecto del ión calcio en la actividad.....	130
3.2.6.3. Determinación del pH óptimo.....	131
3.2.6.4. Determinación de la temperatura óptima.....	131
3.2.6.5. Determinación de la termoestabilidad.....	132
3.2.6.6. Determinación del efecto del pH en la estabilidad.....	134
3.2.6.7. Determinación del efecto de iones metálicos.....	135
3.2.7. Determinación de las constantes cinéticas.....	136

---

3.2.8. Cromatografía en capa fina.....	137
3.3. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PECTATO LIASA YvpA DE <i>Bacillus subtilis</i> 168.....	139
3.3.1. Aislamiento y clonación de <i>yvpA</i> .....	139
3.3.2. Determinación de las propiedades moleculares.....	143
3.3.2.1. Determinación del peso molecular.....	143
3.3.2.2. Determinación del punto isoeléctrico.....	144
3.3.3. Secuenciación del gen <i>yvpA</i> .....	145
3.3.4. Purificación de YvpA.....	150
3.3.5. Caracterización enzimática de YvpA.....	152
3.3.5.1. Estudio de la influencia del grado de metilación de la pectina en la actividad enzimática.....	152
3.3.5.2. Determinación del efecto del ión calcio en la actividad.....	154
3.3.5.3. Determinación del pH óptimo.....	155
3.3.5.4. Determinación de la temperatura óptima.....	155
3.3.5.5. Determinación de la termoestabilidad.....	156
3.3.5.6. Determinación del efecto del pH sobre la estabilidad.....	158
3.3.5.7. Determinación del efecto de iones metálicos.....	159
3.3.6. Determinación de las constantes cinéticas.....	160
3.3.7. Cromatografía en capa fina.....	161
3.4. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES LANZADERA Y PRODUCCIÓN DE LA PECTATO LIASA A EN HUÉSPEDES HETERÓLOGOS.....	163
3.4.1. Construcción de vectores lanzadera.....	163
3.4.1.1. Construcción del vector lanzadera pMS1.....	163
3.4.1.2. Construcción del vector lanzadera pMS-R.....	165
3.4.1.3. Construcción de los vectores lanzadera pMS-RA y pMS-RS.....	166
3.4.2. Clonación de la pectato liasa PelA en los vectores lanzadera...	168
3.4.2.1. Expresión en <i>Escherichia coli</i> de la pectato liasa A clonada en los diferentes vectores lanzadera.....	168
3.4.2.2. Expresión en <i>Bacillus subtilis</i> MW15 de la pectato liasa A clonada en los diferentes vectores lanzadera.....	171

<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>176</b>
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS PECTINOLÍTICOS DE <i>Paenibacillus</i> sp. BP-23 Y <i>Bacillus</i> sp. BP-7.....	179
4.2. CARACTERIZACIÓN DE PelA DE <i>Paenibacillus</i> sp. BP-23 e YvpA de <i>Bacillus subtilis</i> .....	184
4.3. PRODUCCIÓN DE PelA en <i>Bacillus subtilis</i> .....	192
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>197</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>201</b>
<b>7. PUBLICACIONES.....</b>	<b>225</b>

# **INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología microbiana utiliza diversas herramientas metodológicas para explorar y explotar la biodiversidad natural de los microorganismos y sus enormes capacidades metabólicas. Esta disciplina incluye en su área de estudio la aplicación de microorganismos para mejorar el medio ambiente, la identificación de microorganismos con potenciales metabólicos que puedan ser utilizados para aplicaciones industriales, y el uso de métodos moleculares para valorar la distribución natural de los microorganismos en el medio ambiente y las funciones ecológicas que ellos realizan.

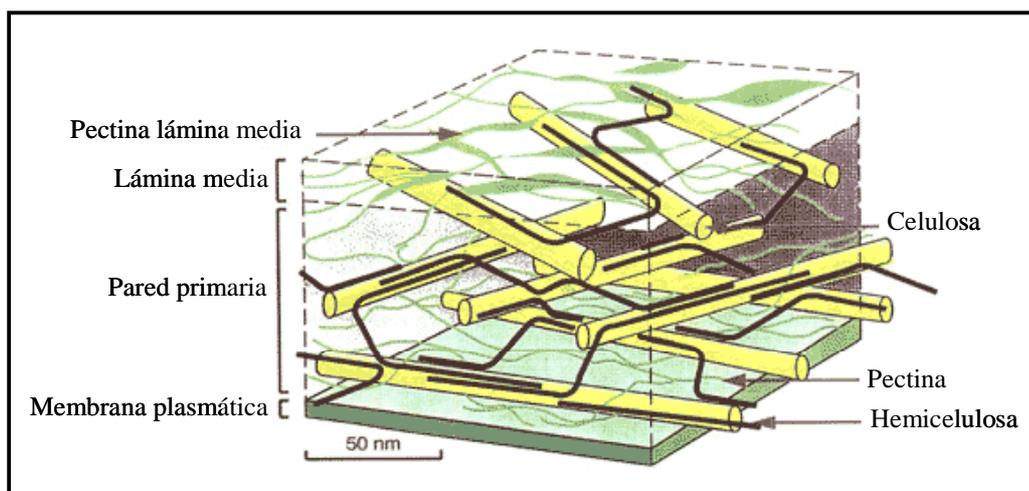
Los enzimas fueron descubiertos en la segunda mitad del siglo XIX y desde entonces han sido progresivamente utilizados en diversos procesos industriales. Son biocatalizadores extremadamente eficientes y altamente específicos. Con los avances en biotecnología en las últimas tres décadas, especialmente en las áreas de genética molecular e ingeniería de proteínas, los enzimas han encontrado campo de aplicación en muchos de los nuevos procesos industriales. En el siglo pasado ha habido una preocupación creciente por los efectos de la contaminación ambiental, y la presión pública ha influido tanto en la industria como en los gobiernos para su disminución. Los enzimas microbianos presentan aplicación industrial debido a su elevada eficiencia catalítica, a que su uso no daña el medio ambiente y a su alta rentabilidad económica (Cherry y Fidantsef, 2003). Por este motivo existe un renovado interés en sustituir los procesos productivos convencionales por procesos biotecnológicos en los que están involucrados microorganismos y enzimas microbianos tales como pectinasas (Alkorta *et al.*, 1998; Kashyap *et al.*, 2001), xilanasas (Beg *et al.*, 2001; Viikari *et al.*, 2001), celulasas (Bhat, 2000), mananasas (Montiel *et al.*, 2002), amilasas (Gupta *et al.*, 2003; Van der Maarel *et al.*, 2002), lacasas y ligninasas (Bajpai, 1999); los cuales no sólo proporcionan alternativas económicas viables, sino que además permiten el desarrollo de tecnologías respetuosas con el medio ambiente.

### 1.1. LA PARED CELULAR VEGETAL

Las células vegetales están rodeadas por una estructura rígida, la **pared celular**, que se asienta externamente sobre la membrana plasmática. La pared celular vegetal

proporciona la forma y el soporte a la planta, ayuda a regular procesos fisiológicos, incluyendo la respuesta de defensa, y actúa de barrera física a la invasión de patógenos. Está compuesta por una mezcla compleja de *carbohidratos*, *lignina* y *proteínas*, así como otras sustancias embebidas en ella, tales como *cutina*, *suberina* y ciertos *componentes inorgánicos* que varían de una planta a otra (Goodwin y Mercer, 1990; Showalter, 1993).

La pared celular de las plantas superiores está formada por tres capas: lámina media, pared primaria y pared secundaria (Fig.1.1.1.). La *lámina media*, primera capa que se deposita durante la división celular, está formada principalmente por polisacáridos pécticos y mantiene la unión entre las células adyacentes (Zarra y Revilla, 1993; Heredia *et al.*, 1995). Una vez completada la división se deposita la *pared primaria*, formada fundamentalmente por celulosa. La pared primaria continúa creciendo en área y espesor mientras las células hijas crecen en tamaño (McNeill *et al.*, 1984). La *pared secundaria* comienza a depositarse hacia el final del crecimiento de la célula y continúa cuando éste ha parado. Consiste básicamente en tres capas de microfibrillas de celulosa con diferente orientación embebidas de lignina, que realiza un papel cementante. Contiene además otros polisacáridos tales como hemicelulosas. En conjunto, es una estructura más gruesa que la pared primaria, con una mayor rigidez y resistencia (Heredia *et al.*, 1995; Smith, 1993).



**Figura 1.1.1.** Estructura de la pared celular.

Según la estructura de los componentes de la pared, se pueden distinguir dos fases: la *fase microfibrilar* y la *matriz*.

La **fase microfibrilar** es altamente cristalina y relativamente homogénea en composición química. Consiste en largas y estrechas microfibrillas de celulosa (Brett y Waldron, 1990).

La **celulosa** es el polisacárido más común encontrado en el reino vegetal. Consiste en un polímero no ramificado formado por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta(1\rightarrow4)$  y su función principal es asegurar la rigidez de la pared celular vegetal. Las microfibrillas de celulosa forman una estructura paracristalina estabilizada por puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, con cadenas orientadas de manera paralela y antiparalela (Tomme *et al.*, 1995).

Adicionalmente se pueden encontrar otros polisacáridos microfibrilares en la pared celular. En la mayoría de los hongos se encuentra la *quitina*, compuesta por cadenas largas y ramificadas de residuos N-acetil-glucosamina unidos por enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$  glucosídicos. Ciertas algas contienen microfibrillas compuestas de *mananos*, cadenas de manosa con uniones  $\beta(1\rightarrow4)$ ; o *xilanos*  $\beta(1\rightarrow3)$ , cadenas de xilosa con uniones  $\beta(1\rightarrow3)$  (Northcote, 1972; Preston, 1979).

La **matriz** es una fase amorfa de composición heterogénea formada de una gran variedad de polímeros, los cuales están unidos entre sí, así como a las microfibrillas, por diferentes tipos de enlaces (Brett y Waldron, 1990).

Tradicionalmente los polisacáridos matriciales se han clasificado en *polímeros pécticos* y *hemicelulosas*, tomando como criterio el tipo de método utilizado para su extracción de la pared. Las hemicelulosas necesitan métodos de extracción fuertes: soluciones alcalinas como NaOH al 17,5% o KOH al 4-24%. Por el contrario, las pectinas se extraen con métodos relativamente suaves tales como tratamiento con agua caliente, agentes quelantes, como el EDTA, que extraen el  $\text{Ca}^{2+}$  de la pared, o ácidos diluidos (Zarra y Revilla, 1993; Varner y Liang, 1989).

Las ***hemicelulosas*** son polisacáridos muy heterogéneos que constituyen los segundos por orden de abundancia en la pared celular vegetal. Son polisacáridos neutros, conteniendo habitualmente glucosa o xilosa, que presentan una cadena principal relativamente larga con ramificaciones cortas.

Algunos polisacáridos representativos de las hemicelulosas encontradas en la pared celular son: xilanos, mananos, glucomananos, galactoglucomananos, xiloglucanos y calosa (Tabla 1.1.1.).

Los ***polisacáridos pécticos*** son una mezcla compleja de polímeros ácidos y neutros, que se caracterizan por su capacidad para formar geles y actuar como sustancias cementantes en la lámina media y la pared primaria. La composición y estructura de los mismos se detalla en el apartado 1.2.

Algunos polisacáridos pécticos de la pared celular son: galacturonano, ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II, galactano, arabinogalactano y arabinano (Tabla 1.1.1.) (Heredia *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 2000).

**Tabla 1.1.1.** Polisacáridos de la pared celular.

<b>Polímeros</b>	<b>Características principales</b>
Celulosa	Cadenas lineales de glucosa $\beta(1\rightarrow4)$ .
<b>Sustancias pécticas</b>	
Galacturonanos	Cadenas de galacturonato $\alpha(1\rightarrow4)$ metilado en diferente proporción en los grupos carboxilos de los C-6.
Ramnogalacturonano I	Cadenas de galacturonano interrumpidas ocasionalmente por residuos de L-ramnosa $\alpha(1\rightarrow2)$ que pueden enlazar cadenas laterales que contienen galactosa y arabinosa.
Ramnogalacturonano II	Similar en composición al rhamnogalacturonano I pero conteniendo azúcares poco comunes como la apiosa y la metilfucosa.
Galactanos	Cadenas de galactosa $\beta(1\rightarrow4)$ .
Arabinogalactanos	Como los galactanos pero con cadenas laterales de L-arabinosa unidas al C-3 de los residuos de la cadena principal.
Arabinanos	Cadenas de L-arabinosa $\alpha(1\rightarrow5)$ con unidades $\alpha$ -L-arabinosa unidas al C-3 de los residuos de la cadena principal.
<b>Hemicelulosas</b>	
Xilanos	Cadenas de xilosa $\beta(1\rightarrow4)$ con cadenas laterales cortas de otros azúcares unidos al C-2 o al C-3 de los residuos de la cadena principal.
Mananos	Cadenas de manosa $\beta(1\rightarrow4)$ que pueden contener ramificaciones de $\alpha$ -galactosa enlazadas al C-6 de los residuos de manosa.
Glucomananos	Cadenas de manosa $\beta(1\rightarrow4)$ que contienen residuos de glucosa. La relación manosa:glucosa es de 3:1.
Galactoglucomananos	Como los glucomananos, pero con residuos $\alpha$ -galactosa simples unidos al C-6 de los residuos de manosa de la cadena principal.
Xiloglucanos	Cadenas de glucosa $\beta(1\rightarrow4)$ con cadenas laterales cortas de $\alpha$ -xilosa unidas al C-6 de los residuos de glucosa de la cadena principal.
Calosa	Polímero no ramificado de glucosa $\beta(1\rightarrow3)$ .

La **lignina** es la sustancia más abundante en la matriz de la pared celular de las plantas leñosas. Es un polímero formado por restos fenilpropanoides, derivados de los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico, unidos entre sí por enlaces éter (C-O-C) o C-C. Debido al carácter hidrofóbico que posee desplaza el agua de las paredes celulares secundarias, aumentando la resistencia química y la rigidez de la pared.

La hemicelulosa y los polisacáridos pécticos, así como la lignina, interactúan con las fibras de celulosa, creando una estructura rígida a lo largo de la pared celular vegetal.

## 1.2. PECTINA

Las pectinas son mezclas complejas de polisacáridos que pueden llegar a constituir un tercio del peso seco de la pared celular de las dicotiledóneas y algunas plantas monocotiledóneas (Hoff y Castro, 1969; Jarvis *et al.*, 1988). Las mayores concentraciones de pectina se han encontrado en la lámina media, con una disminución gradual en su abundancia hacia la membrana plasmática (Darvill *et al.*, 1980). Las pectinas tienen función lubricante y cementante en la pared celular de las plantas superiores. También están involucradas en la textura y maduración de los frutos, en el crecimiento de los vegetales y en la interacción entre las plantas huésped y sus patógenos.

### 1.2.1. Composición y estructura

La palabra pectina viene del nombre griego *pectos* que significa solidificado o coagulado. En 1790 Vauquelin descubrió la pectina como una sustancia soluble presente en los zumos de fruta, pero no fue hasta el 1824 cuando Braconnot, quien continuó el trabajo de Vauquelin, llamó a esta sustancia ácido péctico, ya que tenía propiedades gelificantes cuando se le añadía ácido a la solución. En 1924 Smolenski fue el primero en identificar al ácido poligalacturónico como componente de la pectina ([www.herbstreith-fox.de/pdf/ehfnatur.pdf](http://www.herbstreith-fox.de/pdf/ehfnatur.pdf)). En 1944 el Comité para la Revisión de la Nomenclatura de Sustancias Pécticas estableció la definición para las pectinas (Kertesz *et al.*, 1944), pero desde entonces la terminología ha ido cambiando y se han ido

utilizando definiciones modificadas. Actualmente se consideran pectinas los polisacáridos ácidos complejos de naturaleza coloidal que contienen un esqueleto de residuos de ácido galacturónico.

Atendiendo al tipo de modificación que sufre la cadena principal o esqueleto de la molécula, el término genérico pectina puede aplicarse a: *protopectinas*, *ácido péctico*, *ácido pectínico* y *pectina* (BeMiller, 1986). La protopectina es insoluble en agua, mientras las otras tres sustancias son totalmente o parcialmente solubles en agua (Serra *et al.*, 1992).

La **protopectina** es una matriz de sustancia péctica que por hidrólisis da lugar a la pectina o al ácido pectínico. Protopectina es el término utilizado para describir las sustancias pécticas insolubles en agua encontradas en los tejidos vegetales y de las cuales se forman las sustancias pécticas solubles (Kilara, 1982).

Los **ácidos pécticos** son galacturonanos que no contienen grupos metilos. También pueden denominarse ácido poligalacturónico. A las sales de los ácidos pécticos se les llama pectatos o **poligalacturonatos**.

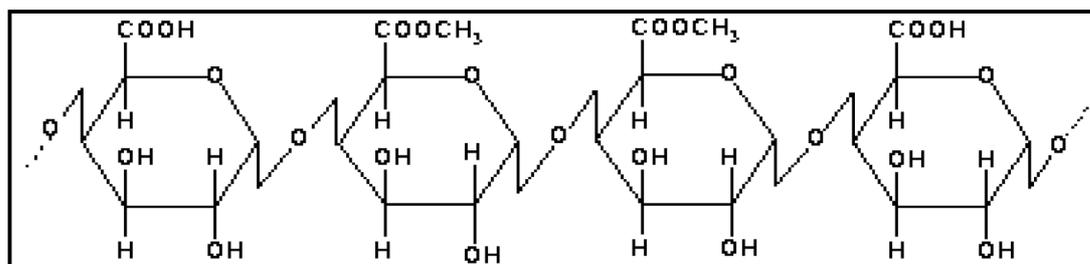
Los **ácidos pectínicos** son galacturonanos con cantidades variables de grupos metilos esterificados con los grupos carboxilos del C-6. A las sales de los ácidos pectínicos, se les llama pectinatos. Estas sustancias tienen la propiedad de formar geles con azúcares, con ácidos y, si el contenido de metilos es bajo, con otros componentes como sales de calcio (Kashyap *et al.*, 2001).

La **pectina** es una mezcla amplia de sustancias pécticas de diferente composición que contiene como componente principal ácido pectínico. La pectina en forma nativa se encuentra localizada en la pared celular y puede estar entrecruzada con otros polisacáridos estructurales y proteínas para formar protopectina insoluble.

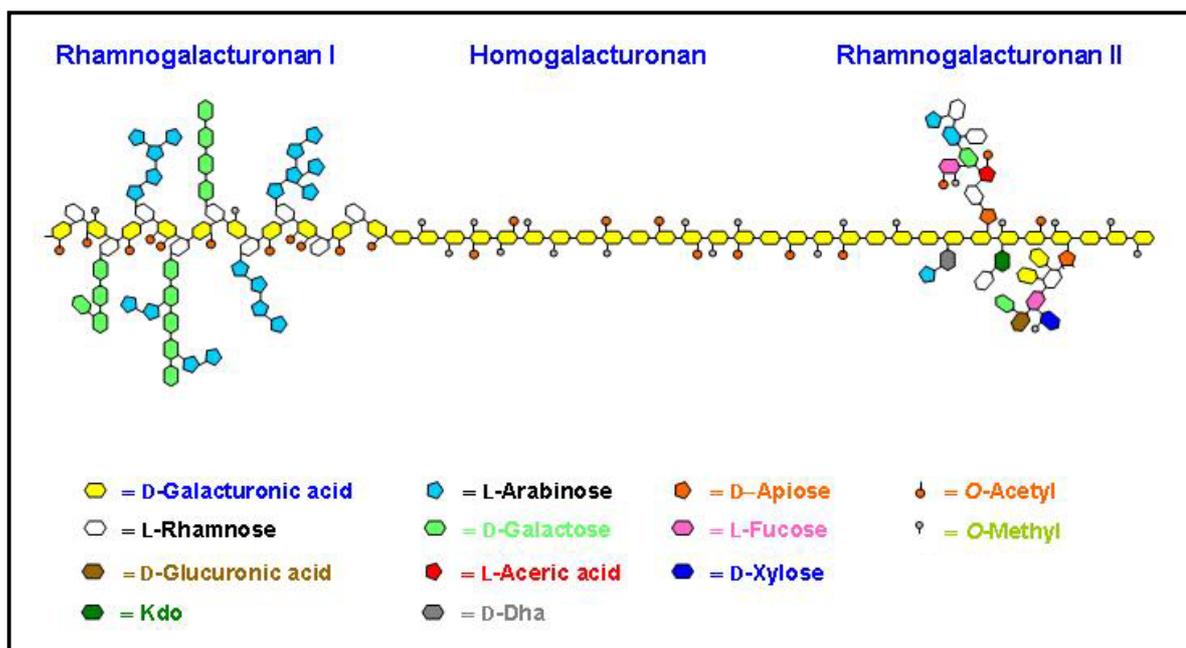
El componente más abundante de las pectinas es el ácido galacturónico, que forma el esqueleto principal de la molécula consistente en una cadena de residuos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  (Fig. 1.2.1.). Estos residuos pueden estar parcialmente metilados, esterificados en el C-6 con alcohol metílico, siendo el grado de metilación variable según el origen de la pectina. La pectina también

contiene con frecuencia residuos de ramnosa, arabinosa y galactosa. Generalmente la ramnosa forma parte de la cadena principal, mientras que la arabinosa y la galactosa se encuentran en las cadenas laterales unidas a la cadena principal formando ramificaciones (Heredia *et al.*, 1995).

Las pectinas son heteropolisacáridos complejos que contienen dos regiones definidas (De Vries *et al.*, 1983; Pérez *et al.*, 2000). La *región lisa* o **homogalacturonano** consiste en un esqueleto de residuos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$ , los cuales pueden estar acetilados en el C-2 o en el C-3, o metilados en el C-6. La *región rugosa* o **ramnogalacturonano I** es un heteropolímero en el que los residuos de ácido D-galacturónico del esqueleto están interrumpidos por residuos de L-ramnosa unidos por enlaces  $\alpha(1\rightarrow2)$ , a los cuales pueden unirse largas cadenas de arabinano y galactano mediante el C-4 (De Vries y Visser, 2001) (Fig. 1.2.2.). El **ramnogalacturonano II** es un polisacárido de 30 unidades que contiene un esqueleto de ácido galacturónico, sustituido por 4 cadenas laterales que contienen ramnosa, arabinosa y azúcares poco comunes como apiosa y metilfucosa (Pérez *et al.*, 2000). Se desconoce si el ramnogalacturonano II está unido covalentemente a la cadena principal de pectina (Fig. 1.2.2.).



**Figura 1.2.1.** Estructura de la molécula de pectina. Se representa una cadena de ácido poligalacturónico parcialmente metilesterificado.



**Figura 1.2.2.** Estructura esquemática de la pectina.

Las pectinas también se pueden clasificar según el proceso de extracción de la pared celular en tres tipos: *pectinas solubles en agua*, extraíbles con agua o soluciones salinas; *pectinas solubles en quelantes*, extraíbles mediante soluciones de agentes quelantes de calcio, como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), CDTA (ácido ciclohexanodiaminotetraacético) o hexametáfosfato; y *protopectinas*, extraíbles con soluciones alcalinas o ácidos diluidos calientes (Van Buren, 1991). La dificultad de la extracción de la protopectina puede ser debida a los puentes ácidos o básicos que anclan a la protopectina en la matriz de la pared. Una parte de las cadenas de protopectina están embebidas en la pared primaria y secundaria, el resto se encuentra en la lámina media. La pectina soluble en agua y la pectina soluble en quelantes derivan de la lámina media (Van Buren, 1991).

Las **pectinas solubles en agua** están formadas básicamente por homogalacturonano. El ácido galacturónico está esterificado con alcohol metílico, siendo el grado de metilación variable según el origen de la pectina.

Las **pectinas solubles en agentes quelantes** tienen una composición similar pero pueden presentar un 2% de ramnosa, principalmente sustituyendo al ácido galacturónico en la cadena principal, y del 10 al 20% de otros azúcares en forma de cadenas laterales.

Las **protopectinas** presentan una estructura de la molécula similar pero con un alto contenido de azúcares neutros, principalmente galactosa y arabinosa.

### 1.2.2. Grado de metilación

Dependiendo del origen de la pectina y del modo de extracción los grupos carboxilos de los residuos de ácido galacturónico presentan un grado variable de esterificación por metanol y pueden estar parcialmente o completamente neutralizados por iones sodio, potasio o amonio. En ciertas pectinas, adicionalmente, los grupos hidroxilos están parcialmente acetilados (Turquois *et al.*, 1999; Kashyap *et al.*, 2001).

Un factor importante que caracteriza las cadenas de pectina es el grado de metilación (DE) que se define como el número de moles de metanol por 100 moles de ácido galacturónico. Según este criterio, las pectinas han sido clasificadas en dos grupos: las que presentan más de un 50% de metilación, pectinas altamente metiladas (HM); y las que contienen menos del 50% de metilación, pectinas de baja metilación (LM). La principal fuente de las pectinas de alta metilación es la piel de cítricos y la manzana. La pectina de baja metilación se obtiene comercialmente mediante desmetilación química de la pectina de alta metilación (Pilgrim *et al.*, 1991; Constenla y Lozano, 2003).

Las pectinas probablemente se forman inicialmente con alto grado de metilación, pero éste disminuye después de que se insertan en la pared celular y lámina media. En general, las pectinas de los tejidos tienen un rango de metilación de entre 60 y 90%. El grado de metilación tiene un papel importante en la firmeza y cohesión de los tejidos vegetales. La reducción del grado de metilación tiene como consecuencia un aumento de la cohesión ya que la formación de grupos carboxilos libres aumenta la posibilidad de enlaces entre polímeros (Van Buren, 1991).

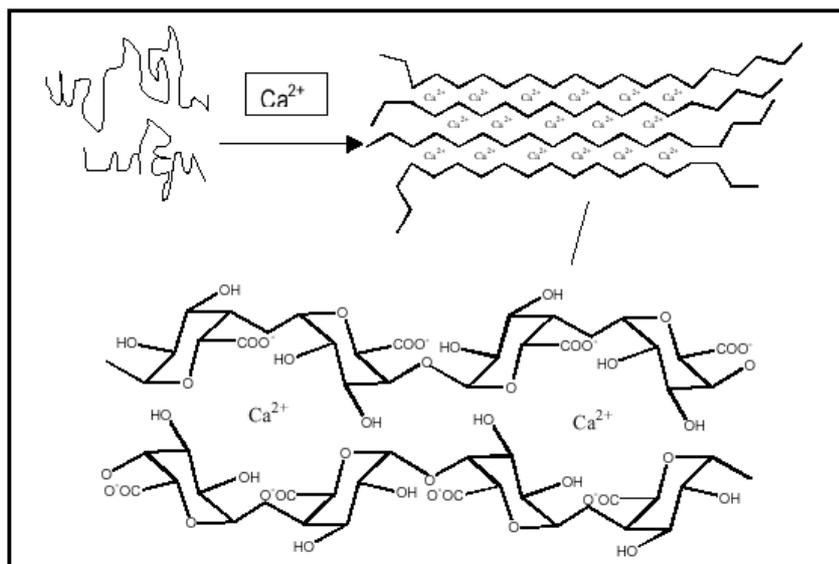
Las pectinas tienen la capacidad de formar geles en determinadas condiciones, cambios físicos o químicos que disminuyen la solubilidad de las moléculas de pectina. El mecanismo de gelificación y las propiedades de los geles dependen entre otros factores de la temperatura, del pH y del grado de metilación. Las pectinas de elevada metilación forman geles en medios ácidos y en presencia de sacarosa, mientras que las

pectinas de baja metilación forman geles en presencia de elementos alcalinos y de calcio (Turquois *et al.*, 1999).

### **1.2.3. Enlaces de calcio**

La capacidad del calcio para formar complejos insolubles con pectinas se debe a la unión de dicho ión con los grupos carboxilos libres de cadenas distintas del polímero, formando como consecuencia una red tridimensional (BeMiller, 1986). Los enlaces de calcio implican otros grupos funcionales aparte de los grupos carboxilo. En este sentido, la interacción fuerte entre el calcio con los átomos de oxígeno de los grupos hidroxilo de la pectina han sido descritos por Rees *et al.* (1982).

Para la coagulación y gelificación de la pectina inducida por calcio ha sido propuesta una estructura llamada *caja de huevos*, en la que los iones calcio interaccionan iónicamente por coordinación con oxígenos de dos cadenas adyacentes, originando un cruzamiento de cadenas (Rees *et al.*, 1982) (Fig. 1.2.3.). Los enlaces cruzados de calcio son más estables en presencia de otros enlaces cruzados vecinos cooperativos. La máxima estabilidad se alcanza cuando están presentes de 7 a 14 enlaces cruzados consecutivos. El calcio no coagula las pectinas con grado de esterificación mayor del 60% y las concentraciones necesarias para coagular pectinas con bajo grado de metilación aumenta a medida que el peso molecular disminuye (Van Buren, 1991).



**Figura 1.2.3.** Representación esquemática del modelo *caja de huevos* para la gelificación de pectina de bajo grado de esterificación.

La formación de geles puede resultar también de la interacción entre las cadenas poliméricas a través de puentes de hidrógeno y/o interacciones hidrofóbicas, formando como resultado una red tridimensional (BeMiller, 1986).

### 1.2.4. Aplicación de las pectinas

Tradicionalmente las pectinas se utilizan en la industria alimentaria como agentes gelificantes y espesantes. Suelen ser componentes habituales de productos alimentarios como mermeladas, jaleas, productos lácteos y también en productos cosméticos como geles y pastas. Actualmente las pectinas también se utilizan como fibras nutricionales y para la producción de proteína unicelular (Kravtchenko *et al.*, 1992; Takur *et al.*, 1997; Alkorta *et al.*, 1998). Recientemente, se ha incrementado su utilización tanto como fuente de energía, como de materia prima para procesos industriales (Pérez *et al.*, 2000).

Las pectinas se utilizan también en el sector farmacéutico como agentes detoxificantes, siendo conocidas por sus efectos antidiarréicos. La pectina en forma de carbohidrato coloidal actúa como lubricante en los intestinos al recubrir la mucosa con polisacáridos y promover el peristaltismo sin causar irritación, siendo adecuada como aditivo en la comida de bebés. La pectina reduce la toxicidad de algunos fármacos y

prolonga su actividad sin disminuir los efectos terapéuticos. Los microglóbulos de pectina gelatinizada pueden también utilizarse en quimioterapia de cánceres localizados como sistema de liberación intravascular de fármacos (Hoondal *et al.*, 2002).

## 1.3. PECTINASAS

### 1.3.1. Características bioquímicas y clasificación

Las pectinas son degradadas por enzimas pectinolíticos, *pectinasas*, los cuales presentan gran diversidad, debida en parte a la compleja naturaleza del sustrato degradado. Las plantas y los microorganismos son los principales productores de estos enzimas (Naidu y Panda, 1998).

Las pectinasas se clasifican en tres tipos principales: *enzimas desesterificantes* (pectinesterasas), *enzimas despolimerizantes* (hidrolasas y liasas) (Fig. 1.3.1.) y *protopectinasas* (Alkorta *et al.*, 1998; Kashyap *et al.*, 2001).

**Tabla 1.3.1.** Clasificación de los enzimas pectinolíticos y su nombre de acuerdo con la Comisión de Enzimas (EC) (Recomendaciones de la IUPAC-IUB).

Nombre recomendado por EC	Nombre común	Número EC	Sustrato	Modo de acción
<b><i>Desesterificación de sustratos</i></b>				
Pectina metil esterasa	Pectinesterasa	3.1.1.11	Pectina	Endo
<b><i>Despolimerización de sustratos</i></b>				
<b>Hidrolasas</b>				
Endopoligalacturonasa	Poligalacturonasa	3.2.1.15	Pectato	Endo
Exopoligalacturonasa 1	Poligalacturonasa	3.2.1.67	Pectato	EXO (terminal)
Exopoligalacturonasa 2	Poligalacturonasa	3.2.1.82	Pectato	EXO (penúltimo enlace)
Endopolimetilgalacturonasa	Pectina hidrolasa		Pectina	Endo
Exopolimetilgalacturonasa	Pectina hidrolasa		Pectina	Exo
<b>Liasas</b>				
Endopoligalacturonato liasa	Pectato liasa	4.2.2.2	Pectato	Endo
Exopoligalacturonato liasa	Pectato liasa	4.2.2.9	Pectato	Exo
Endopolimetilgalacturonato liasa	Pectina liasa	4.2.2.10	Pectina	Endo
Exopolimetilgalacturonato liasa	Pectina liasa		Pectina	Exo

Las **pectinesterasas** (pectina pectilhidrolasa, 3.1.1.11) (Tabla 1.3.1.), también conocidas como pectina metil esterasas, catalizan la desesterificación de los grupos metilo de la pectina dando lugar a ácido poligalacturónico o pectato (Kashyap *et al.*, 2001). Su actividad se puede determinar midiendo la liberación de metanol. Son sintetizadas por hongos, bacterias, levaduras y plantas superiores (Alkorta *et al.*, 1998). Las pectinesterasas de levaduras son activas a pH entre 3 y 5, y las bacterianas entre 7 y 8. Estos enzimas se inactivan por calentamiento a 80°C (Gerhartz, 1990).

Los **enzimas despolimerizantes o despolimerasas** (Tabla 1.3.1.) se clasifican atendiendo a tres aspectos, que se refieren al modo de ataque al esqueleto de ácido poligalacturónico. Estos aspectos siguen los siguientes criterios: a) el mecanismo químico de ruptura de los enlaces: hidrólisis o transeeliminación; b) la naturaleza del sustrato preferido: pectina o ácido poligalacturónico; c) el modo de corte del polímero: endo o exo (Alkorta *et al.*, 1998; Kashyap *et al.*, 2001).

Los enzimas despolimerizantes pueden romper los enlaces  $\alpha(1-4)$  glucosídicos entre los monómeros de ácido galacturónico de las pectinas por hidrólisis (hidrolasas) o por transeeliminación (liasas).

Las **hidrolasas** rompen los enlaces entre los monómeros de ácido galacturónico por adición de agua. Son activas a pH ácido y pueden ser inhibidas por el ión calcio (Guevara *et al.*, 1997). Se pueden dividir en dos grupos principales atendiendo al sustrato que hidrolizan:

Las **poligalacturonasas** o **pectato hidrolasas** degradan la pectina desmetilada, es decir, el ácido poligalacturónico o pectato. Pueden tener modo de acción endo o exo. Las endopoligalacturonasas (poli 1,4- $\alpha$ -D-galacturónido glucanohidrolasa, EC 3.2.1.15) están ampliamente distribuidas y producidas por una gran variedad de organismos como bacterias, hongos, levaduras, plantas superiores y nemátodos parásitos de plantas (Sakai *et al.*, 1993). Las exopoligalacturonasas (poli 1,4- $\alpha$ -D-galacturónido galacturonohidrolasa, EC 3.2.1.67; o poli 1,4- $\alpha$ -D-galacturónido digalacturonohidrolasa, EC 3.2.1.82) son producidas por hongos, algunas bacterias y plantas superiores (Sawada *et al.*, 2001). Generalmente las exopoligalacturonasas de hongos y plantas liberan ácido galacturónico, mientras que las bacterianas liberan ácido

digalacturónico (Rombouts y Pilnik, 1980; Sakai *et al.*, 1993), aunque existe poca información sobre exopoligalacturonasas de bacterias Gram positivas (Sawada *et al.*, 2001).

Las *polimetilgalacturonasas* o *pectina hidrolasas* degradan el polímero metilado, la pectina. Aunque hay algunos artículos que describen este tipo de actividad catalítica, la existencia de estas enzimas parece ser cuestionada ya que es posible que preparaciones de poligalacturonasas contaminadas con pectinesterasas, hayan sido consideradas por error como preparaciones de polimetilgalacturonasas (Alkorta *et al.*, 1998). Sin embargo, recientemente se han descrito algunas poligalacturonasas que degradan las zonas no esterificadas de la pectina, hecho que apuntaría a la existencia de auténticas pectina hidrolasas (Daas *et al.*, 1999).

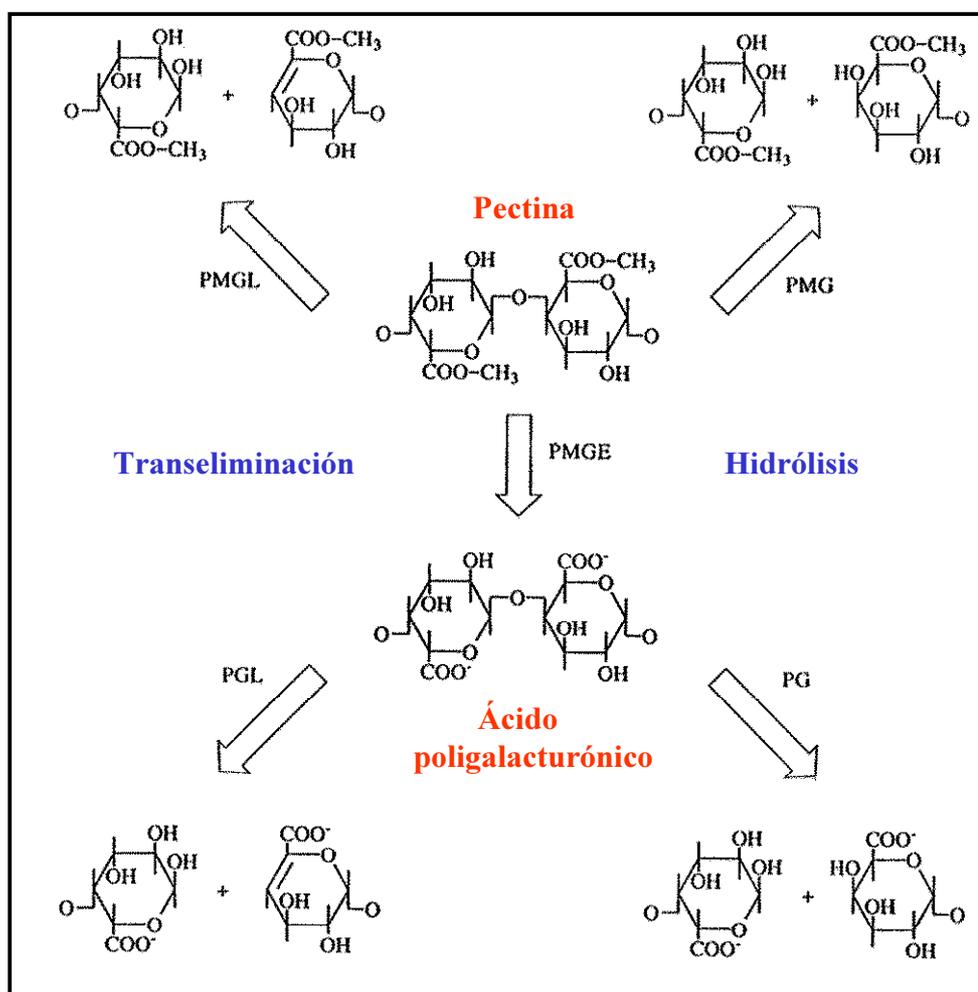
Las *liasas*, también llamadas transeliminadas, rompen los enlaces glucosídicos por  $\beta$ -eliminación. Según el sustrato sobre el que actúen sea pectina o ácido poligalacturónico se clasifican en polimetilgalacturonato liasas o poligalacturonato liasas, respectivamente.

Las *polimetilgalacturonato liasas* o *pectina liasas* (polimetoxigalacturónido liasa, EC 4.2.2.10) fueron descubiertas por Albersheim en 1960 (Kozianowski *et al.*, 1997). Todas las descritas hasta la fecha actúan de forma endo (Alkorta *et al.*, 1998). Son sintetizadas mayoritariamente por hongos, aunque también se han identificado en algunas bacterias, tales como *Erwinia* y *Pseudomonas* (Kozianowski *et al.*, 1997).

Las *poligalacturonato liasas* o *pectato liasas* (poli 1,4- $\alpha$ -D-galacturónido liasa, EC 4.2.2.2; o poli 1,4- $\alpha$ -D-galacturónido exoliasa, EC 4.2.2.9) fueron descritas por primera vez por Starr y Moran (1962) en cultivos de *Erwinia carotovora*. Están ampliamente distribuidas entre los microorganismos patógenos de plantas y son el objeto de diferentes estudios debido a su posible papel como factores de virulencia (Barras *et al.*, 1994; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). También se han encontrado en numerosos microorganismos saprófitos, incluyendo los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Amycolata* y en algunas bacterias termófilas (Nasser *et al.*, 1990; Charnock *et al.*, 2001; Tamaru y Doi, 2001; Brühlmann y Keen, 1997; Kozianowski *et al.*, 1997). Estas enzimas actúan a pH alcalino, entre 8 y 10, pueden

tener modo de acción endo o exo, y requieren iones calcio para la actividad enzimática (Sakai *et al.*, 1993).

Las **protopectinasas** son enzimas que solubilizan la protopectina. Se clasifican en dos tipos (Sakai *et al.*, 1993). El tipo A degrada el ácido poligalacturónico de la protopectina mientras que el tipo B degrada las cadenas de polisacáridos que conectan el ácido poligalacturónico con otros constituyentes de la pared celular. En este tipo de enzimas se incluirían las hidrolasas y liasas que degradan el ramnogalacturonano (Suykerbuyk *et al.*, 1997; De Vries y Visser, 2001).



**Figura 1.3.1.** Esquema de la acción enzimática de las pectinasas. PMGE: polimetilgalacturonato esterasa (pectinesterasa); PMGL: polimetilgalacturonato liasa (pectina liasa); PMG: polimetilgalacturonasa (pectina hidrolasa); PGL: poligalacturonato liasa (pectato liasa); PG: poligalacturonasa (pectato hidrolasa).

La base de datos CAZy (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>), creada por Bernard Henrissat, Pedro Coutinho y Mark Stam, describe las familias de enzimas que degradan, modifican o crean uniones glucosídicas, así como los módulos de unión a carbohidratos de los mismos. La clasificación se ha realizado atendiendo a homología en el plegamiento y estructura de los enzimas o de sus módulos catalíticos.

Según esta base de datos, las pectinasas se pueden agrupar dentro de tres clases enzimáticas: *carbohidrato esterasas* (CEs), *glucosidasas* y *transglucosidasas* (GHs) y *polisacáridos liasas* (PLs). En la primera de estas clases, las carbohidrato esterasas, se incluyen las pectina metil esterasas (EC 3.1.1.11) (CE8), pectina acetil esterasas (EC 3.1.1.-) (CE12) y ramnogalacturonano acetilesterasas (EC 3.1.1.-) (CE12). Los dos últimos tipos son enzimas que liberan grupos acetilos de la pectina. Por su parte, en la clase enzimática glucosidasas y transglucosidasas se encuentran las poligalacturonasas, endopoligalacturonasas (EC 3.2.1.15) o exopoligalacturonasas (EC 3.2.1.67 y 3.2.1.82), que degradan homogalacturonanos; y también las ramnogalacturonasas (EC no definido), que degradan ramnogalacturonano. Todos estos enzimas pertenecen a la familia 28 de las glucosil hidrolasas 28 (GH28). En la tercera clase, polisacárido liasas, se encuentran las pectato liasas, endo o exopoligalacturonato liasas, y las pectina liasas. Las endopoligalacturonato liasas (EC 4.2.2.2) pertenecen a las familias polisacárido liasa PL1, PL2, PL3, PL9 y PL10; las exopoligalacturonato liasas (EC 4.2.2.9) a las familias PL1, PL2 y PL9; y las pectina liasas (EC 4.2.2.10) a la familia PL1. Las ramnogalacturonano liasas pertenecen a las familias PL4 y PL11. Las ramificaciones del ramnogalacturonano, compuestas de galactano, arabinano y arabinogalactano, son degradadas por numerosos enzimas, incluyendo galactanasas (GH53) y arabinanasas (GH43) (Brown *et al.*, 2001).

### 1.3.2. Pectinasas del género *Bacillus*

El género *Bacillus* produce diferentes enzimas pectinolíticos, que se encuentran distribuidos entre todas las familias enzimáticas citadas anteriormente menos en las familias PL2 y PL4. Es de destacar que la mayoría de los enzimas identificados hasta el momento en este género son pectato liasas, únicamente uno de ellos es pectina liasa y otro tiene actividad hidrolasa.

Las liasas de la familia PL1 son las más numerosas y presentan pesos moleculares entre 30 y 50 kDa (Tabla 1.3.2.). A esta familia pertenece la única pectina liasa de *Bacillus* descrita hasta la fecha (Sakamoto *et al.*, 1996). La familia PL3 contiene pectato liasas de pequeño peso molecular, entre 20 y 25 kDa (Tabla 1.3.3.). La familia PL9 contiene dos pectato liasas que presentan un tamaño molecular superior a 72 kDa (Tabla 1.3.4.). Por último, la familia PL10 contiene pectato liasas con peso molecular entre 35 y 140 kDa (Tabla 1.3.5.). La única hidrolasa del género *Bacillus* identificada hasta la fecha es la poligalacturonasa Peh358, que pertenece a la familia 28 de las glucosil hidrolasas (Tabla 1.3.6.).

**Tabla 1.3.2.** Pectinasas de *Bacillus* pertenecientes a la familia Polisacárido Liasa 1.

Proteína	Organismo	EC	GenBank	Referencia
Pectato liasa	<i>B. agaradhaerens</i>	4.2.2.2.		
Pectato liasa	<i>B. halodurans</i>	4.2.2.2.		
BH0698	<i>B. halodurans</i> C-125	n.d.	AP001509	
BH3819	<i>B. halodurans</i> C-125	n.d.	AP001520	
Pectato liasa	<i>B. licheniformis</i>	4.2.2.9.	AJ517194	
Pectato liasa	<i>Bacillus</i> sp. KSM-P103	4.2.2.2.	AB015044	Hatada <i>et al.</i> , 1999
Pectato liasa	<i>Bacillus</i> sp. KSM-P7	4.2.2.2.	AB015043	Kobayashi <i>et al.</i> , 1999a
Pectato liasa	<i>Bacillus</i> sp. AAI12	4.2.2.2.		
Pectato liasa	<i>Bacillus</i> sp. I534	4.2.2.9.		
Pectato liasa Pel-34K	<i>Bacillus</i> sp. P-2850	n.d.	AB080666	
Pectato liasa Pel-4A	<i>Bacillus</i> sp. P-4-N	4.2.2.2.	AB041769	Kobayashi <i>et al.</i> , 2000
Pectato liasa Pel-4B	<i>Bacillus</i> sp. P-4-N	4.2.2.2.	AB042100	Hatada <i>et al.</i> , 2001
Pectato liasa Pl47	<i>Bacillus</i> sp. TS-47	4.2.2.2.	AB045986	Nakaniwa <i>et al.</i> , 2003
	<i>B. subtilis</i>	n.d.	AX601431	
Pectina liasa	<i>B. subtilis</i> IFO 3134	4.2.2.10.	D83791	Sakamoto <i>et al.</i> , 1996
Pectato liasa	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str.168	4.2.2.2.	D26349	Nasser <i>et al.</i> , 1993
PelB	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str.168	n.d.	Z99114	

n.d. No determinado

**Tabla 1.3.3.** Pectinasas de *Bacillus* pertenecientes a la familia Polisacárido Liasa 3.

Proteína	Organismo	EC	GenBank	Referencia
Pectato liasa Pel-15	<i>Bacillus sp.</i> KSM-P15	4.2.2.2.	AB011839	Hatada <i>et al.</i> , 2000
Pectato liasa Pel-28K	<i>Bacillus sp.</i> P-2850	n.d.	AB081830	
YvpA	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str.168	n.d.	AF017113	Kunst <i>et al.</i> , 1997

n.d. No determinado

**Tabla 1.3.4.** Pectinasas de *Bacillus* pertenecientes a la familia Polisacárido Liasa 9.

Proteína	Organismo	EC	GenBank	Referencia
PelX (BH0494)	<i>B. halodurans</i> C-125	n.d.	AP001508	Takami <i>et al.</i> , 1999
Pectato liasa H	<i>Bacillus sp.</i> KSM-P15	4.2.2.2.	AB028878	Ogawa <i>et al.</i> , 2000

n.d. No determinado

**Tabla 1.3.5.** Pectinasas de *Bacillus* pertenecientes a la familia Polisacárido Liasa 10.

Proteína	Organismo	EC	GenBank	Referencia
Pectato liasa (PelE)	<i>B. alcalophilus</i> NTT33	4.2.2.2.	AF303225	Zhai <i>et al.</i> , 2003
Pectato liasa E	<i>Bacillus sp.</i> KSM-P15	4.2.2.2.	AB028877	Sawada <i>et al.</i> , 2000
Pectato liasa P358	<i>Bacillus sp.</i> P-358	n.d.	AB062880	Kobayashi <i>et al.</i> , 2003

n.d. No determinado

**Tabla 1.3.6.** Pectinasas de *Bacillus* pertenecientes a la familia Glucosil hidrolasa 28.

Proteína	Organismo	EC	GenBank	Referencia
Poligalacturonasa (Peh358)	<i>Bacillus sp.</i> P-358	n.d.	AB062879	Sawada <i>et al.</i> , 2001

n.d. No determinado

## 1.4. PECTATO LIASAS

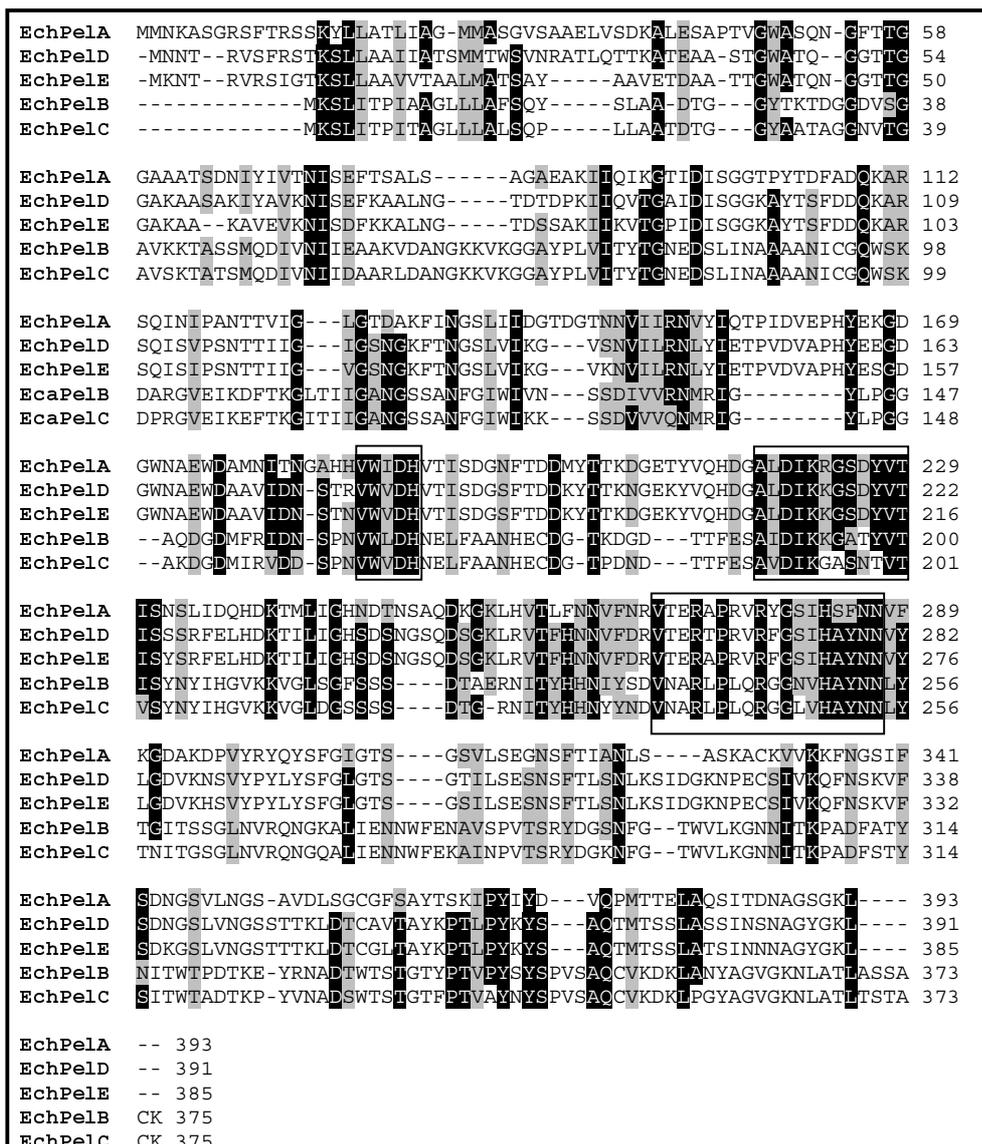
### 1.4.1. Clasificación

Las pectato liasas pertenecen a las familias PL1, PL2, PL3, PL9 y PL10 de la clase enzimática de las polisacárido liasas. Esta clasificación en familias refleja la

existencia de grupos de homología de secuencia entre las pectato liasas (Shevchik *et al.*, 1997, 1999b). El alineamiento de secuencias de los enzimas de cada familia ha permitido identificar secuencias consenso para la mayoría de ellas. Se muestran a continuación alineamientos de secuencias de pectato liasas de las distintas familias.

### **Familia PL1:**

Contiene numerosas pectato liasas bacterianas, pectina liasas fúngicas y proteínas de plantas. Pertenecen a esta familia las pectato liasas PelA (Favey *et al.*, 1992), PelB (Keen y Tamaki, 1986), PelC (Tamaki *et al.*, 1988), PelD (Van Gijsegem, 1989) y PelE (Keen y Tamaki, 1986) de *Erwinia chrysanthemi*. Estas pectato liasas se han clasificado en dos subfamilias, PelADE y PelBC (Tardy *et al.*, 1997). Ambas comparten tres secuencias consenso: vWiDH, AxDIKxxxxxVTxS y VxxRxPxxRxGxxHxxxN (Hinton *et al.*, 1989; Barras *et al.*, 1994; Henrissat *et al.*, 1995) (Fig. 1.4.1.). En la tercera de estas secuencias se encuentra el residuo de arginina (R<sup>218</sup> en PelC madura, posición 240 en la figura) identificado como residuo catalítico abstrayente de protones (Yoder *et al.*, 1993; Scavetta *et al.*, 1999). La región vWiDH, altamente conservada podría estar involucrada en el plegamiento de la proteína y el transporte a la membrana (Brühlmann y Keen, 1997).



**Figura 1.4.1.** Alineamiento de aminoácidos de diferentes pectato liasas pertenecientes a la Familia PL1. El alineamiento fue realizado mediante el programa CLUSTAL W. Los aminoácidos idénticos en al menos 4 secuencias están sombreados. Los aminoácidos conservados en al menos 4 secuencias están marcados en gris. Los bloques de residuos conservados en las pectato liasas de la familia PL1 han sido enmarcados con un recuadro. Las secuencias mostradas son: EchPelA, pectato liasa PeIA de *Erwinia chrysanthemi*; EchPelD, pectato liasa PeID de *Erwinia chrysanthemi*; EchPelE, pectato liasa PeIE de *Erwinia chrysanthemi*; EchPelB, pectato liasa PeIB de *Erwinia chrysanthemi*; y EchPelC, pectato liasa PeIC de *Erwinia chrysanthemi*.

**Familia PL2:**

Forman parte de ella pectato liasas periplásmicas como PelP o PelB de *Erwinia carotovora* (Hinton *et al.*, 1989), PelY de *Yersinia pseudotuberculosis* (Manulis *et al.*,

1988) y PelW de *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik *et al.*, 1999b) (Fig. 1.4.2.). Estos enzimas no presentan homología significativa con las pectato liasas de la familia PL1.

EchPelW	-----MSIFTDLNTSR-KWQIDQWLSAVNSHIEKIQOYG---HSVVNPTPLLADGF	47
EcaPelP	MKK----FALSLLAGLVALQASAAATPDRLEITIVNQYVDNVLTAKAGDQYHGQSPTPLLADGI	56
YpsPelY	MKKRALLSMSVLAFLYIPAGQAAEIDRLITVVKQYVDNVLNKASDTYHGDKPSPLLADGV	60
EchPelW	EIKTQSPVVMQFPDGDHAPIISNFASQQNWLRLILISMSVITETEKYRHLAFQOSEYFLNRF	107
EcaPelP	DPRTGKQMEWIFPDGRHVLVSNFSAQQNLMRVLVGLSNLSGNPSYKQRAEAIKVFHFQHY	116
YpsPelY	DPRTGQQMEWIFPDGRRVAVLNFSAQQNLMRVMSGLSELSDGDPQYQKRAEDIVRHFQNY	120
EchPelW	VDENSGLFYWGGHRFINLDTLASEGPESKSMVHELKHHLPYYEFLHCVNPEKTRHFIOGF	167
EcaPelP	QDE-SGLLWGGHRFVDEKTLQPEGPSEREMVHELKNAVPPYDLMFSDKEATARFIRGF	175
YpsPelY	QDN-SGLLYWGGHRFVDEKTLQPEGPSERKEKVHELKNAVPPYDLMFSDVSDATTRFIRGF	179
EchPelW	WNAHVEDWVSCLDLGRHGDYARQRDPDVFLHSRHDVVTAPANWPELPLTKGLTFVNAQTDLI	227
EcaPelP	WNAHVYDVKIMETSRHGKYGQKMG--ALWQSPFEQQ-----PPFFATKGLSFLNAGNDLI	228
YpsPelY	WNAHVYDWRILETSRHGEGYKPMG--ALWESTFEQQ-----PPFFATKGLSFLNAGNDLI	232
EchPelW	YAAFVYARHTGDAHAAAWCKHLYROYVLAARNPETGMPVYQFSSPLQRQVPVADDNQTSW	287
EcaPelP	YSASLLYKYNKEDGALVWAKRLAQOYVLPDCAKATGLGVYQFTQALKRD-ETDDADTHSK	287
YpsPelY	YSASLLYKYQQDQCALVWAKRLADQYVLPDCAKATGLGVYQFTQALKRE-EPTDDADTHSK	291
EchPelW	FGDRAQRQFGPEFCATAREANVLFDR-DMRPLLIIDNPLAMLDILRHQP--DAEILTWVIAG	344
EcaPelP	YGDRAQRQFGPEFGPTALEGNMMLKGRSTSTIYSENALMQLQLGKDLGAEGKELTWTTDG	347
YpsPelY	FGDRAQRQFGPEFCPTALEGNMMLKGRSTSTLYSENALMQLQLGKDLGGQGDLLKWTVDG	351
EchPelW	LKNYQYAYVDVNSNSLRPMWNGODMTDYCFKRDGYGKAGTVLKPFPLEGDYLLPLVRA	404
EcaPelP	LKAFAKYAYNESDNTFRPMLANGKDLNSVYVLPDCAKATGLGVYQFTQALKRD-ETDDADTHSK	407
YpsPelY	LKAFAKYCYNEQDNTFRPMLANGKDLNSVYVLPDCAKATGLGVYQFTQALKRE-EPTDDADTHSK	411
EchPelW	WLLSDDDDLHTLIVTMLSR-----LEKQGIHQSSAPFLLLALTELAHAKQSA	451
EcaPelP	YTVLPDAELWRVARGIARAQGLGELGSAPGKDVKVDLATKNNDPYALFALLDLYQASKVK	467
YpsPelY	YAVDNDPLLWKVARGIASDQGLGDISAPGKEMKVKLDTTNSDPYALFALLDLYNASQVA	471
EchPelW	QWAEYAWQMAEILFKRYFHHGLFVRSSEHRYVRLDPPFAILLTIIAACRNKWSVPAVL	511
EcaPelP	DYLSLAEKVGDNIISTRYKNGFFMADPNRQYADVDTIEPYALLALEAAVRNQPOSVAPFL	527
YpsPelY	EYRSLAEKVADNIIKTRYIDGFFMASPDRQYADVDAIEPYALLALEASLRNKQAVAPFL	531
EchPelW	TQCGYIHGDYRIN-GESRVIYDTGIYLPRKINPLILFLQIHYY	553
EcaPelP	NGACFTEGGYRMEGSTRISTRDNEIFLLNVTGTLKPNK--	568
YpsPelY	NGACFTE-----VLT-----	541

**Figura 1.4.2.** Alineamiento de aminoácidos de diferentes pectato liasas pertenecientes a la Familia PL2. El alineamiento fue realizado mediante el programa CLUSTAL W. Los aminoácidos idénticos están sombreados y los conservados están marcados en gris. Las secuencias mostradas son: EchPelW, pectato liasa PelW de *Erwinia chrysanthemi*; EcaPelP, pectato liasa PelP de *Erwinia carotovora*; e YpsPelY, pectato liasa PelY de *Yersinia pseudotuberculosis*.

### Familia PL3

A esta clase pertenecen las pectato liasas PelB y Pel-3 de *Erwinia carotovora* (Heikinheimo *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1994); las pectato liasas A, B, C y D de *Fusarium solani* (González-Candelas y Kolattukudy, 1992; Guo *et al.*, 1995b, a, 1996) y PelI de *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik *et al.*, 1997) (Fig. 1.4.3.). Estas pectato liasas contienen 4 regiones de residuos conservados (Shevchik *et al.*, 1997).

FsoPelA	-----MKFTAAFVVAALVGT-----SSAAVTKTLPKSAGATSEFTAVPVKG----	40
FsoPelB	-----MKASALIIAAVTG-----ASAAVTTVLPASAGVQSEFTALPVKRG----	40
FsoPelC	-----M-----ACLGYTGGVPKPTDHI SNSKVIEVKAG----	28
FsoPelD	-----MHAPSI VTVLAALPAAM-----ACLGYTGGVPKATGSKSL SAPKTLKKG----	44
EchPelI	LRERIAVLDAETRTRTFKDADTNSGLNYWVVDVVENQAQVVSNAVTTAENAGPLRAA----	115
EcaPelB	GSEKIAELNSTDRFTFDLTANPKSDYWVVDTVSSNNNVOKSNAAQTAPE--APLRAAPLK	118
EcaPel-3	GSEKIAELNSSDRFTFDLTANPQSDYWVVDTVSGNNSVLKSNAASTAPE--APLRAAPLK	118
FsoPelA	---SYDGGMKRFEREPKVKCGQDE-----TGEKDAMFLENGATLSNVIIIGAS-QAECV	90
FsoPelB	--DKYNGMKRFVRNPTTCKDQYE-----TGEKDAFILED GATLSNVIIIDRS-SGECV	91
FsoPelC	--QVYDGKWKYDRGSGACKGQNE-----GGDKDAVFLLEHGATLKNVIIIGKD-QSECV	99
FsoPelD	--EVFDAGWVRVDRG-VKCSGQAE-----GGSKDAVFILEEGATLRNVIIIGAN-QRECI	94
EchPelI	KASSECKPGATFENRTVDCGGVTIGTSCPNDSKQKPLIILKNATVKNLRI SASGRADCI	175
EcaPelB	AASSECKAGAVIKDKTVDCGGITLGLSCTGSDSKOPPVITLENATIKNLRISEKGGSDCI	178
EcaPel-3	AASPECKAGAVIKDKTVDCGGITLGLSCTGSDSKOPPVITLENATIKNLRISEKGGSDCI	178
FsoPelA	HCK-GTCTLNNVWVADVCEDAVTLKQTSYINGGCAFHAS-----DKLLOFNGRGT	142
FsoPelB	HCK-GTCTLNNVWVADVCEDAATFKQKSGTSTINGGCAFSAQ-----DKVLQFNGRGT	143
FsoPelC	HCK-GHCTLEFVWFEDVCEDAISLIG-K-ESWIIIGGAYHAS-----DKVVOHNGCGT	129
FsoPelD	HCK-GSCNIEFAWFEDVCEDAISILG-SGTANIIIGGAYHAS-----DKVVOHNGCGH	145
EchPelI	HCDSGNCTIENVIIWEDVCEDAATNNG--KTMTIVGGIAHNAKDG YGGKFDKVLQHNKSKNS	233
EcaPelB	HCKSGNCR IENVIIWEDVCEDAATNLG--KTMTIVGGVAHNTTNGP GGKFDKVLQONAKNS	236
EcaPel-3	HCKSGNCR IENVIIWEDVCEDAATNLG--KTMTIVGGVAHNTTNGP GGKFDKVLQONAKNS	236
FsoPelA	VHVKD---FYAEDYGKLSRSCGNCKD--NGGPRNVIVENSVAV-DGGVLCGINTNYGDTCK	197
FsoPelB	LNVND---FYVQDYGKLVNRNCGNCEG--NGGPRNINIKGVVAK-NGGELCGVNHNYGDVCT	198
FsoPelC	VNIIN---FYVEDYGKLYRSCGNCS--KQCKRNVYIEGVTA K-NGGELAGINANYGDTAT	183
FsoPelD	VNIVN---FYANDYGKLYRSCGNCKGNTNCKRSVHMEGTAV-KGGELIGINTNYGDKAT	201
EchPelI	TTVVKGNFTLTGEHGKLRSCGDCSN--NGGPRFLTVTSATVNGTIDS LAGVNRNYGDVAT	292
EcaPelB	HTIVQGNFTLTGQHGKLRSCGDCITN--NGGPRNLTIISATVNGTIDS LAGVNRNFGDVAE	295
EcaPel-3	HTIVQGFNFTLTGQHGKLRSCGDCITN--NGGPRNLTIISATVNGTIDS LAGVNRNFGDVAE	295
FsoPelA	VINSCQD----KGKYCDRYECN---SSGKEPTKIG-SGPDGKYCTVIGSTTSC-	242
FsoPelB	ITDSCQN----KGKSCQAYTCN---DQKKEPKKFGPAGDNGKSLVKSLRTNC-	244
FsoPelC	LKNVCAD----AKQKCTMYNCC---AGGCEPKKIG-----ACPA-----	215
FsoPelD	YSNNCY-----PKTQCGYKGC DKSKGCECEPSKAA-----KC-----	233
EchPelI	ISGLKIKNYKEGKPPVCEEFKGVV--KCOGSTEKYK-EKWDTTNCKVSRSGVSKL	344
EcaPelB	IRDLRIKNYKAGNPKICEEFKCI E--KCKGKTEKYK-EFWDTKNCKVSRSNVKAL	347
EcaPel-3	IRDLRIKGYKEGKPPVCEEFNCEV--KCKGKSDKYK-EFWDTKNCKVSRSNVKPL	347

**Figura 1.4.3.** Alineamiento de aminoácidos de diferentes pectato liasas pertenecientes a la Familia PL3. El alineamiento fue realizado mediante el programa CLUSTAL W. Los aminoácidos idénticos en al menos 5 secuencias están sombreados. Los aminoácidos conservados en al menos 5 secuencias están marcados en gris. Los bloques de residuos conservados en las pectato liasas de la familia PL3 han sido enmarcados con un recuadro. Las secuencias mostradas son: FsoPelA, pectato liasa PelA de *Fusarium solani*; FsoPelB, pectato liasa PelB de *Fusarium solani*; FsoPelC, pectato liasa PelC de *Fusarium solani*; FsoPelD, pectato liasa PelD de *Fusarium solani*; EchPelI, pectato liasa PelI de *Erwinia chrysanthemi*; EcaPelB, pectato liasa PelB de *Erwinia carotovora*; y EcaPel-3, pectato liasa Pel-3 de *Erwinia carotovora*.

### Familia PL9

Pertencen a esta clase PelL y PelX de *Erwinia chrysanthemi* (Lojowska *et al.*, 1995; Shevchik *et al.*, 1999a) (Fig. 1.4.4.).

EchPelL	-----	1
EchPelX	MKYAASGLLSVALNSLLLLGNSQR FATQDVAPVWRGIAFGQSTDVNFATNVLPEKVG VND	60
EchPelL	-----	1
EchPelX	VTINGKKLTVNDKADLSAPITIESRGGKIAN THDGLTFFYTQLPANVNF TLQSDVTVEQF	120
EchPelL	-----	1
EchPelX	GPESDAKPN AQEGAGLLVRDILGVPRQEP LKEGYEEFPAASNMMVMNAIMTQDKKSKTEVK	180
EchPelL	-----MKYL NCFISTC-----	11
EchPelX	MQLISRNGVTQPWGNTNAEITR TSYQEKINLEQTP TFR LKLERTNDGFI TAYAPK CSDQW	240
EchPelL	-----LA A FFLVNSTSVLAADCS S DLTSG-----I S T K R I Y	42
EchPelX	VSKTVKGADLVTHQDKDHYVGF FASRNAKITISNASL T T SPANTKPSAPFKAET TAPLL	300
EchPelL	YVAPNGSS S NNGNSFN S PMSFTAAMAAANPGE-----L I L L K P G T Y T	84
EchPelX	QVASSLS TSDTYPVQARVNYNGTVEVFQNC KSLGK PQRVRAGDDFSLTTRLTQ QK SDFK	360
EchPelL	I P Y T Q G K G N T I T F N K S -----C K E G S-----	105
EchPelX	L V Y I P S E G E D K T A K E T S F S V E K I T L A D A R N L Y V S P E G K A C N D G S K N A P L D I K T A I N A L P G	420
EchPelL	--P I Y V A A A N C G R A V F D F S F P D S Q-----W V Q A S Y C F Y V T G D Y W Y F K G I E V T R A G Y	154
EchPelX	G G T L W L M D G D Y S A T V I P V S A T Q R K G M K T L M P V G K K A V F H C L Q L N A S Y W K V K G I E T E K S F	480
EchPelL	Q G A Y V T G S H N T F E N T A F H H N R N T G L E I N N G-----G S Y N T V I N S D A Y R N Y D P K K N G S	206
EchPelX	R---I E G S H N Q I E R L L A H H C D N T C L Q V S S D N V G R P L W A S H N L I L N S E S H S N Q H P S K K D-	536
EchPelL	M A D G F G P K Q K Q G C N R F G C R A W E N S D D G F D L F D S P Q K V V I E N S W A F R N G I N Y W S D S S F A	266
EchPelX	- A D G F A V K M R V G E G N V I R C A F S H D N V D D G F D L F N-----K I E D--G P N G A V M I E N S I S L N	588
EchPelL	G N G N G F K L G G N Q A V G N H R I T R S V A F G N V S K G F D O N N A G G V T V I N N T S Y K N G-I N Y G F G S	325
EchPelX	N T S N G F K L G G E G Q P V A H Q V K N S I A T G N H M D G F S D N F N P C A L Q V S N N I A L D N V R F N F I F R P	648
EchPelL	N V K S G--Q K H Y F R N N V S L S G S A T V N N A D A K S N S W D T G--P V A S A S D F V S L D T S L A T I S R	380
EchPelX	S P Y Y G Y E K Q G I F K N N V S L R-T Q P G K Y D A V V G R L D A S N Y F I R I I E R S T V R V R K S R R R I T N	707
EchPelL	D N D G T L P E T A L F R L S T N S K L I N-A G T K E S N I S Y S G S A P D L G A F E R N	425
EchPelX	P S R C Q R S S A G M K K A A C N W V I F C R R S N R H K T Q R H R N R Y P S T P A-----	749

**Figura 1.4.4.** Alineamiento de aminoácidos de diferentes pectato liasas pertenecientes a la Familia PL9. El alineamiento fue realizado mediante el programa CLUSTAL W. Los aminoácidos idénticos en las 2 secuencias están sombreados y los conservados están marcados en gris. Las secuencias mostradas son: EchPelL, pectato liasa PelL de *Erwinia chrysanthemi*; y EchPelX, pectato liasa PelX de *Erwinia chrysanthemi*.

### Familia PL10

La familia PL10 de pectato liasas, recientemente definida, contiene entre otros enzimas PelA de *Azospirillum irakense* (Bekri *et al.*, 1999), PelE de *Bacillus alcalophilus* NTT33 (Zhai *et al.*, 2003), PelE de *Bacillus sp.* KSM-P15 (Sawada *et al.*, 2000) y Pel10A de *Cellvibrio japonicus* (Charnock *et al.*, 2002) (Fig. 1.4.5.).

AirPelA	-----MKRIALLIPLFASNLLIPATVASAAVIGMNEASALTPSRVSSLPDQRA	50
BalPelE	-----	1
BspKSM-P15PelE	-----	1
CjaPel10A	MRTLHFLPVSRRFMTSLLAVTAISQVAPAWAACSYKVTNNWGSFGTAEINVTNDTGQAVS	60
AirPelA	AWQEYLARSEAQLS--R-DK--ASLAAELAP-----G--QPLPPPP--AEGKGADT	92
BalPelE	-----	1
BspKSM-P15PelE	-----MK	2
CjaPel10A	NWSVSWQESGATVTNAWNATLSGSNPYTAASLGNWGTLPAGSASFQANGSAGAPGVN	120
AirPelA	MPIDKPAAWYTSKAARHVADVIVSFQTPAGGWGKNQPRDG-----	132
BalPelE	--MSKFAIFGLCAGFFVMLTSTAAEEATVSNETIIKQAN-----	38
BspKSM-P15PelE	RTLRSRYVSAIILAFTVVLSAVGLLLPPVSPVSADGDGTTAS-----	42
CjaPel10A	GTLCGTATSSVSSVSSSTPVSSSSSVSSSSSSSVQSSQALSTLTQLQEVQAGFCRVDGIAN	180
AirPelA	-----ALRLPGOHYTGEN-----	145
BalPelE	-----HLLTWQMDHGG-----	49
BspKSM-P15PelE	-----IEQILRNQRPDGG-----	55
CjaPel10A	ESTNGGFTGTGYANTDNALGAAIVWVAASTSSRYKLTVRFANGGSASRDGSLILINGGSN	240
AirPelA	-----VAKVKSNSNLLDAARD-----	161
BalPelE	-----WS-----KDMPQMYTRDWNGRE-----	66
BspKSM-P15PelE	-----WR-----KDYSVTS-----	64
CjaPel10A	GNYTSLSPATGAWTTWQTVTVVEVDLVQGNLVLQTSRTADGLANIDYLRVEGASTTAGSC	300
AirPelA	-----RDWHY-----	166
BalPelE	-----AK-----SVWTS-----	73
BspKSM-P15PelE	-----GEWAK-----	69
CjaPel10A	SGNTGSSVSSVRSSSSVASSSSSSQATGRMLTLDGNPAANWLNARTKWSASRADVVLSY	360
AirPelA	-----VG--TIDNDATVTEIRFLAQVVSQLAPEEAAPYRDAAL	202
BalPelE	---N-----GQELGTIDNDATVSEIRVVAEAYQLTK---DERFKASVH	110
BspKSM-P15PelE	-----S---TIDNKATYTEIRRLAABEYTKTR---DSRYSDAAV	101
CjaPel10A	QQNNGGWPKNLDYNSVGNNGGGNSESGLTIDNGATITEMVFLAEVYKSGG---NTKYRDAVR	417
AirPelA	KGIEYLLASQFPNGGWPOVWPLEGG-----YHDAITYNDDALVHVABELLSITFAAGRDG	255
BalPelE	NGIDFLYKLOYPSGGFRQVYPQRGSDPSSSVWVSNYVTFNDHAMVNVLRLLLEDARQKKAP	170
BspKSM-P15PelE	RGTHFLNMOYANGGWPOIYQGTG-----YHRHITYNNDNAMINVMMLLDDVANRRGD	153
CjaPel10A	KAAANFLVNSQYSTGALPQFYPLKGG-----YSDHATFENDNGMAYALTVLDFANRRAP	470
AirPelA	FG--FVPPAIRTRALEATNAAIHCIVETQVVQDQKRLGWGOQHDALTLRPTSARNFEPAA	313
BalPelE	FEGLDFNDSQRKQMAASTEGGLDYILQAIIVANGKKTAWGOQHPVTLQPPQGRAYEHPSS	230
BspKSM-P15PelE	FA--FVNTSLADQSRAAVTRGVDCILRTOVVAGGRLTAWGOQHDVSLAPAGARSYEVPSS	211
CjaPel10A	FDTDVFSDSDRTRFKTAVTKGTDYILKQWKQNGVLTVMCAQHGDALDYQPKKARAYELBS	530
AirPelA	LSSTESARTILLFIMEIEAPSDAVKQATRGGVWLNNTSV--IRDRAWKSDQGYQLVTEQG	371
BalPelE	IATDESIVGIVQWLEDCPNQSAAVQEAIAAARAWMDEAR--VADTRYERRVEPHFFYEP--	286
BspKSM-P15PelE	LTASESTGIVRFLKTRP--QTSQIRASTQAAEAWFQTVK--ITGIRVVKTNDDVIVVEDPS	268
CjaPel10A	LSGSESVCVLAFLMTQP--QTAEIERAVRAGVAWFNSPRTYLEGYTYDSSLATNPVPR--	588
AirPelA	-AKPLWSRFYSLDGNKPVFGDRDKTIHDDVMGTSQERRTGAWYTTSPQKALSFTKWEK	430
BalPelE	-GAEIWRFYQIGTNRPIFSGRDGVIHHDIMNVEQERRYGYAWAG-----TWPQKLR-	337
BspKSM-P15PelE	VTTPIWARFYELGTNRPIFVGRDGIIVKYLSETEQERRTGYSWYG-----NWPASLF-	320
CjaPel10A	AGSKMWRFYDLNTRGFFSDRDGSKFYDITQMSLERRTGYSWGGNYGTSIINFQKVGYS	648
AirPelA	RS	432
BalPelE	--	337
BspKSM-P15PelE	--	320
CjaPel10A	L-	649

**Figura 1.4.5.** Alineamiento de aminoácidos de diferentes pectato liasas pertenecientes a la Familia PL10. El alineamiento fue realizado mediante el programa CLUSTAL W. Los aminoácidos idénticos en al menos 3 secuencias están sombreados y los aminoácidos conservados en al menos 3 secuencias están marcados en gris. Las secuencias mostradas son: AirPelA, pectato liasa PelA de *Azospirillum irakense*; BalPelE, pectato liasa PelE de *Bacillus alcalophilus* NTT33; BspKSM-P15PelE, pectato liasa PelE de *Bacillus* sp. KSM-P15; y CjaPel10A, pectato liasa Pel10A de *Cellvibrio japonicus*.

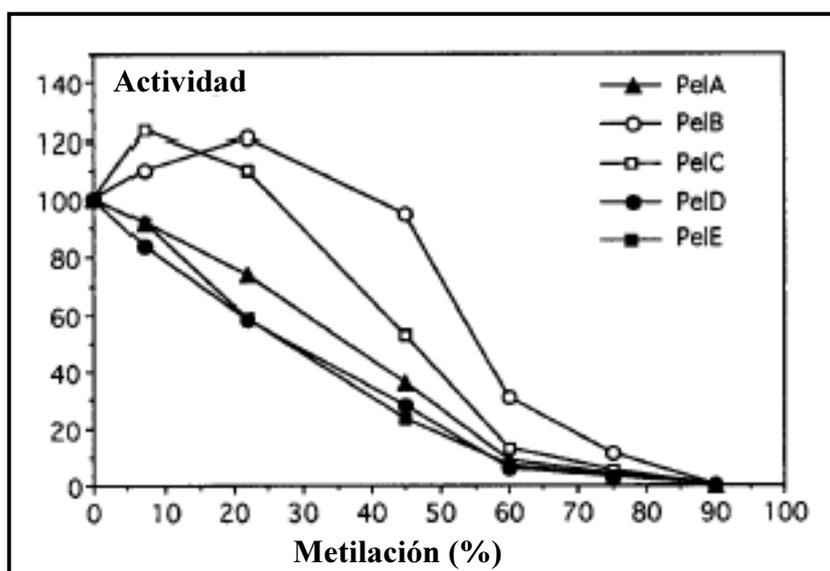
### 1.4.2. Características bioquímicas

Las pectato liasas son los enzimas que degradan el ácido poligalacturónico (poligalacturonato o pectato) por el mecanismo de transeeliminación. Aunque presentan como sustrato típico el ácido poligalacturónico, pueden también degradar pectinas de bajo grado de metilación. La especificidad de sustrato de estos enzimas es: ácido poligalacturónico como sustrato preferido, menor actividad específica sobre pectinas de baja metilación y actividad decreciente sobre pectinas a medida que su grado de metilación aumenta. De esta forma, las pectato liasas típicas no tienen actividad significativa sobre pectinas altamente metiladas. A este modelo de especificidad de sustrato se ajustan, entre otras, las pectato liasas de *Erwinia chrysanthemi* que pertenecen a la subfamilia PeLADE de la familia PL1 (Tardy *et al.*, 1997). Sin embargo, la influencia del grado de metilación del sustrato en la actividad enzimática es diferente en otras pectato liasas. De esta forma, las pectato liasas B y C de *Erwinia chrysanthemi*, pertenecientes a la subfamilia PeIBC de la familia PL1, muestran la máxima actividad específica sobre pectinas del 7 y 22% de metilación, respectivamente (Tardy *et al.*, 1997) (Fig. 1.4.6.).

A medida que se han caracterizado nuevas pectato liasas se han observado patrones de especificidad de sustrato distintos a los descritos. Algunos enzimas de la familia PL3 muestran máxima actividad específica sobre pectinas de elevada metilación. De esta forma, la pectato liasa PeIB de *Erwinia carotovora* muestra máxima actividad sobre pectina del 68% de metilación y no presenta actividad significativa sobre ácido poligalacturónico (Heikinheimo *et al.*, 1995). Similarmente, PeII de *Erwinia chrysanthemi* presenta máxima actividad sobre pectina con grado de metilación entre el 22 y el 45%, mostrando baja actividad sobre ácido poligalacturónico (Shevchik *et al.*, 1997).

La actividad baja sobre ácido poligalacturónico y elevada sobre pectina altamente metilada podría indicar que se trata de pectina liasas. Estas enzimas presentan máxima actividad específica sobre pectinas de elevada metilación y no degradan el ácido poligalacturónico. Sin embargo, una diferencia clara entre los dos tipos de enzimas, pectato liasas y pectina liasas, es el requerimiento de calcio para la actividad enzimática. Las pectato liasas muestran un absoluto requerimiento de calcio, no

presentando actividad enzimática en ausencia de este ión (Sakai *et al.*, 1993). Por el contrario, las pectina liasas no necesitan calcio para degradar sus sustratos (Heikinheimo *et al.*, 1995).



**Figura 1.4.6.** Efecto del grado de metilación de la pectina en la actividad pectato liasa. Actividades de las pectato liasas PelA, PelB, PelC, PelD y PelE de *Erwinia chrysanthemi* (Modificado de Tardy *et al.*, 1997).

Las pectato liasas presentan pH óptimo de actividad en la zona alcalina, en concreto entre pH 8 y 10. En cuanto a la influencia de la temperatura en la actividad, la mayoría de ellas son enzimas mesófilas, sin embargo se han caracterizado varias pectato liasas de bacterias termófilas e hipertermófilas como *Thermoanaerobacter italicus* y *Thermotoga maritima* (Kozianowski *et al.*, 1997; Kluskens *et al.*, 2003). Uno de estos enzimas, PelA de *Thermotoga maritima*, es extremadamente termófilo, presentado como temperatura óptima 90°C y manteniendo más del 50% de la actividad inicial tras 2 horas de incubación a 95°C (Kluskens *et al.*, 2003).

En cuanto al modo de acción enzimática, las pectato liasas pueden presentar actividad tipo endo, degradando enlaces al azar en las cadenas de ácido poligalacturónico, o tipo exo, liberando de forma progresiva azúcares desde los extremos de las cadenas. De esta forma, las endopectato liasas generan como productos de degradación del ácido poligalacturónico una mezcla de oligogalacturonatos

(Shevchik *et al.*, 1997; Tamaru y Doi, 2001), mientras que las exopectato liasas producen ácido digalacturónico insaturado como único producto de degradación (Shevchik *et al.*, 1999a, b). Sin embargo, la pectato liasa A de *Thermotoga maritima*, recientemente caracterizada, muestra un modo de acción exo distinto, al liberar ácido trigalacturónico insaturado como único producto inicial de degradación del ácido poligalacturónico (Kluszens *et al.*, 2003).

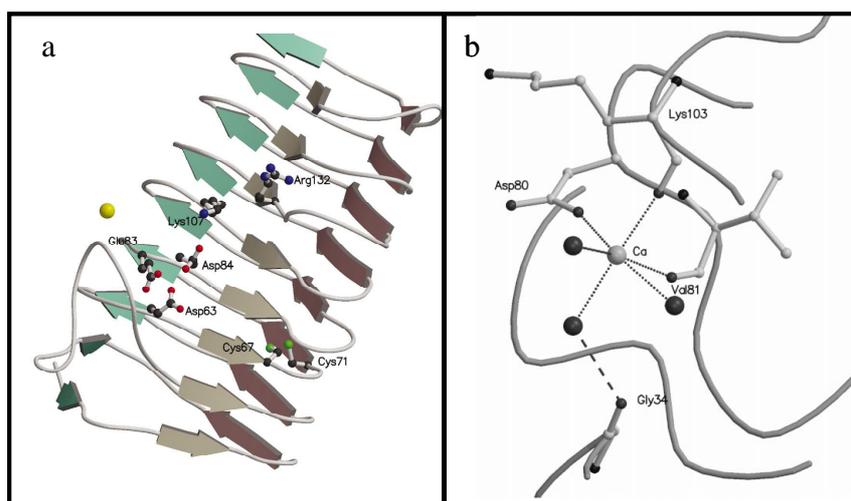
### 1.4.3. Estructura y mecanismo catalítico

La primera pectato liasa en la que se determinó la estructura tridimensional fue PelC de *Erwinia chrysanthemi* (Yoder *et al.*, 1993). El análisis de la estructura del enzima reveló un nuevo tipo de plegamiento proteico que se identificó a partir de la pectato liasa: hélice  $\beta$  paralela hacia la derecha. Este nuevo tipo de plegamiento fue observado posteriormente en otros enzimas de las familias PL1, tal como la pectato liasa de *Bacillus subtilis* (Pickersgill *et al.*, 1994), PL9, como la pectato liasa Pel9A de *Erwinia chrysanthemi* (Jenkins *et al.*, 2004), y también en la pectato liasa Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-P15 (Akita *et al.*, 2001), enzima este último de la familia PL3.

El plegamiento en hélice  $\beta$  paralela hacia la derecha se ha encontrado también en otros enzimas y en proteínas que unen polisacáridos, como la poligalacturonasa de *Erwinia carotovora* (Pickersgill *et al.*, 1998), la endopoligalacturonasa II de *Aspergillus niger* (Van Santen *et al.*, 1999), la ramnogalacturonasa A de *Aspergillus aculeatus* (Petersen *et al.*, 1997) y la condroitinasa B de *Flavobacterium heparinum* (Huang *et al.*, 1999).

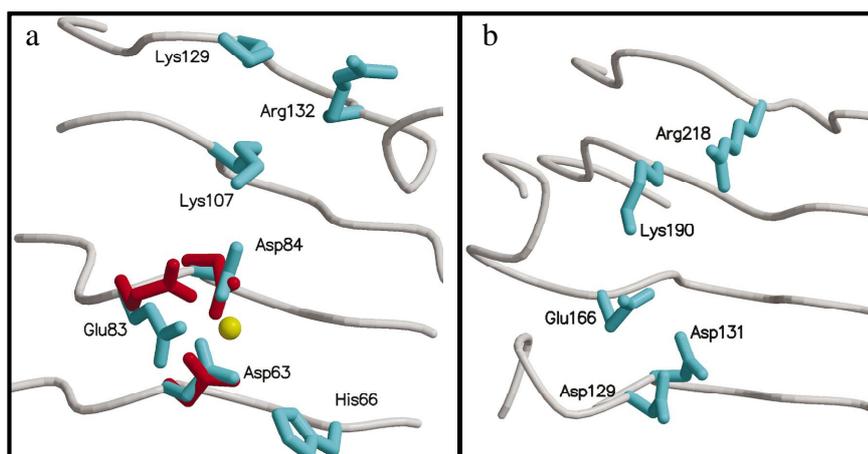
La estructura consiste en 3 láminas  $\beta$  paralelas (PB1, PB2 y PB3) conectadas por regiones de giro (“loops” o lazos T1, T2 y T3) que se pliegan hacia la derecha para formar un cilindro que se denomina hélice  $\beta$  paralela. El cilindro contiene de 7 a 9 vueltas, y cada vuelta contiene un segmento de cada una de las 3 láminas  $\beta$  y de las 3 regiones de giro que las conectan (Hurlbert y Preston, 2002) (Fig. 1.4.7.). En general, las diferencias entre la estructura de la hélice  $\beta$  de distintos enzimas radica en la longitud de las regiones de giro que conectan los tramos de lámina  $\beta$ . En el caso de Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-P15 hay algunas otras diferencias notables con PelC de

*Erwinia chrysanthemi*, como son la ausencia de una hélice  $\alpha$  como extensión amino terminal a la hélice  $\beta$  paralela, la ausencia de la escalera de asparaginas típica de PelC, y la presencia de un enlace disulfuro en el interior de la hélice  $\beta$  entre los residuos Cys<sup>67</sup> y Cys<sup>71</sup> de Pel-15 (Akita *et al.*, 2001).



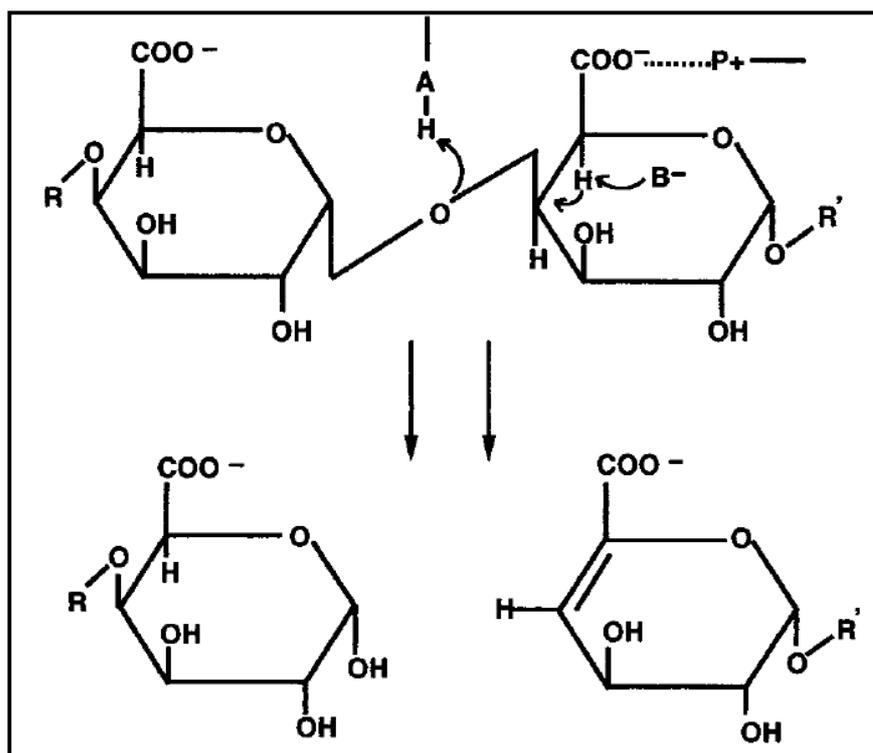
**Figura 1.4.7.** a) Diagrama esquemático de la estructura de Pel-15. Las flechas representan las láminas  $\beta$ . La lámina  $\beta$  1 (PB1) es de color gris, PB2 es de color marrón púrpura y PB3 es de color agua. La esfera amarilla representa el ión calcio de función estructural en Pel-15. b) Sitio de unión a calcio de Pel-15 formado por Asp<sup>80</sup>, Val<sup>81</sup> y Lys<sup>103</sup> y tres moléculas de agua (Extraída de Akita *et al.*, 2001).

El ión calcio es esencial para la actividad catalítica de las pectato liasas (Fig. 1.4.8.). La cristalización de estos enzimas en presencia de calcio a diferentes pH ha permitido identificar los aminoácidos que actúan como ligandos de este ión (Pickersgill *et al.*, 1994). La cristalización de un mutante inactivo de PelC de *Erwinia chrysanthemi* ha permitido localizar hasta cuatro iones  $\text{Ca}^{2+}$  entre enzima y sustrato (Scavetta *et al.*, 1999). La principal función de este ión en las pectato liasas es la neutralización de las cargas del sustrato (ácido poligalacturónico), aunque también desempeña un papel importante en la estabilidad estructural de los enzimas (Akita *et al.*, 2001).



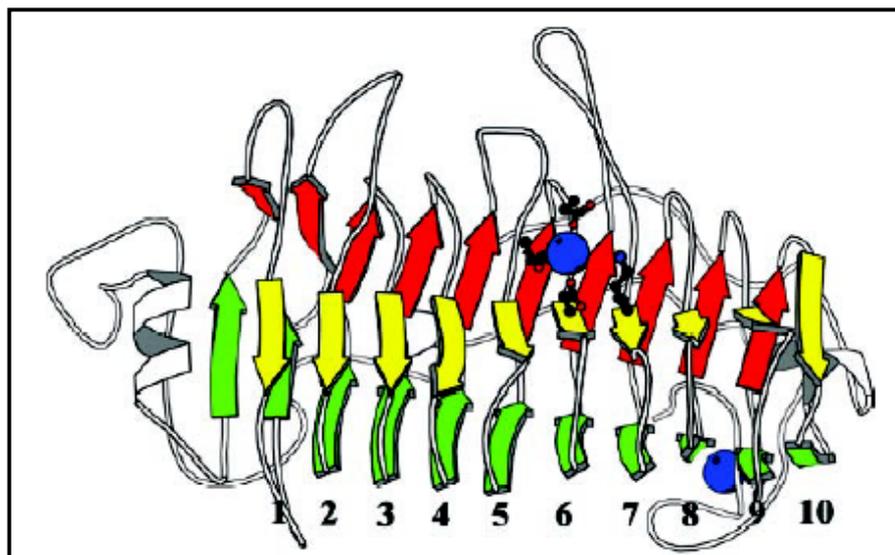
**Figura 1.4.8.** Regiones con el residuo de arginina abstrayente de protones y con el resto de aminoácidos potencialmente involucrados en la catálisis en a) Pel-15 y b) PelC. La esfera amarilla representa el ión calcio de importancia catalítica (Extraída de Akita *et al.*, 2001).

El mecanismo de ruptura de enlaces catalizado por las liasas es la transeeliminación o  $\beta$ -eliminación. Dicho mecanismo supone la ruptura del enlace glucosídico, sin adición de agua, por formación de un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 del extremo no reductor del producto de ruptura generado (Fig. 1.4.9.). Se ha propuesto que en las pectato liasas dicho mecanismo requiere tres grupos: un aminoácido básico, que actuaría como abstrayente de protones del C-5; un segundo aminoácido que actuaría como donador de protones al oxígeno del enlace glucosídico en el C-4; y un tercer grupo (que podría ser un aminoácido con carga positiva o un ión calcio) que neutralizaría la carga negativa del ácido galacturónico adyacente al enlace a romper (Fig. 1.4.9.) (Henrissat *et al.*, 1995; Herron *et al.*, 2000). Estudios cristalográficos y de mutagénesis dirigida han identificado un residuo de arginina, invariable en todas las pectato liasas, como el abstrayente de protones catalítico (Gerlt *et al.*, 1991; Gerlt y Gassman, 1992, 1993; Scavetta *et al.*, 1999). Dicho aminoácido correspondería a R<sup>218</sup> en PelC de *Erwinia chrysanthemi* y a R<sup>132</sup> en Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-P15. Sin embargo, los otros dos grupos implicados en la catálisis no han sido identificados invariablemente en todas las pectato liasas, proponiéndose en algunos casos al solvente acuoso como donador de protones alternativo al segundo aminoácido (Charnock *et al.*, 2002).



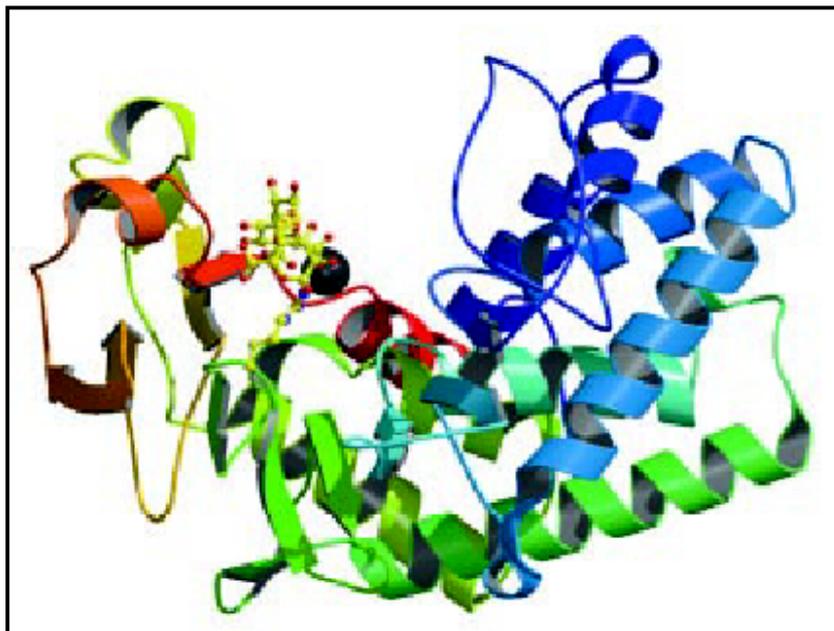
**Figura 1.4.9.** Esquema de la rotura del ácido poligalacturónico mediante el mecanismo de  $\beta$ -eliminación. Las pectato liasas necesitan tres grupos para el mecanismo catalítico:  $P^+$ , neutraliza la carga del grupo carboxílico;  $B^-$ , base que abstrae el protón del C-5; y  $A$ , que está envuelto en la transferencia del protón final al oxígeno glucosídico, dando lugar a un doble enlace entre el C-4 y C-5.

La última pectato liasa cristalizada en la que se ha observado plegamiento en hélice  $\beta$  paralela hacia la derecha ha sido PelL o Pel9A de *Erwinia chrysanthemi* 3937, perteneciente a la familia PL9. La estructura en hélice  $\beta$  de dicho enzima muestra un cilindro formado por 10 vueltas (fig. 1.4.10). Pel9A presenta la geometría del sitio activo y el mecanismo de acción muy parecidos a los de PelC de *Erwinia chrysanthemi*, pero el aminoácido catalítico es una lisina en lugar de arginina (Jenkins *et al.*, 2004).



**Figura 1.4.10.** Estructura tridimensional de PeI9A de *Erwinia chrysanthemi*. Las flechas representan las láminas  $\beta$ . La lámina  $\beta$  1 (PB1) es de color amarillo, PB2 es de color verde y PB3 es de color rojo. La esfera azul representa el ión calcio envuelto por los aminoácidos Asp<sup>209</sup> (vuelta 5), Asp<sup>233</sup> (vuelta 6) y Asp<sup>237</sup> (vuelta 6). También se muestra el posible residuo catalítico Lys<sup>273</sup> (vuelta 7). Una segunda esfera azul representa el ión sodio que estabiliza el C-terminal (Extraída de Jenkins *et al.*, 2004)

Recientemente ha sido obtenida la estructura cristalina de la pectato liasa A de *Cellvibrio japonicus*, enzima perteneciente a la familia PL10 (Charnock *et al.*, 2002). El enzima, de forma diferente a las pectato liasas de las otras familias, no presenta el plegamiento en  $\beta$  hélice paralela y en su lugar muestra una estructura en  $\alpha$  hélice en forma de barril  $(\alpha/\alpha)_3$  (Fig. 1.4.11.). Sin embargo, dicho enzima comparte con el resto de las pectato liasas el mecanismo catalítico común de  $\beta$ -eliminación, seguramente como consecuencia de evolución convergente.



**Figura 1.4.11.** Estructura tridimensional del dominio catalítico de Pe110 de *Cellvibrio japonicus* (Extraída de Charnock *et al.*, 2002).

Los enzimas degradadores de polisacáridos, como celulasas y xilanasas, presentan con frecuencia una estructura modular, compuesta por varios módulos funcionalmente independientes. Adicionalmente al módulo catalítico, estos enzimas contienen módulos no catalíticos, siendo los más comunes de éstos los módulos de unión a carbohidratos (CBM), que median la unión de los enzimas a celulosas u otros sustratos facilitando la acción enzimática. Aunque este tipo de módulos son muy frecuentes en celulasas, xilanasas y otras hidrolasas, sólo recientemente han sido descritos en enzimas degradadores de pectina, en concreto, en dos enzimas, la pectato liasa Pe110A y la ramnogalacturonano liasa Rgl11A de *Pseudomonas cellulosa* (Brown *et al.*, 2001; McKie *et al.*, 2001). La presencia de dominios de unión a celulosa en pectinasas podrían facilitar el acceso de estos enzimas a las paredes celulares vegetales, en las que celulosa, pectina y otros polímeros se encuentran íntimamente relacionados.

## 1.5. APLICACIONES DE LAS PECTINASAS

Las pectinasas figuran entre los enzimas de aplicación industrial más antiguas. La primera aplicación comercial de estos enzimas data de 1930, fecha en que Kertesz y Mehliz (Gerhartz, 1990) observaron que las pectinasas se podían utilizar en la

fabricación de zumos de frutas. Desde entonces su uso ha ido en aumento, siendo una práctica habitual en la actualidad la utilización de pectinasas en la industria alimentaria de zumos (Gerhartz, 1990). Las pectinasas constituyen actualmente un importante sector en el campo de enzimas industriales, donde en 1995 supusieron un volumen de ventas de alrededor de 75 millones de dólares (Kashyap *et al.*, 2001) (Tabla 1.5.1.). Desde el punto de vista de su aplicación, las pectinasas pueden clasificarse principalmente en dos grandes tipos: *pectinasas ácidas* y *pectinasas alcalinas*. Los microorganismos más importantes como productores de pectinasas se presentan en la tabla 1.5.2.

### 1.5.1. Pectinasas ácidas

Son los enzimas pécicos utilizados en la industria de zumos de fruta y en la fabricación de vinos. Son mayoritariamente poligalacturonasas de origen fúngico, especialmente de *Aspergillus niger*.

#### 1.5.1.1. Producción de zumos

La pectina se encuentra como componente estructural de la fruta y de la verdura. En la fruta verde la pectina ayuda a mantener la dureza de la misma ya que en este estado permanece insoluble. Durante el proceso de maduración la pectina es degradada por pectinasas endógenas de la planta haciendo que la fruta se ablande.

En el procesado de frutas para obtener zumos, la adición de pectinasas, así como de mezclas enzimáticas de estas enzimas conjuntamente con hemicelulasas y celulasas, mejora la extracción del zumo, color, aroma y sabor, suplementando la acción de los enzimas endógenos de la fruta. De esta forma se reduce el tiempo necesario para la filtración y la clarificación del zumo, así como se aumenta el rendimiento en la extracción de éste (Cheetham, 1985). Las principales aplicaciones de las pectinasas en el procesado de frutas y verduras son:

**Clarificación de los zumos.** La clarificación consiste en la separación del zumo de los fragmentos vegetales y partículas insolubles de piel y semillas en suspensión. Las pectinasas rompen la pectina contenida en estas partículas, de modo que disminuye la

viscosidad y la floculación de las micelas, mejorando su separación del zumo por sedimentación o filtración. En el caso de zumos espumosos claros (manzana, uva) la aplicación de pectinasas produce una mejora en la clarificación, mientras que en el caso de zumos turbios (cítricos, tomates, néctares) la adición de pectinasas estabiliza la turbidez del zumo (Kashyap *et al.*, 2001).

**Extracción de zumos.** La disminución en la viscosidad de las pulpas por el tratamiento con pectinasas aumenta simultáneamente el rendimiento en la extracción de zumo. Este hecho tiene especial relevancia en algunas frutas tales como bayas y manzanas, cuyas pulpas son con frecuencia viscosas y semisólidas tras el prensado, y de difícil extracción de su parte soluble.

**Producción de concentrados.** Los zumos de fruta concentrados son importantes comercialmente debido a que tienen un período de conservación más largo y a que presentan costes de almacenamiento y transporte disminuidos. La despolimerización de la pectina evita la gelificación de los zumos durante su concentración o almacenaje.

**Productos unicelulares.** Los productos unicelulares son aquellos formados por maceración de sustancias vegetales, es decir, transformación de los tejidos vegetales en suspensiones de células intactas por hidrólisis selectiva de los polisacáridos de la lámina media (Kashyap *et al.*, 2001). Las mezclas enzimáticas de pectinasas, celulasas y hemicelulasas se aplican con dicha finalidad (Kashyap *et al.*, 2001). Se originan productos que se pueden utilizar como base material de zumos de pulpa y néctares, como comidas de bebés, como ingredientes de productos lácteos tales como pudines y yogures, y para preparar protoplastos para aplicaciones biotecnológicas.

#### **1.5.1.2. Producción de vinos**

De modo similar a la aplicación de pectinasas en la producción de zumos, la utilización de estas enzimas reduce los costes y mejora el proceso de vinificación. La adición de pectinasas puede realizarse en la etapa de prensado de las uvas, facilitando dicho proceso y la extracción del mosto, o sobre el vino, para facilitar su clarificación. Este proceso puede realizarse por la adición combinada de pectinasas, hemicelulasas y proteinasas, como alternativa a la clarificación natural, que puede durar varios meses y

requiere dióxido de azufre. Las pectinasas también pueden potenciar la liberación de antocianinas, de importancia en los vinos tintos.

## 1.5.2. Pectinasas alcalinas

Desde hace unos años las pectinasas alcalinas se han introducido en diversos procesos industriales, como el textil, principalmente en el enriado de lino y en el procesado de fibras de plantas. Los enzimas que se utilizan en estos sectores proceden mayoritariamente de bacterias (Hoondal *et al.*, 2002), destacando entre ellos las producidas por *Bacillus* (Kashyap *et al.*, 2001). Con el aumento del conocimiento de los mecanismos de degradación microbiana de la pectina, las pectinasas alcalinas se están abriendo camino en otros procesos biotecnológicos, como la purificación de virus de plantas (Salazar y Jayasinghe, 1999), y la fabricación de papel (Reid y Ricard, 2000, Viikari *et al.*, 2001), aunque en la mayoría de los mismos todavía no han sido comercializadas.

### 1.5.2.1. Textil

**Enriado del lino.** La obtención de fibras de lino para la industria textil requiere el procesamiento de la materia prima, tallos y hojas de lino, denominado enriado. Este proceso consiste en la liberación de las fibras de celulosa a partir de los tejidos vegetales mediante la eliminación de las sustancias cementantes, como pectinas y hemicelulosas. Dicha eliminación se debe a la degradación selectiva de estos compuestos por la microflora autóctona de los campos o estanques en donde se realiza el proceso.

El enriado es uno de los factores limitantes de la obtención de fibras de lino, por lo que está siendo objeto de numerosos estudios para mejorar su eficiencia y rendimiento (Henriksson *et al.*, 1997). El enriado húmedo consiste en sumergir la materia prima vegetal en tanques de agua templada, donde tiene lugar la degradación de la pectina por microflora anaeróbica, mientras que el enriado seco tiene lugar en el suelo, en la superficie de los campos. En estos procesos, sobre todo en el enriado seco, existe el riesgo de dañar las fibras por la actividad celulolítica de la flora microbiana. Una alternativa a estos procesos tradicionales es el enriado con agentes químicos, que

origina unos buenos resultados aunque con elevado consumo de energía e impacto ambiental (Kashyap *et al.*, 2001). El enriado enzimático constituye una de las alternativas más prometedoras al proceso. Los estudios realizados hasta la fecha muestran que unos de los enzimas claves para el enriado enzimático son las pectato liasas con acción endo (Kobayashi *et al.*, 1988; Brühlmann *et al.*, 1994), aunque se desconoce cuales son las características enzimáticas y las condiciones ambientales necesarias para obtener una elevada eficiencia en el proceso. No obstante, existen en el mercado preparaciones de pectinasas comercializadas con este objeto (Flaxzyme, Novo Nordisk). La evaluación de diferentes pectinasas está siendo estudiada actualmente por numerosos grupos de investigación para optimizar el enriado enzimático.

Procesos similares al enriado del lino se realizan con otras fibras textiles como cáñamo y yute. La liberación de las fibras de celulosa mediante la eliminación de gomas y otras sustancias cementantes “degumming” puede ser mejorada con el uso de pectinasas.

**Decrudado del algodón.** Es el proceso consistente en la eliminación de sustancias hidrófobas, ceras entre otras, de la superficie de las fibras para obtener buenas propiedades de humectabilidad que permitan el blanqueado y la tinción posterior de hilos y tejidos. Las pectinasas están siendo estudiadas en este campo para eliminar las pectinas que actúan como pegamento entre las sustancias que recubren las fibras y la celulosa.

#### **1.5.2.2. Otras aplicaciones**

**Tratamiento de aguas residuales pécticas.** Un método alternativo para la depuración de las aguas residuales de la industria de productos cítricos es el uso de pectinasas bacterianas. El pretratamiento de estas aguas con pectinasas alcalinas y microorganismos pectinolíticos alcalófilos facilita la eliminación de las sustancias pécticas y la descomposición del agua residual por tratamiento con fangos activados (Tanabe *et al.*, 1987, 1988; Horikoshi, 1990).

**Producción de papel japonés.** Las pectinasas alcalinas producidas por *Bacillus* sp. y *Erwinia carotovora*, debido a su fuerte actividad de maceración, se utilizan para el

enriado de fibras de Mitsumata en la fabricación de papel japonés (Tanabe *et al.*, 1987; Horikoshi, 1999). Las sábanas de papel preparadas con esta pulpa son muy uniformes y suaves al tacto (Kashyap *et al.*, 2001).

**Fabricación de papel.** Los polisacáridos solubilizados a partir de la materia prima durante el proceso de fabricación del papel pueden interferir en dicho proceso. Entre estos polisacáridos puede estar presente el ácido poligalacturónico, que acompleja los polímeros catiónicos utilizados en las etapas finales de fabricación para retener las partículas de finos. La degradación por pectinasas del ácido poligalacturónico a oligómeros, de menor capacidad de unión a los polímeros catiónicos, disminuye la demanda catiónica del proceso (Reid y Ricard, 2000).

**Extracción de aceite.** Los aceites de semilla de colza (*Canola*), coco, girasol, palma, grano y olivas son tradicionalmente producidos por extracción con disolventes orgánicos. Los enzimas degradadores de la pared celular, incluyendo las pectinasas, pueden ser utilizados en la extracción de aceite vegetal en un proceso acuoso por licuación de los componentes estructurales de la pared celular de las semillas oleaginosas (Kashyap *et al.*, 2001).

**Fermentación del café y del té.** Las pectinasas juegan un papel importante en el procesamiento y producción del café y del té. En la fermentación del café se utilizan microorganismos pectinolíticos, para liberar la cubierta mucilaginosa del grano del café. El tratamiento enzimático también acelera la fermentación del té, aunque la dosis de enzima debe ser ajustada cuidadosamente para evitar daño en la hojas.

**Aditivos de piensos.** A principios de los años 80 comenzó una intensa investigación sobre la utilización de enzimas para aumentar la digestibilidad y el poder nutritivo de piensos ricos en fibras vegetales para la alimentación de cerdos y aves. Los primeros éxitos comerciales se obtuvieron con la adición de  $\beta$ -glucanasas a piensos basados en cebada, aunque las xilanasas fueron los enzimas que mostraron mayor eficiencia. Habitualmente, las preparaciones enzimáticas para el forraje son cócteles multienzimáticos que contienen conjuntamente con glucanasas y xilanasas, pectinasas, proteinasas y amilasas. La adición de enzimas libera nutrientes tanto por hidrólisis de las fibras no degradables como por liberación de nutrientes retenidos por estas fibras,

incrementa su absorción y produce aumento de peso en los animales (Hoondal *et al.*, 2002).

**Purificación de virus de plantas.** En los casos de virus de plantas que están restringidos al floema, ciertos enzimas, como las pectinasas alcalinas y las celulasas pueden ser utilizados para liberar los virus del tejido y proceder a su purificación (Salazar y Jayasinghe, 1999).

**Tabla 1.5.1.** Pectinasas comerciales

Distribuidor	Localización	Nombre
C. H. Boehringer Sohn	Ingelheim, Alemania	Panzym
A. G. Ciba-Geigy	Bazel, Suiza	Ultrazyme
Grinsteelvaeket	Aarhus, Dinamarca	Pectolase
Kikkoman Shoyu, Co.	Tokio, Japón	Sclase
A. G. Schweizerische Ferment	Suiza	Pectinex
Societe Prapidase S.A.	Seclin, Francia	Rapidase, Clarizyme
Wallerstein, Co	Des Plaines, USA	Klerzyme
Novo Nordisk	Dinamarca	Flaxzyme
GmbH. Rohm	Darmstadt, Alemania	Pectinol, Rohament

**Tabla 1.5.2.** Microorganismos productores de pectinasas microbianas.

Productores	Tipo de pectinasa	pH	T <sup>a</sup> (°C)	Referencias
<b>Pectinasas ácidas</b>				
<i>Aspergillus niger</i> CH4	Endo-pectinasa Exo-pectinasas	4,5-6,0 3,5-5,0		Acuna-Arguelles <i>et al.</i> , 1995
<i>Penicillium frequentans</i>	Endo-PG	4,5-4,7	50	Borin <i>et al.</i> , 1996
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Endo-PG	3,5	55	Channe y Shewale, 1995
<i>Rhizoctonia solani</i>	Endo-PG	4,8	50	Marcus <i>et al.</i> , 1986
<i>Mucor pusilus</i>	PG	5,0	40	Al-Obaidi <i>et al.</i> , 1987
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	PG	5,5-7,0	30-40	Rijssel <i>et al.</i> , 1993

<b>Pectinasas alcalinas</b>				
<i>Bacillus</i> sp. NT-33	PG	10,5	75	Cao <i>et al.</i> , 1992
<i>Bacillus polymyxa</i>	PG	8,4-9,4	45	Nagel y Vaughn, 1961
<i>Bacillus pumilus</i>	PATE	8,0-8,5	60	Dave y Vaughn, 1971
<i>Bacillus</i> No P-4-N	PG	10,0-10,5	65	Horikoshi, 1990
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	PATE	9,0	70	Karbassi y Vaughn, 1980
<i>Bacillus</i> sp. DT 7	PNL	8,0	60	Kashyap <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus</i> sp. KSM-P15	PL	10,5	50-55	Kobayashi <i>et al.</i> , 1999b
<i>Bacillus</i> sp. MG-cp-2	PG	10,0	60	Kapoor <i>et al.</i> , 2000, 2001
<i>Bacillus</i> sp. TS 47	PL	8,0	70	Takao <i>et al.</i> , 2000, 2001
<i>Bacillus licheniformis</i>	PL	11,0	69	Singh <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus subtilis</i>	PL	8,5	60-65	Chesson y Codner, 1978
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Glycinea</i>	PL	8,0	30-40	Magro <i>et al.</i> , 1994
<i>Amycolata</i> sp.	PL	10,25	70	Brühlmann <i>et al.</i> , 1994
<i>Penicillium italicum</i> CECT 22941	PNL	8,0	50	Alana <i>et al.</i> , 1990
<i>Xanthomonas compestris</i>	PATE	9,5	25-30	Nasumo y Starr, 1967

PG. Poligalacturonasa; PL. Pectato liasa; PATE. Pectato transesterasa; PNL. Pectina liasa

## 1.6. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS POR *Bacillus*

El género *Bacillus* está constituido por bacilos aeróbicos, esporulados y gram positivos (Claus y Berkeley, 1986). La mayor parte de sus especies son saprofitas del suelo, del agua o de las plantas, y solamente unas pocas tienen importancia en patología infecciosa humana, por lo que la mayoría de sus especies se consideran GRAS (generalmente reconocido como seguro). Es un género relativamente fácil de manipular mediante la tecnología del ADN recombinante y uno de los miembros del género, *Bacillus subtilis*, es tras *Escherichia coli* una de las bacterias genéticamente mejor caracterizada en la actualidad.

El género *Bacillus*, tal como está definido en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Claus y Berkeley, 1986), incluye una diversidad de especies de gran variabilidad fisiológica y divergencia en cuanto a contenido G+C (del 32 al 69%), indicando que se trata de un grupo heterogéneo de microorganismos. El análisis de las secuencias del ARNr 16S ha revelado la existencia de cinco grupos filogenéticamente diferentes dentro del género *Bacillus* (Ash *et al.*, 1991) a los que posteriormente se han añadido grupos adicionales. Este hecho ha propiciado la división del género *Bacillus* en varios nuevos géneros. Para el género correspondiente al grupo 1 de homología ARNr 16S, que contiene a *Bacillus subtilis*, se ha mantenido el término *Bacillus*, mientras que para los otros grupos de homología se han definido los géneros *Paenibacillus* (grupo 3, que incluye a *Paenibacillus polymyxa*), *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Alicyclobacillus*, *Halobacillus*, *Gracilibacillus*, *Salibacillus* y *Virgibacillus* (Stackebrandt y Swiderski, 2002).

Sin embargo, aunque la división taxonómica es un hecho, los miembros del antiguo género *Bacillus* mantienen una serie de características comunes, que permiten que frecuentemente se siga utilizando el término *Bacillus* en sentido amplio para englobar a todos los nuevos grupos taxonómicos. Entre estas características comunes figuran la gran capacidad de secretar proteínas y metabolitos, la sencillez de su cultivo y la facilidad de manipulación genética. Estos hechos convierten a *Bacillus* en uno de los grupos microbianos preferidos para la producción industrial por fermentación. Los productos que actualmente se comercializan incluyen enzimas, antibióticos, insecticidas, nucleótidos, nucleósidos y aminoácidos.

Entre los enzimas que secretan estos microorganismos figura un gran número de proteasas, celulasas, amilasas y otros enzimas hidrolíticos. En general, se pueden obtener niveles de expresión y secreción de productos génicos individuales a niveles muy altos. La producción de enzimas en procesos de fermentación por cepas seleccionadas de *Bacillus* puede llegar a unos 20 gramos por litro de material secretado en relativamente poco tiempo, con un coste en fuentes de carbono y nitrógeno realmente bajo. Esto muestra la capacidad de estas cepas para producir grandes cantidades de enzimas a precios competitivos (Ferrari *et al.*, 1993; Schallmeyer *et al.*, 2004).

Históricamente *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* han sido las especies más utilizadas para la producción por fermentación. El mayor inconveniente que presentan es que son bastante recalcitrantes a la manipulación genética, lo que las hace difíciles de modificar para la producción de proteínas recombinantes, sean éstas de origen heterólogo u homólogo. El mayor conocimiento genético de otros miembros del género, como *Bacillus subtilis*, los conocimientos sobre regulación de la expresión génica en este microorganismo, así como de los mecanismos implicados en la secreción de proteínas y de su fisiología en condiciones de fermentación, hacen que *Bacillus subtilis* sea un candidato ideal para la producción industrial de enzimas (Simonen y Palva, 1993; Bron *et al.*, 1999).

Los estudios de la genética molecular de *Bacillus subtilis* han generado un buen conocimiento de la regulación de la expresión génica, así como de los mecanismos implicados en la secreción proteica. Estos conocimientos permiten el uso de *Bacillus subtilis* para la expresión y secreción de elevados volúmenes de enzimas homólogos modificados y productos génicos heterólogos (Ferrari *et al.*, 1993).

Desde que Ehrlich (1977) descubrió que *Bacillus subtilis* podía ser transformado eficientemente con plásmidos de *Staphylococcus aureus* y que la información genética codificada en ellos podía ser eficientemente expresada en *Bacillus subtilis*, dichos plásmidos se han utilizado como vectores de clonación en este microorganismo huésped (Ehrlich, 1978; Gryczan y Dubnau, 1978). A partir de este hecho, se han construido vectores lanzadera *Escherichia coli* - *Bacillus subtilis*, que facilitan la realización de construcciones genéticas en esta última especie.

Los plásmidos de *Staphylococcus* se han clasificado en varias clases (Tabla 1.6.1.). Los plásmidos de la clase II y III pueden transferirse entre especies de *Staphylococcus* pero no con otros géneros (Gotz *et al.*, 1983). Por el contrario, muchos de los plásmidos de la clase I pueden replicar en una amplia variedad de bacterias gram positivas, incluyendo varias especies de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus*. Los plásmidos de esta clase son de pequeño tamaño (entre 1 y 5 kb), alto número de copia (10-50 copias por célula), y contienen marcadores de resistencia a antibióticos. Entre ellos figuran los plásmidos pC194 y pUB110, que se encuentran entre los más frecuentemente utilizados como vectores de clonación en *Bacillus subtilis*.

Tabla 1.6.1. Plásmidos de *Staphylococcus*.

Familia	Plásmido	Nº de copia	Tamaño (kb)	Fenotipo
<b>Clase I</b>				
pT181	pT181	22	4,4	Tc <sup>r</sup>
	pT127	50	4,4	Tc <sup>r</sup>
	pC221	22	4,6	Cm <sup>r</sup>
	pC223		4,6	Cm <sup>r</sup>
	pUB112		4,1	Cm <sup>r</sup>
	pS194	22	4,4	Sm <sup>r</sup>
	pCW7		4,2	Cm <sup>r</sup>
pC194	pC194	15	2,9	Cm <sup>r</sup>
	pUB110	10	4,5	Km <sup>r</sup> Bl <sup>r</sup>
	pOX6		3,2	Cd <sup>r</sup>
pSN2	pSN2	50	1,3	
	pTCS1		1,3	
	pE12	10	2,2	Em <sup>r</sup>
	pIM13	10	2,1	Em <sup>r</sup>
	pE5		2,1	Em <sup>r</sup>
	pT48		2,1	Em <sup>r</sup>
	pNE131		2,1	Em <sup>r</sup>
pE194	pE194	55	3,7	Em <sup>r</sup>
<b>Clase II y III</b>				
II $\alpha$	pI524	5	31,8	Pc <sup>r</sup> Cd <sup>r</sup> Pb <sup>r</sup> Hg <sup>r</sup> Om <sup>r</sup> Asa <sup>r</sup> Asi <sup>r</sup> Sb <sup>r</sup> Bin <sup>+</sup>
II $\alpha$	pI258	5	28,2	Asa <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> Bin <sup>-</sup>
II $\beta$	pII147	5	32,6	Pc <sup>r</sup> Cd <sup>r</sup> Pb <sup>r</sup> Hg <sup>r</sup> Om <sup>r</sup> Bin <sup>-</sup> Asa <sup>r</sup> Bi <sup>hs</sup>
II $\alpha$	pI9789		19,7	Cd <sup>r</sup> Pb <sup>r</sup> Hg <sup>r</sup> Om <sup>r</sup> Asa <sup>r</sup> Asi <sup>r</sup> Sb <sup>r</sup>
III	pG01		52	Gm <sup>r</sup> Tp <sup>r</sup> Tra <sup>+</sup> Eb <sup>r</sup> Qa <sup>r</sup>

En cuanto a la expresión génica en *Bacillus subtilis*, se han caracterizado un gran número de promotores fuertes de esta especie o de otros microorganismos que originan buenos niveles de expresión de proteínas tanto homólogas como heterólogas. Entre los promotores de *Bacillus subtilis* que se han utilizado con éxito para expresar proteínas heterólogas figuran el de la proteína de pared MWP (Yamagata *et al.*, 1989) y el de la

levansucrasa SacB, este último inducible por sacarosa (Wong, 1989), que ha permitido la secreción de estafiloquinasa con fines clínicos como anticoagulante (Ye *et al.*, 1999). En cuanto a promotores de otras especies que son funcionales en *Bacillus subtilis* merece destacar el promotor de la  $\alpha$  amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (Palva *et al.*, 1981), con el que se han obtenido niveles de producción de amilasa de hasta 3 g/l (Palva *et al.*, 1982), de trehalosa fosforilasa de *Bacillus stearothermophilus* de hasta 2 g/l (250 veces la producción de la cepa original) (Inoue *et al.*, 2002), y se han logrado excelentes resultados de producción de varias proteínas humanas (Van Leen *et al.*, 1991). También merecen destacar el promotor del fago SPO2, que ha permitido la expresión de proteínas vegetales (Overbeeke *et al.*, 1990) y el promotor *HpaII* del plásmido pUB110 (Zyprian y Matzura, 1986) con el que se ha clonado de forma homóloga la propia lipasa A de *Bacillus subtilis*, obteniéndose niveles de secreción 100 veces superiores a los de la cepa original (Dartois *et al.*, 1994).

Uno de los problemas más frecuentes de utilizar *Bacillus subtilis* como huésped para la expresión de enzimas es el elevado nivel de proteasas secretado por este microorganismo. Este hecho hace difícil diferenciar en ocasiones si resultados negativos en cuanto a producción se deben a la proteólisis o a la incompatibilidad de la proteína heteróloga con el sistema de producción y secreción de *Bacillus*. La clonación y caracterización de los genes codificadores de varias proteasas extracelulares ha permitido la construcción de una serie de cepas huéspedes proteasa deficientes en los que se han disruptado hasta 7 genes de proteasas (Kawamura y Doi, 1984; Wu *et al.*, 1991; Wong, 1995). La utilización de estas cepas posibilita la obtención de niveles elevados de expresión de enzimas bacterianos (Lin *et al.*, 1997) y de eucariotas (Wu *et al.*, 1993; McGrath *et al.*, 1997).

El conocimiento detallado del secretoma de *Bacillus subtilis* ha permitido la identificación de los distintos componentes de su maquinaria de secreción y de los posibles factores limitantes de la secreción proteica, tales como peptidasas señal o chaperonas (Tjalsma *et al.*, 2000). Estos conocimientos han dado lugar a estudios que indican que la expresión aumentada de algunos de estos componentes puede determinar incrementos importantes en la secreción proteica (Wu *et al.*, 1998; Vitikainen *et al.*, 2001). Por todo ello, la utilización de *Bacillus subtilis* como microorganismo huésped para la producción y secreción de proteínas heterólogas es un importante objeto actual

de estudio, con amplias perspectivas de evaluación, optimización y mejora de la producción de enzimas.

## 1.7. OBJETIVOS

El grupo de investigación en el que se ha realizado el presente trabajo tiene como objetivo la identificación y caracterización de enzimas microbianos con actividades relacionadas con la degradación de polímeros vegetales. Los trabajos previamente realizados por el grupo han permitido aislar y seleccionar, a partir de muestras naturales, una amplia colección de microorganismos con elevado poder degradador, que producen sistemas enzimáticos complejos para la despolimerización de polisacáridos y lípidos (Blanco y Pastor, 1993; López *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 2002, 2003). Muchos de estos enzimas, xilanasas, celulasas y lipasas, han sido caracterizados genéticamente y bioquímicamente, y también evaluados en procesos industriales, mostrando algunos de ellos potencial aplicación industrial (Blanco *et al.*, 1995; Pastor *et al.*, 2001; García *et al.*, 2002). Varias cepas microbianas de la colección del grupo son potentes degradadoras de pectina, pero a pesar del gran interés de los aspectos moleculares de las pectinasas y de sus importantes aplicaciones biotecnológicas, este tipo de enzimas no ha sido estudiado hasta el momento por el grupo de investigación. El objetivo central del presente trabajo es la identificación y caracterización de pectinasas a partir de las cepas microbianas aisladas por el grupo de investigación. La identificación de nuevas pectinasas posibilitará la realización de estudios posteriores para evaluar la aplicación industrial de las mismas. Los objetivos concretos del trabajo son:

1. Análisis de los sistemas degradadores de pectina de las cepas bacterianas *Paenibacillus* sp. BP-23 y *Bacillus* sp. BP-7.
2. Clonación, purificación y caracterización de pectinasas a partir de las cepas analizadas.
3. Producción y secreción de pectinasas recombinantes en cepas huésped de *Bacillus subtilis*.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Los microorganismos utilizados en el presente trabajo han sido los siguientes:

-*Paenibacillus* sp. BP-23 (Blanco y Pastor, 1993) y *Bacillus* sp. BP-7 (López *et al.*, 1998). Aislados a partir de suelo de arrozal del Delta del Ebro (lugar rico en materia vegetal en descomposición y por tanto adecuado para aislar microorganismos degradadores de carbohidratos) mediante un cultivo de enriquecimiento en paja de arroz. Las dos cepas muestran sistemas complejos de enzimas para la degradación de carbohidratos, algunos de los cuales, han sido clonados y caracterizados (Blanco *et al.*, 1995, 1998, 1999; Pastor *et al.*, 2001; Gallardo *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2003).

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en los experimentos de clonación y expresión de pectinasas se describen a continuación en la tabla 2.1.1.

**Tabla 2.1.1.** Cepas de *Escherichia coli*.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i> 5K	F <sup>-</sup> r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> rpsL thr thi leu lacZ	Godessart <i>et al.</i> , 1988
<i>Escherichia coli</i> HB101	supE44 hsd20 r <sub>b</sub> <sup>-</sup> m <sub>b</sub> <sup>-</sup> recA56 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>Escherichia coli</i> DH5α	supE44 ΔlacU169 (φ80dlacZΔM15) hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	hsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1	Studier y Moffatt, 1986

Las cepas de *Bacillus subtilis* utilizadas como huésped en los experimentos de clonación se describen en la tabla 2.1.2.

**Tabla 2.1.2.** Cepas de *Bacillus subtilis*.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Enzimas degradadores de carbohidratos	CECT 461
<i>Bacillus subtilis</i> MW15	<i>his nprR2 nprE18 ΔaprA3 ΔeglS102 ΔbglT bglSRV ΔxynA Cm<sup>R</sup></i>	Wolf <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus subtilis</i> MB216	<i>Stp leuA8 arg-15 thrA recE4 hsrR hsrM</i>	Lampen <i>et al.</i> , 1986
<i>Bacillus subtilis</i> 497	Enzimas degradadores de carbohidratos	CECT 497

## 2.2. MEDIOS DE CULTIVO, ANTIBIÓTICOS Y OTRAS SUSTANCIAS

### 2.2.1. Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado para la selección, cultivo y mantenimiento de *Paenibacillus* sp. BP-23, *Bacillus* sp. BP-7, *Bacillus subtilis* 168, *Bacillus subtilis* MW15, *Bacillus subtilis* MB216 y *Bacillus subtilis* 497 fue:

**Caldo nutritivo** (Scharlau-Microbiology). La composición del medio por litro es: 1 g de extracto de carne, 2 g de extracto de levadura, 5 g de peptona y 5 g de NaCl. El pH se ajustó a 6,8.

Cuando los experimentos lo requirieron, los medios fueron suplementados con diferentes carbohidratos: ácido poligalacturónico (Sigma), pectina de limón (Sigma), glucosa (Panreac) y paja de arroz. Todos ellos se añadieron a una concentración del 1%.

Para la selección, cultivo y mantenimiento de las cepas de *Escherichia coli* y los clones transformantes de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* se utilizó:

**LB** (Luria Broth, Sambrook *et al.*, 1989). Su composición por litro es: 10 g de bactotripton (Scharlau-Microbiology), 5 g de extracto de levadura (Scharlau-Microbiology) y 10 g de NaCl (Panreac). El pH se ajustó a 7,5.

En ocasiones para la selección y cultivo de los transformantes de *Bacillus* se usaron:

**Penassay Broth 1X** (Contente y Dubnau, 1979). La composición del medio es la siguiente: extracto de levadura al 0,15%, extracto de carne (Merck) al 0,15%, peptona (Scharlau-Microbiology) al 0,5%, dextrosa (Panreac) al 0,1%, NaCl al 0,35%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck) al 0,368% y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck) al 0,132%.

**DM3** (Chang y Cohen, 1979). El medio se compone de las siguientes soluciones estériles: 500 ml de succinato sódico (Fluka) 1 M pH 7,3; 375 ml conteniendo 5 g de extracto de levadura, 3,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g de glucosa y 8 g de agar; 20 ml de MgCl<sub>2</sub> (Merck) 1 M; 100 ml de casaminoácidos (Difco) al 5% esterilizados por filtración; y 5 ml de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma) al 2% esterilizados por filtración. Una vez estériles las soluciones se mezclaron a una temperatura de 55°C aproximadamente. Este medio se utilizó para la regeneración de los protoplastos de *Bacillus subtilis*.

Todos los medios fueron preparados con H<sub>2</sub>O destilada. El pH fue ajustado con NaOH (Panreac) o HCl (Panreac). En ocasiones, estos medios se solidificaron mediante la adición de agar para bacteriología (Scharlau-Microbiology) a una concentración final de 1,5%.

### 2.2.2. Antibióticos

Para la selección y mantenimiento de los transformantes de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, los medios de cultivos fueron suplementados con diferentes antibióticos, para lo cual se prepararon soluciones concentradas de los antibióticos según las indicaciones citadas en la bibliografía (Sambrook *et al.*, 1989):

**-Ampicilina:** Se preparó una solución concentrada de ampicilina (Sigma) 100 mg/ml en H<sub>2</sub>O bidestilada a la que se fue añadiendo NaOH hasta la completa disolución de ésta. Se esterilizó por filtración. La concentración final de uso fue de 50-100 µg/ml.

**-Cloranfenicol:** Se preparó una solución concentrada de cloranfenicol (Sigma) 100 mg/ml en etanol absoluto (Merck). La concentración final de uso fue de 50 µg/ml.

**-Kanamicina:** Se preparó una solución concentrada de monosulfato de kanamicina (Sigma) 25 mg/ml en H<sub>2</sub>O bidestilada. Se esterilizó por filtración. La concentración final de uso fue de 25 µg/ml para los transformantes de *Bacillus subtilis* cultivados en LB, 125 µg/ml para los transformantes de *Bacillus subtilis* cultivados en DM3 y 50 µg/ml para los transformantes de *E. coli* con el vector de expresión pET28a cultivados en LB.

**-Tetraciclina:** Se preparó una solución concentrada de tetraciclina (Sigma) 12,5 mg/ml en etanol al 50%. Se esterilizó por filtración. La concentración final de uso fue de 15 µg/ml.

### 2.2.3. Otras sustancias

Para la selección de cepas de *Escherichia coli* XL1-Blue recombinantes mediante el sistema de  $\alpha$ -complemetación (Sambrook *et al.*, 1989), los medios de cultivo se suplementaron con **X-gal** (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) e **IPTG** (isopropil- $\beta$ -tiogalactopiranosido).

**-X-gal:** Se preparó una solución concentrada de X-gal (Roche) 200 mg/ml en dimetilformamida (Prolabo). La concentración final de uso fue de 40 µg/ml.

**-IPTG:** Se preparó una solución concentrada de IPTG (Roche) 20 mg/ml en H<sub>2</sub>O bidestilada. Se esterilizó por filtración. La concentración final de uso fue de 100 µg/ml. Para la inducción de la expresión de proteínas se utilizó IPTG a concentración de 1 mM.

## **2.3. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**

### **2.3.1. Esterilización**

Los medios de cultivo, las soluciones y el material de vidrio y de plástico utilizados se esterilizaron por calor húmedo y presión en el autoclave a 121°C y 1 atmósfera durante 20 min.

Las soluciones termolábiles se esterilizaron por filtración a través de filtros de celulosa estériles de 0,22 µm de diámetro de poro (MF-Millipore).

### **2.3.2. Mantenimiento de microorganismos**

Las cepas utilizadas se mantuvieron viables mediante resiembras en placa.

Las cepas de *Bacillus* y *Paenibacillus*, así como los clones derivados, se guardaban a 4°C resemebrándolas cada 15 días en placas de agar nutritivo o agar LB (cuando fue necesario suplementados ambos medios con los antibióticos adecuados), que se incubaban a 30°C durante 16-24 h.

Las cepas de *Escherichia coli* y los clones derivados se guardaban a 4°C, resemebrándolas aproximadamente cada mes en placas de agar LB (suplementado con los antibióticos adecuados cuando fue necesario), que se incubaban a 37°C durante 16-24 h.

Las cepas también se guardaron congeladas a -80°C en glicerol (Panreac) al 15%.

### **2.3.3. Cultivo en medio líquido de microorganismos**

La siembra de microorganismos en medio líquido se realizó a partir de inóculos con cultivos líquidos de toda la noche. Estos inóculos se diluyeron en matraces erlenmeyers con medio fresco a diluciones 1:50 o 1:100. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 30°C en el caso de las cepas de *Paenibacillus* y *Bacillus*, a 37°C en

el caso de *Escherichia coli*, y se mantuvieron en agitación a 200 r.p.m. (incubador-agitador Certomat®R, B. Braun) toda la noche.

La estimación del crecimiento se hizo mediante la lectura de la densidad óptica a 600 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV-265FW o Spectrophotometer Du® Beckman Coulter.

## 2.4. MANIPULACIÓN DE ADN

### 2.4.1. Plásmidos utilizados

Los plásmidos vectores utilizados en este trabajo (Tabla 2.4.1.), los vectores lanzadera construidos (Tabla 2.4.2.) y los plásmidos recombinantes con los genes objeto de estudio (Tabla 2.4.3.) se muestran a continuación.

**Tabla 2.4.1.** Vectores de clonación.

Plásmido	Características	Referencia
pBR322	Vector de clonación, Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Bolivar <i>et al.</i> , 1977
pUC19	Vector de clonación, Ap <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> , <i>lacI</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pJF118HE	Vector de clonación	Fürste <i>et al.</i> , 1986
pET28a	Vector de expresión	Studier y Moffatt, 1986
pC194	Vector de clonación, Cm <sup>r</sup>	Horimouchi y Weisblum, 1982
pUB110	Vector de clonación, Kan <sup>r</sup> , neo <sup>r</sup>	McKenzie <i>et al.</i> , 1986
pUB111	Vector de clonación, Kan <sup>r</sup> , neo <sup>r</sup>	Presente trabajo

**Tabla 2.4.2.** Vectores lanzadera.

Plásmido	Características	Referencia
pMS1	pUC19-pUB110-P- <i>spo2</i> , Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Presente trabajo
pMS-R	pUC19-pUB111- <i>rrnB</i> , Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Presente trabajo
pMS-RA	pUC19-pUB111- <i>rrnB</i> -P- <i>amy</i> , Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Presente trabajo
pMS-RS	pUC19-pUB111- <i>rrnB</i> - P- <i>spo2</i> , Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Presente trabajo
pN5	pUC19-pC194, Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	Pastor <i>et al.</i> , 1999

**Tabla 2.4.3.** Plásmidos recombinantes.

Plásmidos	Características	Referencia
pP22	pBR322- <i>pelA</i> , Ap <sup>r</sup>	Presente trabajo
pJYvpA	pJF118HE- <i>yvpA</i> , Ap <sup>r</sup>	Presente trabajo
pET28a-P22	pET28a- <i>pelA</i> , Kan <sup>r</sup>	Presente trabajo
pET28a-YvpA	pET28a- <i>yvpA</i> , Kan <sup>r</sup>	Presente trabajo
pMS1-P22	pMS1- <i>pelA</i> , Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Presente trabajo
pMS-R-P22	pMS-R- <i>pelA</i> , Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Presente trabajo
pMS-RA-P22	pMS-RA- <i>pelA</i> , Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Presente trabajo
pN5-P22	pMS-RA- <i>pelA</i> , Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	Presente trabajo

## 2.4.2. Obtención de ADN plasmídico

La obtención de ADN plasmídico se realizó de diferentes maneras:

### 2.4.2.1. Minipreparación de ADN plasmídico

El siguiente método (Martínez y de la Cruz, 1988) se utilizó para analizar rápidamente gran cantidad de plásmidos recombinantes. Las células cultivadas toda la noche se recogieron por centrifugación a 3.000 ×g durante 10 min a 4°C, se resuspendieron en 200 µl de solución I y se dejaron incubar durante 5 min en hielo. Cuando el ADN plasmídico procedía de transformantes de *Bacillus*, la solución I se suplementó con lisozima (Merck) a una concentración final de 2 mg/ml, incubándose las células en esta solución durante 10 min a 37°C. Transcurrido este tiempo se añadió 400 µl de solución II, se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 5 min a 4°C. A continuación se adicionó 300 µl de solución III, se agitó cuidadosamente por inversión y se dejó a 4°C durante 5 min (Tabla 2.4.4.).

Al sobrenadante obtenido tras centrifugar durante 15 min a 4°C, se le añadió 500 µl de isopropanol y se dejó incubar durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 min y el pellet de ADN, una vez seco, se resuspendió en 200 µl de TE y 200 µl de LiCl 5 M (Merck), y se dejó durante 5 min a -20°C.

A continuación se centrifugó durante 5 min y se recogió el sobrenadante. El ADN se precipitó añadiendo dos volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 de volumen de solución III, y dejándolo durante una hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A continuación el ADN se recogió mediante centrifugación, se lavó con etanol al 70% frío, se secó mediante centrifugación al vacío y se resuspendió en un volumen adecuado en  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Tabla 2.4.4.** Composición de las soluciones utilizadas en la minipreparación.

<b>Solución I</b> (Solución de resuspensión):	-Tris HCl 25 mM pH 8 -Glucosa 50 mM -EDTA 10 mM -Conservar a $4^{\circ}\text{C}$
<b>Solución II</b> (Solución de lisis):	-NaOH 0,2 N -SDS (Merck) al 1%
<b>Solución III:</b>	-Acetato sódico (Merck) 3 M pH 4,8
<b>TE:</b>	-Tris HCl 10 mM pH 8,0 -EDTA 1mM

En algunas ocasiones se utilizó el método modificado descrito por Birnboim (1983).

#### **2.4.2.2. Aislamiento de ADN mediante columnas comerciales**

Con el objetivo de obtener ADN plasmídico en grandes cantidades se siguió el protocolo Qiagen-tip 100 MidiPrep (Qiagen). Dicho protocolo es una modificación del proceso de lisis alcalina, seguida de la unión del plásmido a la resina de intercambio aniónico de Qiagen en condiciones de baja concentración de sal y pH ácido. Para utilizar dicho método se siguieron las especificaciones de la casa comercial.

#### **2.4.3. Obtención de ADN cromosómico**

Con el fin de obtener ADN cromosómico, se utilizó el método descrito por Marmur (1961) con unas pequeñas modificaciones.

A partir de un cultivo de 500 ml, se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 100 ml de NaCl 1 M, dejándolas en agitación durante una hora a 4°C. Seguidamente, se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 100 ml de TES frío (Tabla 2.4.5.). Se volvieron a centrifugar las células, resuspendiéndolas en 50 ml de TE frío al que se le añadió 0,002% de lisozima diluida en TE (Tabla 2.4.4.) y se dejaron lisar las células durante una hora a 37°C. Transcurrido este tiempo se añadió 5 ml de sarcosil (Sigma) al 10% y 0,5 mg/ml de proteinasa K (Merck) y se dejó en agitación en un baño a 65°C durante 10 min. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.

A la solución se le añadió 14 ml de NaClO<sub>4</sub> (Merck) 5 M y 35 ml de cloroformo (Merck):alcohol isoamílico (Prolabo) (24:1) y se mantuvo en agitación durante 30 min. A continuación se centrifugó durante 20 min con el objeto de separar la fase acuosa de la orgánica. Se volvió a repetir la extracción pero esta vez solo con cloroformo.

A esta segunda fase acuosa se le añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, recogiendo el ADN precipitado con una varilla de vidrio. Seguidamente se resuspendió el ADN en 15 ml de SSC 0,1X y se le añadió 0,85 ml SSC 20X para llevarlo a una concentración final de SSC 1X. Una vez resuspendido, se añadió RNAsa A (Tabla 2.4.10.) a una concentración final de 25 µg/ml y se incubó durante 30 min a 37°C. Luego se trató con fenol (Fluka) y se centrifugó para separar la fase acuosa de la orgánica. Este paso se repitió tres veces para eliminar el máximo de proteínas. A continuación, se repitió la extracción con fenol:cloroformo (2:1) y por último, solo con cloroformo.

El ADN se precipitó añadiendo 1/10 de volumen de solución III (Tabla 2.4.4.) y un volumen de isopropanol manteniéndolo durante 2 h a -20°C. A continuación se centrifugó para recoger el ADN, el cual se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en un volumen adecuado de TE.

**Tabla 2.4.5.** Composición de las soluciones.

<b>Tampón TES:</b>	-NaCl 0,15 M -EDTA 0,01 mM -Ajustar a pH 8,0
<b>SSC 20X</b>	-NaCl 3 M -Citrato sódico 0,3 M -Ajustar el pH a 7,0

En algunas ocasiones, con el objeto de obtener ADN cromosómico de una manera más rápida, se usó con unas pequeñas modificaciones el método descrito por Dubnau y Davidoff-Abeson (1971).

#### **2.4.4. Amplificación de ADN por PCR**

Con el objetivo de sintetizar ADN in vitro, se utilizó el método de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Sambrook *et al.*, 1989). Las reacciones de amplificación se realizaron con dos tipos de polimerasas termoestables: *Pfu* (Stratagene), de alta fidelidad que genera extremos romos; o *Taq* (Invitrogen), menos exacta que *Pfu* y que genera extremos protuberantes, siguiendo en ambos casos las recomendaciones de la casa comercial (Tabla 2.4.6.). La reacciones se realizaron en un termociclador GeneAMP PCR System 2400 (Perkin Elmer).

El ADN molde consistía en ADN purificado y disuelto en H<sub>2</sub>O bidestilada, pero en ocasiones la reacción de amplificación se realizaba sobre una suspensión de células en H<sub>2</sub>O bidestilada.

**Tabla 2.4.6.** Mezclas de las reacciones de amplificación.

<b>Mezclas de reacción:</b>	
-1 µl Taq Polimerasa	-1 µl Pfu Polimerasa
-5 µl Tampón de amplificación 10X	-5 µl Tampón de amplificación 10X
-2,5 µl MgCl <sub>2</sub> 50 mM	-4 µl dNTPs (2,5 mM cada uno)
-4 µl dNTPs (2,5 mM cada uno)	-X µl de ADN molde
-X µl de ADN molde	-12 pmoles de cebador
-12 pmoles de cebador (GIBCO BRL Custom Primers)	-H <sub>2</sub> O bidestilada hasta 50 µl
-H <sub>2</sub> O bidestilada hasta 50 µl	

El programa de amplificación habitualmente utilizado fue el que se muestra en la Tabla 2.4.7. La temperatura óptima se escogió en función de la temperatura de hibridación de los dos cebadores.

**Tabla 2.4.7.** Reacción de amplificación.

<b>Reacción de amplificación</b>	
x 1 ciclo:	94°C durante 5 min Temperatura de hibridación (°C) durante 40 s 72°C durante 4 min
x 30 ciclos:	94°C durante 30 s Temperatura de hibridación (°C) durante 40 s 72°C durante 4 min
x 1 hold:	72°C durante 4 min 4°C ∞

## 2.4.5. Electroforesis en geles de agarosa

### 2.4.5.1. Desarrollo de la electroforesis

Las preparaciones de ADN plasmídico y cromosómico se analizaron en geles de agarosa (Low EEO, Roche) en tampón TBE 1X a una concentración de agarosa entre 0,8% y 2% según el tamaño de los fragmentos que se querían analizar. A las muestras

se les añadió tampón de carga 6X (Sambroock *et al.*, 1989). Después se llevó a cabo la electroforesis en una cubeta horizontal Bio-Rad Mini-Sub<sup>®</sup>Cell GT aplicando un voltaje de 100 voltios con una fuente de alimentación de Bio-Rad, PAC300 (Tabla 2.4.8.).

**Tabla 2.4.8.** Soluciones utilizadas en el análisis electroforético.

<b>Tampón de carga 6X:</b>	-Azul de bromofenol al 0,3% (Bio-Rad) -Xilencianol al 0,3% (Bio-Rad) -Glicerol al 72%
<b>Tampón TBE 10X:</b>	-Tris 0,9 M -Ácido bórico 0,9 M (Sigma) -EDTA 0,02 M -pH 8,3

#### 2.4.5.2. Tinción de ADN

Para visualizar los fragmentos de ADN en los geles de agarosa se utilizó una solución de bromuro de etidio (Sigma) 0,75 µg/ml en H<sub>2</sub>O destilada durante 15 min, observándose posteriormente mediante iluminación con luz ultravioleta.

#### 2.4.5.3. Marcadores de peso molecular

Como marcador de tamaño molecular se utilizó la mezcla de fragmentos resultantes de la digestión del ADN del bacteriófago lambda con *Hind*III (Promega), que cubre un rango entre 23 y 0,5 kb. Cuando los fragmentos de ADN a valorar fueron más pequeños se utilizó como marcador la mezcla de fragmentos procedentes de la digestión de ADN del fago φX174 con *Hae*III (Promega), que cubre un rango entre 1,35 y 0,072 kb, o la mezcla de fragmentos procedentes de la digestión de pMLX con *Eco*147I y *Pvu*I (Biotools), que cubre un rango entre 1,0 y 0,08 kb.

El tamaño de los fragmentos de ADN de las muestras se dedujo mediante comparación de su movilidad con la de los marcadores mediante el programa SEQAID.

## 2.4.6. Aislamiento de fragmentos de ADN

### 2.4.6.1. Electroelución

La purificación de fragmentos de ADN para su clonación o uso como sonda se realizó mediante electroelución (Sambrook *et al.*, 1989). Los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa en tampón TAE 1X (Tabla 2.4.9.). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y las bandas de interés se localizaron mediante una lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda larga (Lámpara Black-Ray,  $\lambda$ : 366 nm) o en ImageMaster® (Pharmacia Biotech). Con un bisturí se cortó la porción de agarosa que contenía el fragmento de ADN que se quería purificar, se introdujo en una bolsa de diálisis (Sigma) que contenía 2 ml de TAE 1X y se sumergió en una cubeta de electroforesis con el mismo tampón. Se sometió a electroforesis durante una hora a 100 voltios y a continuación se realizaron dos pulsos de 30 s cada uno, invirtiendo la polaridad. Se recogió el tampón conteniendo el ADN del interior de la bolsa, se fenolizó, se precipitó y recogió el ADN tal como se explica en el apartado 2.4.2.1.

**Tabla 2.4.9.** Composición de la solución empleada en la electroelución.

<b>Tampón TAE 1X:</b>	-Tris acetato 0,04 M
	-EDTA 0,001 M
	-pH 8,0

### 2.4.6.2. Purificación rápida de fragmentos de ADN

En ocasiones se utilizaron los Kits comerciales Qiaex II (Qiagen) y Wizard® PCR Preps (Promega) para purificar fragmentos de ADN.

El Kit Qiaex II se utilizó como método rápido, alternativo a la electroelución, para separar fragmentos de ADN separados en geles de agarosa. Consiste en la unión del ADN a las partículas de silicagel en presencia de una elevada concentración de sales y una posterior elución mediante disminución de la fuerza iónica.

El Kit Wizard® PCR Preps se usó para purificar productos de amplificación por PCR. En este kit el ADN es retenido específicamente por una resina de intercambio iónico y eluido posteriormente al disminuir la fuerza iónica.

Los kits se utilizaron siguiendo las especificaciones de las casas comerciales correspondientes.

## **2.4.7. Tratamientos enzimáticos**

### **2.4.7.1. Digestión con enzimas de restricción**

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron siguiendo las instrucciones del suministrador (Roche y Promega). Los tampones utilizados fueron los suministrados con los enzimas.

Cuando se realizaron digestiones con dos enzimas de restricción se intentó escoger el tampón más adecuado para ambos, o bien se llevaron a cabo las dos digestiones de manera secuencial, con un paso intermedio de precipitación del ADN con el fin de cambiar las condiciones de la digestión.

### **2.4.7.2. Tratamiento con RNAsa**

La eliminación de ARN presente en las preparaciones de ADN cromosómico se realizó mediante un tratamiento con RNAsa A (Roche) a una concentración final de 50 µl/ml durante 30 min a 37°C (Tabla 2.4.10.).

Con el fin de facilitar la visualización de fragmentos de ADN en geles de agarosa, en ocasiones se trató con RNAsa antes de cargar las muestras en los geles.

**Tabla 2.4.10.** Tratamiento de la RNAsa.

<b>RNAsa:</b>	-RNAsa A bovina 0,001%
	-Tris HCl 0,01 M pH 7,5
	-NaCl 0,015 M
	-Se trata durante 15 min a 100°C

### 2.4.7.3. Tratamiento con fosfatasa alcalina

Con el objeto de evitar la religación de los plásmidos linearizados con enzimas de restricción, se realizaron tratamientos de desfosforilación de los extremos 5' de las cadenas de ADN.

El ADN plasmídico digerido y purificado se incubó durante una hora a 37°C con fosfatasa alcalina (Roche), según las instrucciones de la casa comercial. La reacción se paró mediante una incubación a 65°C durante 10 min. A continuación, el ADN se fenolizó, precipitó y resuspendió en un volumen adecuado de H<sub>2</sub>O bidestilada.

## 2.4.8. Hibridación Southern

### 2.4.8.1. Marcaje de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN que se utilizaron como sonda se marcaron mediante primado al azar "random primer". El ADN a marcar se desnaturalizó calentando durante 10 min a 100°C y, seguidamente, se enfrió bruscamente en hielo seco con etanol, para evitar su renaturalización.

Al ADN se le añadió 2 µl de una mezcla de cebadores hexanucleótidos, 2 µl de una mezcla de mononucleótidos (0,1 mM de cada nucleótido y 0,035 mM de digoxigenina-dUTP), 1 µl (2 unidades) de fragmento Klenow de ADN polimerasa I (Roche) y H<sub>2</sub>O bidestilada estéril hasta llegar a un volumen final de 20 µl. La reacción de marcaje se incubó durante toda la noche a 37°C y se paró añadiendo EDTA a una concentración final de 0,02 M, pH 8,0.

El ADN se precipitó con 1/10 de volumen de solución de LiCl 4 M y 3 volúmenes de etanol absoluto frío, manteniéndolo a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante una hora. Posteriormente se recogió por centrifugación durante 15 min y se lavó con etanol al 70%. Se secó mediante centrifugación al vacío y se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de tampón TE.

#### **2.4.8.2. Transferencia e hibridación de ADN**

El ADN digerido se separó en geles de agarosa que a continuación fueron teñidos con bromuro de etidio, fotografiados y sumergidos en una solución de NaOH 250 mM durante 15 min. Después, se equilibraron los geles, las membranas de nylon (Roche), los papeles de filtro y las esponjas en tampón de transferencia (Tabla 2.4.11.). Las transferencias a las membranas de nylon se realizaron en un equipo de Mini-Protean II (Bio-Rad), aplicándose un voltaje de 60 voltios durante una hora. A continuación, las membranas se secaron durante 30 min a temperatura ambiente y el ADN se fijó a las mismas mediante la aplicación de luz ultravioleta durante 1,5 min por cada cara.

Las membranas se prehibridaron en solución de hibridación (Tabla 2.4.11.) a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 3 h para bloquearlas. Después se eliminó dicha solución y se añadió solución de hibridación fresca atemperada a  $60^{\circ}\text{C}$  con la sonda marcada, desnaturalizada previamente por tratamiento a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 min y enfriamiento rápido en hielo seco con etanol, y se incubó la hibridación toda la noche a  $60^{\circ}\text{C}$ .

Una vez realizada la incubación se realizaron una serie de lavados para eliminar el exceso de sonda. Se hicieron dos lavados de 5 min a temperatura ambiente con una solución de SSC 2X (Tabla 2.4.5.) conteniendo SDS al 0,1% y dos lavados de 15 min a la temperatura de hibridación con una solución de SSC 0,1X, SDS al 0,1% atemperados a  $60^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 2.4.11.** Soluciones utilizadas en la transferencia e hibridación.

<b>Tampón de transferencia:</b>	-Tris 40 mM pH 8,3 -Ácido bórico 40 mM -EDTA 1 mM
<b>Solución de hibridación:</b>	-SSC 5X (Tabla 2.4.5.) -Agente bloqueante al 5% (Roche) -Laurilsarcosinato sódico al 0,1% (Sigma) -SDS al 0,02%

### 2.4.8.3. Detección de ADN marcado

Para detectar el ADN marcado se realizó detección inmunológica con digoxigenina mediante el Kit comercial de Roche. Las membranas de hibridación se lavaron durante un minuto con tampón 1. Seguidamente se incubaron durante 30 min en tampón 2 y se volvieron a lavar en tampón 1 durante un minuto. A continuación, se incubaron con una solución de anti-digoxigenina (1/5.000 en tampón 1) durante 30 min, se realizaron dos lavados con tampón 1 durante 15 min con el fin de eliminar el exceso de anticuerpos, y se equilibraron con tampón 3. El revelado se realizó con solución cromática hasta la aparición de las bandas, momento en el que se paró la reacción con tampón 4. Se eliminó el exceso de tampón y se dejó secar (Tabla 2.4.12.).

**Tabla 2.4.12.** Composición de la soluciones de revelado de la hibridación.

<b>Tampón 1:</b>	-Tris HCl 100 mM pH 7,5 -NaCl 150 mM
<b>Tampón 2:</b>	-Agente de bloqueo al 0,5% en tampón 1
<b>Tampón 3:</b>	-Tris HCl 100 mM pH 9,5 -NaCl 150 mM -MgCl <sub>2</sub> 50 mM
<b>Tampón 4:</b>	-Tris HCl 10 mM pH 8,0 -EDTA 1 mM
<b>Solución cromática:</b>	-45 µl de NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche) 75 mg/ml en dimetilformamida al 70% -35 µl de BCIP (5-bromo-3-cloro-4-indolil fosfato, Roche) 50 mg/ml en dimetilformamida -10 ml de tampón 3

### 2.4.9. Ligación de moléculas de ADN

Para la ligación de moléculas de ADN se utilizó la ligasa del bacteriófago T4 (Biolabs), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Las proporciones entre el ADN vector y el ADN inserto fueron 1:3 si las ligaciones eran entre extremos cohesivos, o 1:6 si la ligaciones eran entre extremos romos. Las ligaciones entre extremos cohesivos se incubaron a 15°C durante 16 h, mientras que las ligaciones entre extremos romos se realizaron a 4°C. Las reacciones de ligación se pararon mediante incubación a 65°C durante 10 min.

### 2.4.10. Secuenciación de ADN

Con el fin de obtener la secuencia de los genes y fragmentos de ADN a estudiar se utilizó el método de Sanger *et al.* (1977) basado en la síntesis y terminación con dideoxinucleótidos. En todos los casos se secuenciaron las dos cadenas complementarias del ADN analizado.

Se utilizó el kit de fluorescencia de secuenciación automática "ABI PRISM dye-terminator-cycle sequencing ready reaction mix" versión 2.0 (Amersham Biosciences) en un secuenciador de ADN Perkin Elmer 377. El kit contiene la polimerasa termoestable, los dideoxinucleótidos marcados con rodamina y el tampón adecuado. La composición de la mezcla de reacción esta descrita en la tabla 2.4.13.

**Tabla 2.4.13.** Mezcla de la reacción de secuenciación.

<b>Mezcla de la reacción de secuenciación:</b>
-4 $\mu$ l de mezcla de reactivos de secuenciación
-0,2 $\mu$ g/ $\mu$ l de ADN
-3,2 pmoles de cebador "forward o backward"
-H <sub>2</sub> O hasta enrasar a un volumen final de 10 $\mu$ l

**Tabla 2.4.14.** Reacción de secuenciación

<b>Reacción de secuenciación</b>	
x 1 ciclo:	94°C durante 1 min
x 25 ciclos:	96°C durante 30 s
	Temperatura de hibridación (°C) durante 15 s
	60°C durante 4 min
x 1 hold:	4°C durante $\infty$

Acabada la reacción de secuenciación (tabla 2.4.14.) se hizo un pulso en la centrífuga y se precipitó el ADN añadiendo 64  $\mu$ l de etanol al 95% y llevando la mezcla a un volumen final de 100  $\mu$ l. Se mezcló y se dejó precipitando durante 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 20 min, el pellet obtenido se lavó dos veces con etanol al 70% y se secó en una centrífuga de vacío. La secuencia del ADN fue determinada en el servicio de secuenciación de los Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona.

### 2.4.11. Análisis informático de secuencias

La identificación de las pautas abiertas de lectura de los fragmentos de ADN secuenciados se realizó con el servidor Expasy (<http://www.expasy.org>).

Con el fin de realizar el análisis de homología de las secuencias de nucleótidos obtenidos y de las secuencias de aminoácidos de las proteínas deducidas, se utilizaron los siguientes programas:

-Blast: <http://www.expasy.org/cgi-bin/BLAST.pl?VIRT13433> (Altschul *et al.*, 1997)

-Fasta3: <http://www.ebi.ac.uk/fasta33> (Pearson, 1990).

Para la realización de alineamientos múltiples de secuencias se usó el programa ClustalW Multalign (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>) (Higgins *et al.*, 1994).

Para la determinación de regiones consenso se utilizó la base de datos PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite>). Los dominios estructurales de proteínas se analizaron con Prodom (<http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom/current/html/home.php>) (Servant *et al.*, 2002) o Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.html>) (Bateman *et al.*, 2004).

Los parámetros físico químicos de las secuencias de aminoácidos deducidas se analizaron mediante ProtParam tool (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) (Kyte y Doolittle, 1982) y la confirmación de las posibles secuencias señal en las proteínas clonadas se realizó mediante el programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (Nielsen *et al.*, 1997).

El modelo tridimensional de las proteínas clonadas se obtuvo a través de la aplicación SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>) (Schwede *et al.*, 2003).

## 2.5. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

### 2.5.1. Transformación de *Escherichia coli*

Con el objetivo de transformar de forma rutinaria *Escherichia coli* se utilizó el método descrito por Cohen *et al.* (1972). Para ello se sembró un cultivo de LB fresco, suplementado con los antibióticos necesarios, con un inóculo 1/100 de un cultivo de 16 h de la cepa de *Escherichia coli* a transformar. El cultivo se incubó a 37°C en agitación hasta que llegó a la fase exponencial temprana de crecimiento ( $A_{600}$  de aproximadamente 0,3). Se recogió a continuación 10 ml del cultivo y se mantuvo a 0°C durante 10 min. Se recogieron las células por centrifugación durante 5 min a 4°C, se resuspendieron en la mitad del volumen inicial de una solución de  $\text{CaCl}_2$  50 mM previamente enfriado en hielo y se mantuvieron a 0°C durante 20 min. Transcurrido este tiempo, las células se volvieron a recoger por centrifugación durante 3 min a 0°C y se resuspendieron en 1/15 del volumen inicial de una solución de  $\text{CaCl}_2$  50 mM previamente enfriado en hielo, manteniéndolas a 0°C en un periodo de tiempo que osciló entre 1 y 24 h.

Una vez obtenidas las células competentes, se procedió a transformarlas con ADN. Se mezcló 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de células competentes con el ADN a transformar (5 ng/ $\mu\text{l}$ ) y se mantuvo en hielo durante una hora. A continuación, las células fueron sometidas a un choque térmico a 42°C durante 10 min, tras el cual se pusieron en hielo. A continuación se añadió 1 ml de LB (apartado 2.2.1.) y se incubó a 37°C en agitación durante una hora, con el fin de permitir la expresión de los marcadores de resistencia a antibióticos de los vectores utilizados. Las células transformadas se sembraron en placas de agar LB suplementadas con los antibióticos adecuados para la selección de los transformantes y se incubaron a 37°C toda la noche.

### 2.5.2. Transformación de *Bacillus subtilis*

En la mayoría de las ocasiones el método utilizado para transformar *Bacillus subtilis* fue el de transformación de protoplastos, descrito por Chang y Cohen (1979).

Se inoculó un cultivo de Penassay Broth (apartado 2.2.1.), suplementado con los antibióticos necesarios, con un inóculo 1/50 de un cultivo nocturno de la cepa de *Bacillus subtilis* a transformar. El cultivo se incubó a 37°C en agitación hasta que alcanzó la fase exponencial temprana de crecimiento ( $A_{600}$  de aproximadamente 0,5). Una vez alcanzada dicha fase, se recogieron por centrifugación las células de 50 ml del cultivo y se resuspendieron en 1/10 del volumen inicial de SMMP adicionado con lisozima 2 mg/ml (Tabla 2.5.1.). La suspensión se incubó a 37°C en agitación vertical (agitador orbital de tubos AN-2, SBS) muy suave durante un tiempo comprendido entre 3 y 4 h, transcurrido el cual se pudo observar la formación de protoplastos en el microscopio. A continuación, los protoplastos se centrifugaron durante 15 min a  $2.600 \times g$  y se resuspendieron suavemente en 5 ml de SMMP. Se volvió a lavar en dicho tampón y los protoplastos se resuspendieron en 1/10 del volumen original de SMMP.

Se mezcló 0,5 ml de protoplastos con 1,5 ml de Polietilenglicol 6.000 (Merck) al 40% en SMM2X, 50  $\mu$ l de TE, 50  $\mu$ l de SMM 2X y el ADN a transformar (entre 1 pg y 5  $\mu$ g de ADN plamídico en 50  $\mu$ l de TE). Después de mantener 5 min a temperatura ambiente, se añadió 5 ml de SMMP a la mezcla para diluir el PEG, y los protoplastos fueron recogidos por centrifugación durante 10 min a  $2.600 \times g$  a 4°C. Los protoplastos se resuspendieron en 1 ml de SMMP y se incubaron durante 1,5 h a 30°C en agitación suave para permitir la expresión fenotípica de los marcadores de resistencia.

A continuación, los protoplastos transformados se plaquearon en placas de agar DM3 (apartado 2.2.1.) suplementadas con los antibióticos adecuados para la selección de los transformantes y se incubaron a 30°C durante 2 o 3 días para que regeneraran la pared y crecieran los clones transformantes.

**Tabla 2.5.1.** Composición de las soluciones para la transformación de *Bacillus*.

<b>Tampón SSM 2X:</b>	-Sacarosa (AnalaR®, BDH) 1 M -Ácido maléico (Panreac) 0,04 M -MgCl <sub>2</sub> 0,04 M -Ajustar a pH 6,5
<b>SMMP:</b>	Mezcla de volúmenes iguales de Pennasay Broth 4X y SMM 2X
<b>Solución PEG:</b>	-PEG 6.000 (Polietilenglicol 6.000, Merck) 40 g -SMM 2X 50 ml -Enrasar a 100 ml con H <sub>2</sub> O bidestilada

En otras ocasiones para transformar *Bacillus subtilis* se utilizó el método modificado descrito por Anagnostopoulos y Spizizen (Hoch *et al.*, 1991) por presentar mayor rapidez aunque menor rendimiento. Se basa en que el estado crítico para que las células sean transformables es el principio de la fase estacionaria y está asociado con la esporulación.

## 2.6. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

### 2.6.1. Clonación en vectores de expresión

Con el fin de sobreexpresar las proteínas de interés para su posterior purificación, éstas se clonaron en el vector de expresión pET28a (Novagen) (Studier y Moffatt, 1986). Dicho vector, derivado del plásmido pBR322, contiene el promotor del bacteriófago T7, que proporciona un alto nivel de transcripción. Para la expresión de los genes clonados en pET28a se requieren huéspedes, tales como *Escherichia coli* BL21(D3), que contienen el gen de la ARN polimerasa específica del promotor T7. La expresión de la polimerasa específica está controlada por el sistema de inducción-represión del promotor *lac*, por lo que la expresión de los genes clonados tiene lugar únicamente tras inducir con IPTG, evitando problemas de toxicidad a las células huésped. Simultáneamente, el vector pET28a permite la clonación de los genes de interés como proteínas de fusión con colas de histidinas, hecho que facilita la posterior purificación de las proteínas mediante cromatografía de adsorción a columnas de níquel.

Las cepas de *Escherichia coli* BL21(D3) transformantes con los genes de interés se cultivaron en 1 litro de medio LB a 37°C en agitación hasta alcanzar una  $A_{600}$  entre 0,5 y 0,6. Se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó durante 2,5 h. A continuación las células se recogieron por centrifugación a 11.000  $\times g$  durante 10 min a 4°C, se resuspendieron en 20 ml de tampón de lisis (apartado 2.6.2.) y se rompieron mediante French Press, tal y como se describe en el apartado 2.7. El extracto celular se volvió a centrifugar a 16.000  $\times g$  durante 30 min a 4°C para eliminar los restos de membranas y las células enteras, recogiendo el sobrenadante.

### **2.6.2. Purificación por cromatografía de afinidad**

Con el objetivo de purificar las proteínas con cola de histidina, se utilizó la cromatografía de afinidad a NTA-Ni (Ácido nitrilotriacético-níquel, Qiagen), que se basa en la selectividad y afinidad de matrices cromatográficas que contienen níquel por biomoléculas que presentan 6 residuos de histidina consecutivos.

Al trabajar con proteínas solubles, la purificación se realizó bajo condiciones nativas. Estas condiciones permiten una alta unión inespecífica con la resina NTA-Ni. Para reducirla se añadió una baja concentración de imidazol (10-20 mM) en el tampón de lisis y de lavado.

A 5 ml de extracto celular en tampón de lisis se añadió 250  $\mu l$  de resina agarosa níquel y se dejó 2 h en agitación vertical a 4°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó la mezcla durante 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante (L0). La resina, con la proteína adsorbida, se lavó con tampón de lisis, centrifugando durante 1 min a 4°C. A continuación se realizaron 9 lavados adicionales con tampón de lavado conteniendo 20 mM de imidazol. Finalizada esta serie de lavados, se hicieron dos lavados más, uno con tampón de lavado 50 mM de imidazol y el otro con tampón de lavado 200 mM de imidazol. Para eluir la proteína se lavó con tampón de elución 250 mM de imidazol. La elución se repitió 3 veces. Por último, las eluciones se congelaron hasta que se utilizaron.

**Tabla 2.6.1.** Composición de las soluciones de purificación.

<b>Tampón de lisis:</b>	-NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM -NaCl 300 mM -Imidazol (Merck) 10 mM -Ajustar el pH a 8,0
<b>Tampón de lavado:</b>	-NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM -NaCl 300 mM -Imidazol 20 mM, 50 mM o 200 mM -Ajustar el pH a 8,0
<b>Tampón de elución:</b>	-NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM -NaCl 300 mM -Imidazol 250 mM -Ajustar el pH a 8,0

### 2.6.3. Eliminación de colas de histidina

Para la eliminación de la cola de histidina se utilizó el kit de corte de trombina “Thrombin Cleavage Capture Kit” de Novagen, basado en la utilización de trombina, endoproteasa que actúa como factor de coagulación de la sangre convirtiendo el fibrinógeno en fibrina. La trombina humana es una de las proteasas más activas y específicas que se conocen, cortando en la secuencia LeuValProArg↓GlySer de las proteínas de fusión. La trombina que se utiliza en el kit está biotinilada, es decir, unida covalentemente a biotina, para una fácil liberación del enzima, una vez finalizada la reacción de corte, mediante estreptavidina inmovilizada.

La proteína de fusión se incubó con trombina a 20°C durante 16 h en una mezcla de reacción cuya composición se detalla en la tabla 2.6.2.

**Tabla 2.6.2.** Reacción de eliminación de la cola de histidina.

<b>Mezcla de reacción:</b>
-500 µl de tampón trombina 10X
-1 mg de la proteína de interés
-2 µl de trombina biotinilada
-H <sub>2</sub> O hasta enrasar a un volumen final de 5 ml

Después de la reacción de corte, la trombina biotinilada se eliminó por unión con agarosa estreptavidina en una proporción de 16 µl de resina por unidad de enzima. La mezcla se incubó durante 30 min en agitación vertical a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la mezcla se filtró, obteniéndose en el filtrado la proteína de interés sin la cola de histidinas y libre de trombina.

## 2.7. FRACCIONAMIENTO DE CULTIVOS BACTERIANOS

Con el fin de separar las células de los medios de cultivo, tras el crecimiento bacteriano en medios líquidos las células se recogieron por centrifugación durante 10 o 20 min a 4°C.

El sobrenadante obtenido, conteniendo las proteínas secretadas al medio, se dializó frente a H<sub>2</sub>O bidestilada durante toda la noche cuando el experimento lo requirió. En ocasiones el sobrenadante dializado se concentró mediante centrifugación a 5.000 ×g en unidades de ultrafiltración Centricon™-10 (Amicon®) con un tamaño de exclusión molecular de 10.000 Da.

La fracción intracelular se obtuvo resuspendiendo el pellet de células, recogidas por centrifugación, en 2 ml de tampón Tris HCl 100 mM pH 7,0 y lisando las células.

Cuando el volumen de suspensión celular fue pequeño, las células se lisaron por sonicación mediante la aplicación de 4 pulsos de 2 min, a una frecuencia de 0,9 segundos y 90 vatios de potencia (sonicador Labsonic 1510, B. Braun). Cuando el volumen de la suspensión celular fue grande, las células se rompieron por presión mediante French Press (French Pressure Cell Press, SLM AMINCO), por la que se pasaron 3 veces seguidas a 1.000 PSIG.

Los lisados obtenidos se centrifugaron para eliminar los restos de membrana y las células enteras. Los sobrenadantes que lo requirieron fueron dializados frente a H<sub>2</sub>O bidestilada toda la noche.

Las soluciones de proteínas fueron manipuladas a 4°C y mantenidas a -20°C.

## 2.8. VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La determinación de la concentración de proteína se realizó mediante el ensayo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), basado en el método de Bradford (1976). La valoración se hizo respecto a una recta patrón hecha con seroalbúmina bovina (BSA) en un rango de concentración entre 0,1 y 1 mg/ml.

## 2.9. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES MOLECULARES

### 2.9.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Las proteínas se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes (SDS-PAGE) según Laemmli (1970).

**Tabla 2.9.1.** Composición de los geles de poliacrilamida.

<b>Gel de separación:</b>	<b>12%</b>	<b>13%</b>
-Solución de acrilamida-bisacrilamida	2,4 ml	2,6 ml
-Tampón de separación	1,56 ml	1,56 ml
-H <sub>2</sub> O bidestilada	2,0 ml	1,8 ml
-TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina, Bio-Rad)	5 µl	5 µl
-APS al 10% (Persulfato amónico, Bio-Rad)	30 µl	30 µl
<b>Gel de empaquetamiento:</b>	<b>5%</b>	
-Solución de acrilamida-bisacrilamida	0,42 ml	
-Tampón de empaquetamiento	0,625 ml	
-H <sub>2</sub> O bidestilada	1,4 ml	
-TEMED	5 µl	
-APS al 10%	17,5 µl	

Las muestras fueron adicionadas con tampón de carga 3X, se incubaron a 100°C durante 5 min, y se dejaron en hielo hasta que fueron cargadas en los geles.

La electroforesis se llevó a cabo a 75 voltios a través del gel de empaquetamiento y a 100 voltios una vez que las muestras pasaron al gel de separación (Tablas 2.9.1. y 2.9.2.).

**Tabla 2.9.2.** Composición de las soluciones utilizadas en el análisis de proteínas.

<b>Solución de acrilamida-bisacrilamida:</b>	-30 g de acrilamida (Bio-Rad) -0,8 g de bisacrilamida (Bio-Rad) -Enrasar a 100 ml con H <sub>2</sub> O bidestilada -Filtrar y guardar a 4°C protegido de la luz
<b>Tampón de separación:</b>	-Tris HCl 1,5 M pH 8,8 -SDS (Merck) al 0,4%
<b>Tampón de empaquetamiento:</b>	-Tris HCl 0,5 M pH 6,8 -SDS al 0,4%
<b>Tampón de electroforesis 10X:</b>	-Tris 0,25 M -Glicina 1,92 M -SDS al 1%
<b>Tampón de carga 3X:</b>	-Glicerol al 15% -β-mercaptoetanol al 7,5% (Sigma) -SDS al 3,45% -Tris HCl 0,0937 M pH 6,8 -Azul de bromofenol (Bio-Rad) al 0,15%

### 2.9.1.1. Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie

Una vez realizada la electroforesis los geles se tiñeron durante una hora con Azul Brillante de Coomassie (Tabla 2.9.3.) y posteriormente se destiñeron con una solución de ácido acético al 10%.

**Tabla 2.9.3.** Composición de la solución de tinción.

<b>Solución de Azul Brillante de Coomassie:</b>
-Azul Brillante de Coomassie R-250 (Sigma) al 0,05%
-Ácido acético al 10% (Panreac)
-Isopropanol al 25% (Prolabo)

Para determinar el peso molecular de las proteínas, éstas se compararon con un marcador de pesos moleculares de amplio rango, que abarcaba entre 200 kDa y 6,5 kDa (Bio-Rad, Broad Range Molecular Weight) (Tabla 2.9.4.), el cual se incluyó en los geles.

**Tabla 2.9.4.** Peso molecular de las proteínas marcadoras.

<b>Proteínas</b>	<b>Da</b>
Miosina	200.000
$\beta$ -galactosidasa	116.250
Fosforilasa b	97.400
Seroalbúmina bovina	66.200
Ovoalbúmina	45.000
Anhidrasa carbónica	31.000
Inhibidor de la tripsina	21.500
Lisozima	14.400
Aprotinina	6.500

### 2.9.1.2. Zimograma

Concluida la electroforesis los geles fueron tratados con Tritón X-100 (Sigma) al 2,5% durante 30 min para renaturalizar las proteínas y lavados con tampón 100 mM al pH adecuado, conteniendo  $\text{CaCl}_2$  1,5-3 mM, durante 30 min más. Después los geles fueron cubiertos con geles de agarosa al 1%, que contenían ácido poligalacturónico o pectina del 89% de esterificación al 0,1% en el tampón anterior, y se incubaron durante 30-60 min a 45°C. A continuación, los geles de agarosa se tiñeron con Rojo de Rutenio (Sigma) al 0,05% durante 15 min y se lavaron con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada hasta que las bandas de degradación del ácido poligalacturónico o pectina se hicieron visibles (Ried y Collmer, 1985, 1986).

## 2.9.2. Isoelectroenfoque

El punto isoelectrico de las proteínas fue determinado en un aparato PhastSystem (Pharmacia Biotech) utilizando geles PhastGel IEF (Pharmacia Biotech) de un rango de pH entre 3 y 9.

### 2.9.2.1. Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie

Después de la separación de proteínas según su punto isoelectrico, los geles se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie utilizando un método modificado para geles de isoelectroenfoque (Blanco *et al.*, 1996).

Primero, se fijaron las proteínas sumergiendo los geles durante 15 min en ácido tricloroacético (Merck) al 20%. Después se lavó durante 5 min con solución de lavado, tiñéndose a continuación en solución de tinción. Por último, los geles se lavaron hasta desteñir el fondo con solución de lavado (Tabla 2.9.5.).

**Tabla 2.9.5.** Composición de las soluciones.

<b>Solución de lavado:</b>	-Metanol (Panreac) al 30% -Ácido acético al 10% -60% de H <sub>2</sub> O
<b>Solución de tinción:</b>	-Azul Brillante de Coomassie R-250 al 0,02% en solución de lavado. Se filtró antes de mezclar con el siguiente compuesto. -CuSO <sub>4</sub> al 0,1%

El punto isoelectrico de las proteínas se estimó comparando con un marcador de punto isoelectrico (Pharmacia, Broad pI kit, pH 3,5-9,3) (Tabla 2.9.6.) que se incluyó en los geles.

**Tabla 2.9.6.** Punto isoelectrico de las proteínas marcadoras.

<b>Proteínas</b>	<b>pI</b>
Tripsinógeno	9,30
Lectina	8,65
Lectina	8,45
Lectina	8,15
Mioglobina de caballo	7,35
Mioglobina de caballo	6,85
Anhidrasa carbónica humana B	6,55
Anhidrasa carbónica bovina B	5,85
$\beta$ -lactoglobulina A	5,20
Inhibidor de la tripsina	4,55
Amiloglucosidasa	3,50

### 2.9.2.2. Zimograma

Una vez finalizada la electroforesis los geles fueron cubiertos con geles de agarosa al 1%, que estaban suplementados con ácido poligalacturónico o pectina del 89% de esterificación al 0,1% en tampón 100 mM al pH adecuado, conteniendo  $\text{CaCl}_2$  1,5-3 mM. Los geles de agarosa se incubaron durante 15 min a 45°C, se tiñeron con Rojo de Rutenio al 0,05% durante 10 min y se lavaron con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada hasta que las bandas de degradación del ácido poligalacturónico o pectina se hicieron visibles.

## 2.10. DETECCIÓN Y VALORACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

### 2.10.1. Detección de actividades enzimáticas en placa

La detección de la actividad pectinasa se realizó cultivando las cepas en placas de agar LB suplementado con ácido poligalacturónico a una concentración final del 1% y el antibiótico adecuado cuando fue necesario. Los cultivos se incubaron durante dos o tres días a 30°C o 37°C y, a continuación, las placas se cubrieron con HCl 1 N. Las

colonias productoras de pectinasa fueron detectadas por la aparición de halos turbios alrededor de éstas debido a la degradación del sustrato.

### **2.10.2. Valoración de actividad hidrolasa**

La actividad hidrolítica sobre polisacáridos se midió valorando la formación de azúcares reductores mediante el método de Nelson-Somogyi (Spiro, 1966).

Las mezclas de reacción contenían la muestra a valorar (20-50  $\mu$ l), el sustrato a ensayar al 0,2-0,5% y tampón 50 mM al pH adecuado, en un volumen final de reacción de 0,1 ml.

Las mezclas de reacción se incubaron durante una hora a una temperatura determinada, parando seguidamente la reacción mediante adición de 0,15 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada y 0,25 ml de reactivo alcalino de cobre. A continuación se incubó a 100°C durante 10 min. Tras la incubación, las muestras se enfriaron en un baño con H<sub>2</sub>O a temperatura ambiente, se añadió 0,25 ml de solución de arsenomolibdato y se agitó. Se adicionó 0,75 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada, se mezcló por inversión, se centrifugó durante 5 min y se recogió el sobrenadante. La actividad enzimática, se cuantificó mediante la lectura de la absorbancia a 520 nm.

#### **Reactivo alcalino de cobre:**

Se preparó inmediatamente antes de su utilización mezclando las soluciones I y II en una proporción de 4:1.

#### *Solución I:*

- 15 g de tartrato sódico potásico (Sigma)
- 30 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Panreac)
- Disolver en 300 ml de H<sub>2</sub>O destilada
- 20 g de NaHCO<sub>3</sub> (Panreac)
- Solución de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Panreac) (180 g en 500 ml de H<sub>2</sub>O destilada)
- Enrasar a un volumen final de 1 litro.

*Solución II:*

-5 g de  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (Panreac)

-45 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

-Disolver en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada hasta un volumen final de 250 ml.

**Reactivo de arsenomolibdato:**

-25 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$  (Panreac) disueltos en 450 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

-21 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 96% (Panreac)

-3 g de  $\text{NaHAsO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck) disueltos en 25 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

-Incubar el reactivo durante 24-48 h a  $37^\circ\text{C}$

-Guardar en una botella opaca

Antes de su utilización se mezcló con 2 volúmenes de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,5 N

La cantidad de azúcares reductores liberados por la actividad enzimática se valoró frente a una recta patrón del azúcar reductor correspondiente (ácido D-galacturónico (Sigma), xilosa (Sigma) o glucosa). La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de  $1 \mu\text{mol}$  de azúcar reductor por minuto bajo las condiciones de ensayo utilizadas.

Para determinar la especificidad de sustrato, se utilizaron: ácido poligalacturónico, pectina de limón, xilano de abedul (Sigma), xilano de espelta de avena (Sigma) y CMC (carboximetilcelulosa) (Sigma).

Cuando el sustrato fue el ácido poligalacturónico o la pectina de limón, la mezcla de reacción contenía la muestra a valorar (20-40  $\mu\text{l}$ ), el sustrato a ensayar al 0,24%, tampón al pH adecuado con una molaridad final de 50 mM, NaCl 0,12 M y EDTA 6 mM, en un volumen final de reacción de 0,1 ml (Collmer *et al.*, 1988).

**2.10.3. Valoración de actividad liasa**

La actividad liasa se determinó valorando la formación de productos insaturados a partir del ácido poligalacturónico (actividad pectato liasa) o a partir de pectina de

distintos grados de metilación (actividad pectina liasa) a 232 nm mediante ensayo espectrofotométrico (Collmer *et al.*, 1988).

La mezcla de reacción contenía la muestra a valorar (0,01- 2  $\mu$ l) y el sustrato al 0,2% en un volumen final de 3 ml del tampón correspondiente 50 mM, con  $\text{CaCl}_2$  (Panreac) entre 0,5-2 mM. La mezcla fue incubada durante 2,5 min a la temperatura adecuada y se midió el incremento de absorbancia a 232 nm.

La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de producto insaturado por minuto bajo las condiciones de ensayo utilizadas. El coeficiente de extinción molar del ácido galacturónico insaturado es de 4.600 l/mol.cm.

#### **2.10.3.1. Influencia del grado de metilación en la actividad**

El estudio sobre la influencia del grado de metilación en la actividad liasa se realizó valorando la actividad del enzima sobre pectinas con diferentes grados de esterificación, según el ensayo descrito en el apartado 2.10.3.

#### **2.10.3.2. Estudio de la influencia del ión calcio**

Para valorar la influencia del calcio sobre la actividad enzimática, se realizó el ensayo habitual en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de calcio.

#### **2.10.3.3. Determinación de la temperatura óptima**

Para la determinación de la temperatura óptima se realizaron valoraciones de actividad liasa como se ha descrito en el apartado 2.10.3., pero incubando a diferentes temperaturas, en un rango entre 30 y 85°C con intervalos de 5°C.

#### **2.10.3.4. Determinación del pH óptimo**

El pH óptimo de la actividad liasa se determinó valorando dicha actividad a diferentes pH entre 3,0 y 12,0, con intervalos de 0,5 unidades.

Las soluciones tampón se prepararon según está descrito en la bibliografía (Gomori, 1955) y fueron las siguientes:

- Citrato sódico (Merck) 100 mM para pH entre 3,0 y 4,0
- Acetato sódico (Merck y Panreac) 100 mM para pH entre 4,0 y 6,0
- Fosfato sódico (Merck) 100 mM para pH entre 6,0 y 7,5
- Tris HCl 100 mM para pH entre 7,0 y 9,0
- Glicina sódica (Bio-Rad) 100 mM para pH entre 9,0 y 12,0

#### **2.10.3.5. Determinación de la termoestabilidad**

La estabilidad de la actividad liasa frente a la temperatura se determinó incubando la muestra a diferentes temperaturas, en el rango entre 30 y 85°C, durante una hora a pH 7, valorándose a continuación la actividad liasa residual mediante el método descrito en el apartado 2.10.3. En otras ocasiones, el enzima fue incubado durante diferentes intervalos de tiempo, entre 0 y 24 h, a cuatro temperaturas distintas y pH 7 o 10; y a continuación se midió la actividad liasa residual mediante el método citado anteriormente. También se realizaron estudios de estabilidad a 0°C o temperatura ambiente, y pH 7 durante varios días.

#### **2.10.3.6. Determinación del efecto del pH sobre la estabilidad**

La estabilidad de la actividad liasa se determinó incubando la muestra a diferentes pH, en el rango de 3 a 12, durante una hora a una temperatura determinada. A continuación, se valoró la actividad enzimática residual por el método habitual.

#### **2.10.3.7. Efecto de diversos cationes sobre la actividad enzimática**

Con el fin de estudiar el efecto de diferentes cationes metálicos en la actividad liasa, se determinó ésta por el método habitual en presencia de los diferentes cationes a una concentración de 1 mM y en ausencia o presencia adicional de calcio a la molaridad adecuada.

Los diferentes cationes utilizados fueron:

- Ag<sup>+</sup> (AgNO<sub>3</sub>) (Merck)
- Ba<sup>2+</sup> (BaCl<sub>2</sub>) (Merck)
- Ca<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub>)
- Co<sup>2+</sup> (CoCl<sub>2</sub>) (Merck)
- Hg<sup>2+</sup> (HgCl<sub>2</sub>) (Prolabo)
- Mg<sup>2+</sup> (MgCl<sub>2</sub>) (Merck)
- Mn<sup>2+</sup> (MnCl<sub>2</sub>) (Merck)
- Na<sup>+</sup> (NaOH)
- NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NH<sub>4</sub>Cl) (Merck)
- Ni<sup>2+</sup> (NiCl<sub>2</sub>) (Panreac)
- Sn<sup>2+</sup> (SnCl<sub>2</sub>) (Merck)
- Zn<sup>2+</sup> (ZnCl<sub>2</sub>) (Merck)

También se estudió el efecto de la presencia de EDTA [(Titriplex®III, etilendinitrilotetracetato), Merck] a una concentración de 1 mM.

## 2.11. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS

Con el objetivo de determinar las constantes cinéticas de los enzimas purificados se realizó el cálculo de las velocidades iniciales de formación del producto en presencia de diferentes concentraciones de sustrato, utilizando la ecuación de Michaelis-Menten (Stryer, 1988).

$$V = V_{\text{Máx}} \frac{[S]}{[S] + k_{\text{Máx}}}$$

## 2.12. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

### 2.12.1. Cromatografía en capa fina

Para estudiar el modo de acción de las pectinasas sobre diferentes sustratos se utilizó la cromatografía en capa fina (TLC). Los sustratos estudiados fueron: ácido

poligalacturónico, pectina del 22% de esterificación, pectina del 89% de esterificación y ácido trigalacturónico (Sigma).

La mezcla reacción contenía tampón glicina 0,15 M pH 10, CaCl<sub>2</sub> 0,5-2 mM, sustrato al 0,15% y entre 1,2 µg y 2,6 µg de enzima. Las incubaciones se realizaron a 40°C o 55°C, dependiendo del enzima, durante 24 h. Se extrajeron alícuotas de cada muestra a tiempo 0, a los 30 min, a las 3 h y a las 24 h. A cada alícuota se le realizó un pulso de centrifuga y se incubó a 100°C durante 5 min para detener la reacción. Posteriormente, se congeló hasta su utilización. Los productos de reacción generados por las pectinasas fueron separados en placas de silicagel (Kieselgel 60 F<sub>254</sub> 20x20 cm, Merck). Se aplicaron 10 µl de cada muestra a las placas de cromatografía. En paralelo se cargó 4 µl de una mezcla de oligosacáridos pécticos: G1 (ácido galacturónico, Sigma), G2 (ácido digalacturónico (Sigma) y G3 (ácido trigalacturónico), todos ellos al 0,2%. La fase móvil utilizada para separar los productos de la reacción fue una mezcla de n-butanol (Sigma), agua y ácido acético (5:3:2 v/v/v). Se realizaron dos ascensos. Una vez terminada la separación se dejaron secar las placas y se pulverizaron con una solución de ácido fosfomolibdico (Sigma) al 3% y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% en etanol. Finalmente, las placas se revelaron incubándolas en un horno a 125°C durante 5 min hasta que se observó la aparición de manchas correspondientes a los diferentes productos de reacción (Lojkowska *et al.*, 1995).



# **RESULTADOS**



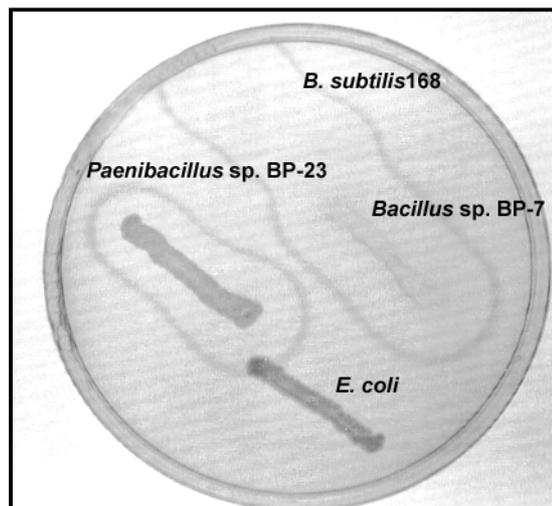
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS PECTINOLÍTICOS DE *Paenibacillus* sp. BP-23 Y *Bacillus* sp. BP-7

##### 3.1.1. Selección de las cepas

Las cepas *Paenibacillus* sp. BP-23 y *Bacillus* sp. BP-7 habían sido aisladas previamente por el grupo de investigación en el que se enmarca el presente trabajo a partir de muestras de suelo de arrozal del Delta del Ebro (Blanco, 1996). El aislamiento se realizó tras un cultivo de enriquecimiento en paja de arroz durante 2 meses. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron sometidas a un choque térmico de 80°C durante 10 min con el objetivo de seleccionar especies de microorganismos esporulados. De entre las numerosas cepas microbianas aisladas, las cepas *Paenibacillus* sp. BP-23 (Blanco y Pastor, 1993) y *Bacillus* sp. BP-7 (López *et al.*, 1998) fueron seleccionadas para el presente trabajo por presentar un gran poder pectinolítico y simultáneamente una gran capacidad degradadora de xilano y otros polisacáridos.

Para el estudio de sus respectivos sistemas pectinolíticos, las cepas *Paenibacillus* sp. BP-23 y *Bacillus* sp. BP-7 fueron cultivadas en placas de agar nutritivo suplementadas con ácido poligalacturónico. Como controles positivo y negativo se sembraron también en las placas las cepas de colección *Bacillus subtilis* 168, productor de pectinasas, y *Escherichia coli*, desprovista de fondo pectinolítico. Tras la incubación a 30°C durante 3 días, las placas fueron cubiertas con HCl 1 N para revelar la secreción de pectinasas. Las dos cepas en estudio mostraron halos notables de degradación de ácido poligalacturónico, siendo de mayor tamaño el que presentó la cepa *Bacillus* sp. BP-7 (Fig. 3.1.1.). En cuanto a las cepas control, *Bacillus subtilis* 168 mostró un halo de degradación similar a *Paenibacillus* sp. BP-23, mientras que *Escherichia coli* no produjo halo de degradación del ácido poligalacturónico.



**Figura 3.1.1.** Actividad pectinasa de las cepas seleccionadas.

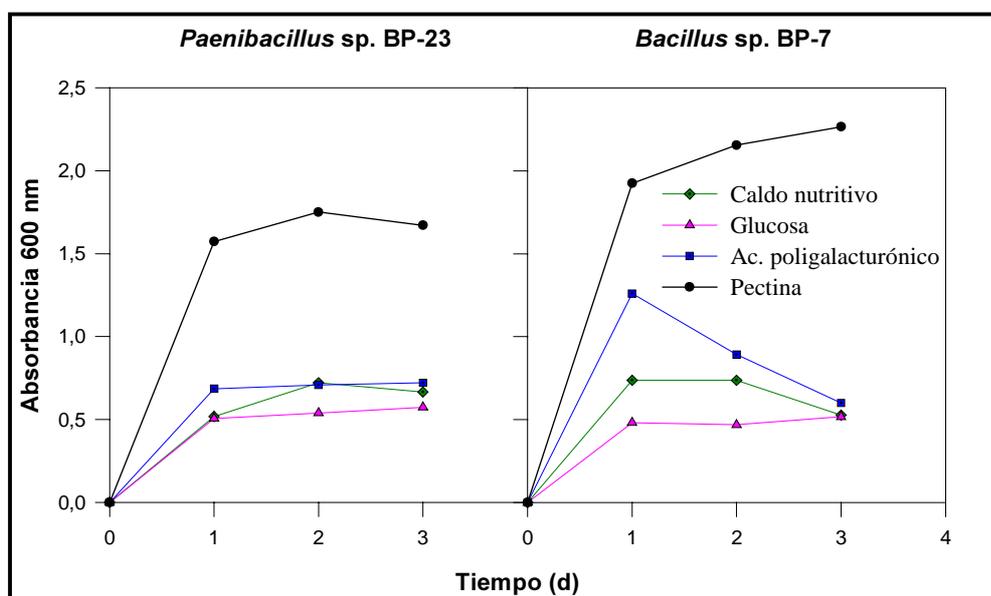
### 3.1.2. Estudio de la producción de pectinasas

Con el fin de analizar la influencia de la composición del medio de cultivo en la producción de pectinasas por *Paenibacillus* sp. BP-23 y *Bacillus* sp. BP-7, se realizaron cultivos de las cepas en caldo nutritivo sin suplementar o suplementado con glucosa, ácido poligalacturónico o pectina de limón al 1%. Los diferentes medios se inocularon a partir de cultivos de 16 h de las cepas respectivas en caldo nutritivo sin suplementar y se incubaron durante 3 días a 30°C. Se tomaron muestras cada 24 h, determinándose la absorbancia a 600 nm y la actividad pectinasa.

La cepa *Paenibacillus* sp. BP-23 mostró el mayor crecimiento en caldo nutritivo suplementado con pectina, mientras que en caldo nutritivo suplementado con glucosa se observaron los niveles de crecimiento inferiores. Los valores máximos de absorbancia a 600 nm de los diferentes cultivos se obtuvieron a las 48 h en caldo nutritivo sin suplementar o suplementado con pectina y a las 72 h en los medios suplementados con glucosa o con ácido poligalacturónico (Fig. 3.1.2.).

La cepa *Bacillus* sp. BP-7 también mostró mayor crecimiento en caldo nutritivo suplementado con pectina, mientras que en el medio suplementado con glucosa se observaron los niveles de crecimiento inferiores. Los valores máximos de crecimiento se obtuvieron a las 24 h en el medio no suplementado o suplementado con ácido poligalacturónico y a las 72 h en los medios suplementados con glucosa o con pectina

(Fig. 3.1.2.). Es de destacar que los valores máximos de absorbancia obtenidos por la cepa *Bacillus* sp. BP-7 en medios con pectina o ácido poligalacturónico fueron muy superiores a los obtenidos por *Paenibacillus* sp. BP-23 en los mismos medios.



**Figura 3.1.2.** Crecimiento de *Paenibacillus* sp. BP-23 y *Bacillus* sp. BP-7 en distintos medios.

### 3.1.2.1. Producción de pectinasas por *Paenibacillus* sp. BP-23

Las muestras de los cultivos de *Paenibacillus* sp. BP-23 fueron centrifugadas para eliminar las células. Los sobrenadantes obtenidos se dializaron y se determinó a continuación la actividad pectinasa en los mismos. En concreto, se determinaron las actividades liasa e hidrolasa sobre ácido poligalacturónico y sobre pectina de limón del 71% de metilación, es decir, las actividades pectato y pectina liasa, así como las actividades poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa.

Las tablas 3.1.1. y 3.1.2. muestran los resultados de las actividades pectato liasa y pectina liasa extracelular de la cepa *Paenibacillus* sp. BP-23.

La actividad pectato liasa se determinó inicialmente a 40°C de temperatura y pH 10. Se observó que la pectina inducía notablemente la producción de pectato liasas en *Paenibacillus* sp. BP-23, obteniéndose los valores máximos de dicha actividad en caldo nutritivo suplementado con pectina (Tabla 3.1.1.). En dicho medio, los valores

más elevados se obtuvieron tras 48 h de cultivo, obteniéndose 23,38 U/ml. En caldo nutritivo sin suplementar o suplementado con ácido poligalacturónico se obtuvieron valores de pectato liasa notablemente inferiores, mientras que en medios suplementados con glucosa no se detectó actividad pectato liasa.

Para estudiar la posible presencia en los sobrenadantes de enzimas con actividad pectato liasa que fueran activos a otros pH, se repitieron los ensayos de actividad a pH 7 y 5. A pH 7 únicamente se detectó actividad en los sobrenadantes de medios suplementados con pectina, aunque los niveles de actividad fueron notablemente inferiores a los detectados a pH 10. Por el contrario, cuando los ensayos se realizaron a pH 5 no se detectó actividad pectato liasa en ningún medio.

Al igual que lo observado con la actividad pectato liasa, cuando se determinó la actividad pectina liasa a pH 10, se observó que la pectina ejercía un efecto inductor en la producción de dicha actividad por *Paenibacillus* sp. BP-23 (Tabla 3.1.2.). Los valores máximos de pectina liasa (47,22 U/ml de cultivo) se obtuvieron en medios suplementados con pectina tras 48 h de cultivo. Cuando la cepa fue cultivada en caldo nutritivo sin suplementar o suplementado con ácido poligalacturónico, la actividad fue notablemente menor, mientras que en medios suplementados con glucosa no se observó la producción de pectina liasas.

Cuando se repitieron los ensayos a pH 7 y 5 se detectó actividad pectina liasa a los dos pH ensayados, aunque se obtuvieron valores notablemente inferiores a los obtenidos a pH 10.

**Tabla 3.1.1.** Actividad pectato liasa de *Paenibacillus* sp. BP-23 cultivado en caldo nutritivo suplementado con diferentes carbohidratos.

	Actividad pectato liasa (U/ml cultivo)			pH
	24 h	48 h	72 h	
CN	0,01	0,07	0,04	10
CN+ glucosa	0,00	0,00	0,00	
CN+ ácido poligalacturónico	0,00	0,06	0,05	
CN+ pectina	10,73	23,38	11,99	
CN	0,00	0,00	0,00	7
CN+ glucosa	0,00	0,00	0,00	
CN+ ácido poligalacturónico	0,00	0,00	0,00	
CN+ pectina	0,51	0,87	0,55	

**Tabla 3.1.2.** Actividad pectina liasa de *Paenibacillus* sp. BP-23 cultivado en caldo nutritivo suplementado con diferentes carbohidratos.

	Actividad pectina liasa (U/ml cultivo)			pH
	24 h	48 h	72 h	
CN	0,11	0,18	0,07	10
CN+ glucosa	0,00	0,00	0,00	
CN+ ácido poligalacturónico	0,10	0,06	0,05	
CN+ pectina	14,69	47,22	27,23	
CN	0,02	0,02	0,01	7
CN+ glucosa	0,00	0,00	0,00	
CN+ ácido poligalacturónico	0,00	0,00	0,00	
CN+ pectina	0,64	1,00	0,71	
CN	0,00	0,02	0,00	5
CN+ glucosa	0,00	0,00	0,00	
CN+ ácido poligalacturónico	0,00	0,04	0,00	
CN+ pectina	0,00	0,04	0,00	

Las tablas 3.1.3. y 3.1.4. muestran los resultados de las actividades hidrolasa (poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa) extracelular de la cepa *Paenibacillus* sp. BP-23 tras 48 h de cultivo en los distintos medios. Es de destacar que los valores obtenidos de ambos tipos de actividad hidrolasa fueron muy inferiores a los de pectato y pectina liasa.

De esta forma la cepa *Paenibacillus* sp. BP-23 mostró una muy baja producción de actividad poligalacturonasa, como se muestra en la tabla 3.1.3.

En cuanto a la actividad polimetilgalacturonasa, ésta fue determinada inicialmente a pH 10. Se observó que la pectina y el ácido poligalacturónico inducían la producción de polimetilgalacturonasa en *Paenibacillus* sp. BP-23, obteniéndose valores de actividad muy superiores a los obtenidos en medios sin suplementar o con glucosa (Tabla 3.1.4.). Cuando los ensayos se repitieron a pH 7 y pH 5 se obtuvieron valores de actividad inferiores a los detectados a pH 10.

**Tabla 3.1.3.** Actividad poligalacturonasa de *Paenibacillus* sp. BP-23 cultivado en caldo nutritivo suplementado con diferentes carbohidratos.

	<b>Actividad poligalacturonasa (U/ml cultivo)</b>		
	pH 10	pH 7	pH 5
CN	0,00	0,04	0,04
CN+ glucosa	0,03	0,00	0,03
CN+ ácido poligalacturónico	0,04	0,00	0,00
CN+ pectina	0,00	0,04	0,04

**Tabla 3.1.4.** Actividad polimetilgalacturonasa de *Paenibacillus* sp. BP-23 cultivado en caldo nutritivo suplementado con diferentes carbohidratos.

	Actividad polimetilgalacturonasa (U/ml cultivo)		
	pH 10	pH 7	pH 5
CN	0,04	0,00	0,10
CN+ glucosa	0,05	0,04	0,04
CN+ ácido poligalacturónico	0,11	0,07	0,10
CN+ pectina	0,43	0,21	0,07

El resumen de los distintos tipos de actividad pectinasa secretados por *Paenibacillus* sp. BP-23 se muestra en la tabla 3.1.5. Se observa que la cepa secreta niveles elevados de actividad pectato y pectina liasa, mientras que los niveles de actividad hidrolasa (poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa) son notablemente inferiores.

**Tabla 3.1.5.** Valores de máximos de actividades liasa e hidrolasa de *Paenibacillus* sp. BP-23.

Sustratos	Actividad pectinasa (U/ml cultivo)	
	Ácido poligalacturónico	Pectina
Actividad liasa	23,38	47,22
Actividad hidrolasa	0,04	0,43

### 3.1.2.2. Producción de pectinasas por *Bacillus* sp. BP-7

Las muestras de los cultivos de *Bacillus* sp. BP-7 fueron centrifugadas para eliminar las células, dializando a continuación los sobrenadantes obtenidos, en los que se determinó la actividad pectinasa.

Las tablas 3.1.6. y 3.1.7. muestran los resultados de la actividad pectato liasa y pectina liasa extracelular de *Bacillus* sp. BP-7. Dichos valores fueron notablemente inferiores a los detectados en *Paenibacillus* sp. BP-23.

La actividad pectato liasa fue ensayada inicialmente a 40°C de temperatura y pH 10. Al igual que en la cepa *Paenibacillus* sp. BP-23, se observó que la pectina también inducía la producción de pectato liasas en *Bacillus* sp. BP-7, obteniéndose los valores máximos de dicha actividad en medios suplementados con pectina (Tabla 3.1.6.). En dicho medio los valores más elevados se obtuvieron entre las 48 y las 72 h de cultivo (0,53 U/ml). En caldo nutritivo sin suplementar, o suplementado con ácido poligalacturónico o glucosa se obtuvieron valores menores de actividad. Es de destacar que la producción de pectato liasa en *Bacillus* sp. BP-7 no resultó reprimida por glucosa. Al realizar los ensayos a pH 7 se obtuvieron valores de actividad pectato liasa aproximadamente similares a los detectados a pH 10, siendo el patrón de producción en los distintos medios muy parecido. Por el contrario, cuando los ensayos se realizaron a pH 5 no se detectó actividad.

La actividad pectina liasa de *Bacillus* sp. BP-7 se determinó primeramente a pH 10. Se observó inducción en medios suplementados con pectina, obteniéndose los valores más elevados a las 48 h de cultivo (1,51 U/ml) (Tabla 3.1.7.). También en este caso, en los otros medios de cultivo ensayados se obtuvieron valores de actividad inferiores a los obtenidos en medio suplementado con pectina, no observándose represión de la producción de pectina liasa por glucosa. La determinación de actividad pectina liasa a pH 7 dio valores inferiores a los detectados a pH 10, mientras que cuando los ensayos se realizaron a pH 5 la actividad detectada fue notablemente inferior.

**Tabla 3.1.6.** Actividad pectato liasa de *Bacillus* sp. BP-7 cultivado en caldo nutritivo suplementado con diferentes carbohidratos.

	Actividad pectato liasa (U/ml cultivo)			pH
	24 h	48 h	72 h	
CN	0,00	0,02	0,10	10
CN+ glucosa	0,00	0,07	0,17	
CN+ ácido poligalacturónico	0,17	0,04	0,02	
CN+ pectina	0,36	0,53	0,53	
CN	0,06	0,03	0,07	7
CN+ glucosa	0,04	0,08	0,10	
CN+ ácido poligalacturónico	0,13	0,11	0,08	
CN+ pectina	0,29	0,30	0,30	

**Tabla 3.1.7.** Actividad pectina liasa de *Bacillus* sp. BP-7 cultivado en caldo nutritivo suplementado con diferentes carbohidratos.

	Actividad pectina liasa (U/ml cultivo)			pH
	24 h	48 h	72 h	
CN	0,26	0,36	0,37	10
CN+ glucosa	0,32	0,45	0,46	
CN+ ácido poligalacturónico	0,55	0,44	0,35	
CN+ pectina	1,38	1,51	1,46	
CN	0,06	0,05	0,08	7
CN+ glucosa	0,07	0,09	0,07	
CN+ ácido poligalacturónico	0,13	0,10	0,05	
CN+ pectina	0,28	0,31	0,30	
CN	0,00	0,03	0,00	5
CN+ glucosa	0,00	0,01	0,00	
CN+ ácido poligalacturónico	0,00	0,02	0,02	
CN+ pectina	0,00	0,01	0,00	

En las tablas 3.1.8. y 3.1.9. se muestran los resultados de la actividad hidrolasa (poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa) extracelular de *Bacillus* sp. BP-7 tras 48 h de crecimiento en distintos medios.

La cepa *Bacillus* sp. BP-7 mostró una muy baja producción de los dos tipos de hidrolasas, siendo la producción de polimetilgalacturonasas la más elevada. Los valores mayores de dicha actividad se obtuvieron en medios suplementados con pectina. A todos los pH ensayados los niveles de actividad polimetilgalacturonasa fueron similares.

**Tabla 3.1.8.** Actividad poligalacturonasa de *Bacillus* sp. BP-7 cultivado en caldo nutritivo suplementado con diferentes carbohidratos.

	Actividad poligalacturonasa (U/ml cultivo)		
	pH 10	pH 7	pH 5
CN	0,03	0,00	0,03
CN+ glucosa	0,03	0,03	0,04
CN+ ácido poligalacturónico	0,00	0,00	0,04
CN+ pectina	0,00	0,04	0,05

**Tabla 3.1.9.** Actividad polimetilgalacturonasa de *Bacillus* sp. BP-7 cultivado en caldo nutritivo suplementado con diferentes carbohidratos.

	Actividad polimetilgalacturonasa (U/ml cultivo)		
	pH 10	pH 7	pH 5
CN	0,06	0,04	0,08
CN+ glucosa	0,04	0,06	0,04
CN+ ácido poligalacturónico	0,10	0,04	0,00
CN+ pectina	0,07	0,10	0,06

El resumen de los distintos tipos de actividad pectinasa secretados por *Bacillus* sp. BP-7 se muestra en la tabla 3.1.10. Se observa que la cepa secreta niveles de

actividad pectato y pectina liasa muy superiores a los de actividad hidrolasa (poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa).

**Tabla 3.1.10.** Valores máximos de actividades liasa e hidrolasa de *Bacillus* sp. BP-7.

Sustratos	Actividad pectinasa (U/ml cultivo)	
	Ácido poligalacturónico	Pectina
Actividad liasa	0,53	1,51
Actividad hidrolasa	0,05	0,10

### 3.1.3. Caracterización de las actividades pectato y pectina liasa

Los resultados expuestos (tablas 3.1.5. y 3.1.10.) indican que las actividades pectinolíticas más abundantes de las dos cepas en estudio son las actividades pectato y pectina liasas, motivo por el cual nos propusimos caracterizarlas.

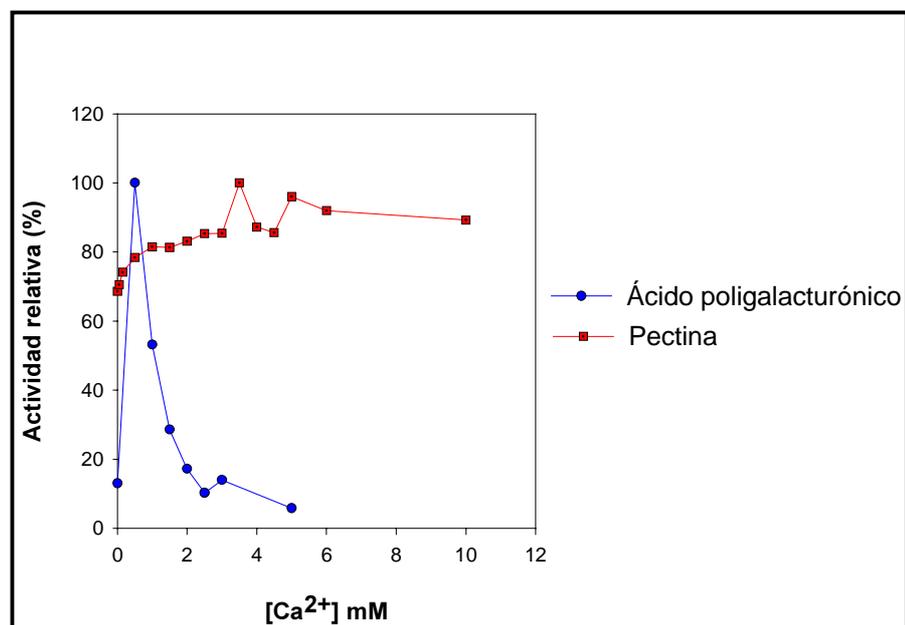
#### 3.1.3.1. Caracterización de las actividades pectato y pectina liasa de *Paenibacillus* sp. BP-23

##### 3.1.3.1.1. Determinación de la concentración óptima de calcio

Debido a que el ión  $\text{Ca}^{2+}$  es necesario para la actividad enzimática de las pectato liasas conocidas hasta el momento, los ensayos de actividad pectato liasa y también pectina liasa realizados contenían  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM en la mezcla de ensayo. Con el objeto de determinar el efecto del ión  $\text{Ca}^{2+}$  en las actividades pectato y pectina liasa de *Paenibacillus* sp. BP-23, se realizaron ensayos de actividad a diferentes concentraciones de dicho ión.

Los resultados indicaron que la actividad pectato liasa de *Paenibacillus* sp. BP-23 requería  $\text{Ca}^{2+}$ . La máxima actividad sobre ácido poligalacturónico se obtuvo con una concentración 0,5 mM de  $\text{CaCl}_2$  en la mezcla de ensayo (Fig. 3.1.3.). En ausencia de calcio añadido se detectó únicamente el 13% de la actividad máxima, sin embargo cuando los ensayos se realizaron en presencia de EDTA 1 mM no se detectó actividad pectato liasa. Este hecho indicaba un requerimiento absoluto de  $\text{Ca}^{2+}$  para la degradación de ácido poligalacturónico. La actividad observada sin calcio añadido indica la presencia de trazas de este ión como contaminante en las preparaciones de ácido poligalacturónico utilizadas como sustrato. A concentraciones elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  la actividad disminuía, observándose una actividad del 5,8% de la máxima a una concentración 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ .

En cuanto a la actividad pectina liasa también requirió la presencia de calcio, no observándose actividad sobre pectina en presencia de EDTA 1 mM. La máxima actividad sobre pectina se alcanzó a una concentración de  $\text{CaCl}_2$  3,5 mM.



**Figura 3.1.3.** Influencia de la concentración de calcio añadido en las actividades pectato y pectina liasa de *Paenibacillus* sp. BP-23.

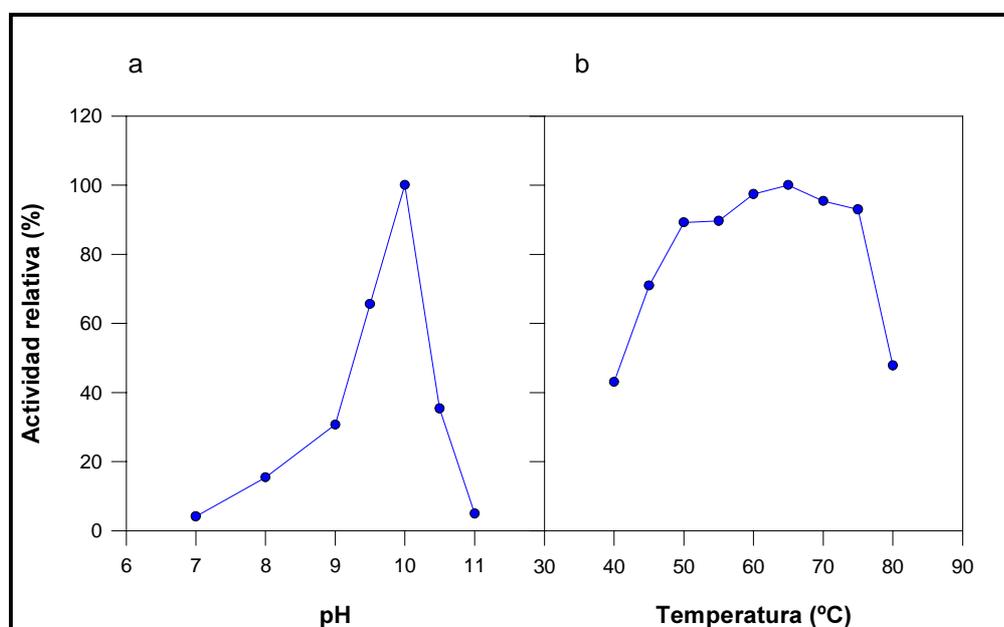
### 3.1.3.1.2. Estudio de la influencia del pH y de la temperatura

Se estudió a continuación el efecto del pH sobre la actividad pectato liasa de *Paenibacillus* sp. BP-23. Se realizaron para ello ensayos de actividad a 40°C en tampones a diferentes pH en el rango entre 7,0 y 11,0.

Se observó elevada actividad en un intervalo de pH básico, entre pH 9,0 y 10,5, mientras que fuera del mencionado intervalo la actividad disminuía notablemente (Fig. 3.1.4.a.). El pH óptimo de la actividad pectato liasa fue de 10,0.

Se estudió también el efecto de la temperatura en la actividad pectato liasa. Para ello se realizaron ensayos de actividad a pH 10 en el rango de temperaturas entre 40 y 80°C.

La temperatura óptima resultó ser 65°C. En el intervalo comprendido entre 45 y 75°C se observaron valores de actividad superiores al 70% de la máxima, mientras que a 80°C se obtuvieron valores del 47% de la actividad observada a la temperatura óptima (Fig. 3.1.4.b.).



**Figura 3.1.4.** Efecto del pH (a) y de la temperatura (b) sobre la actividad pectato liasa de *Paenibacillus* sp. BP-23.

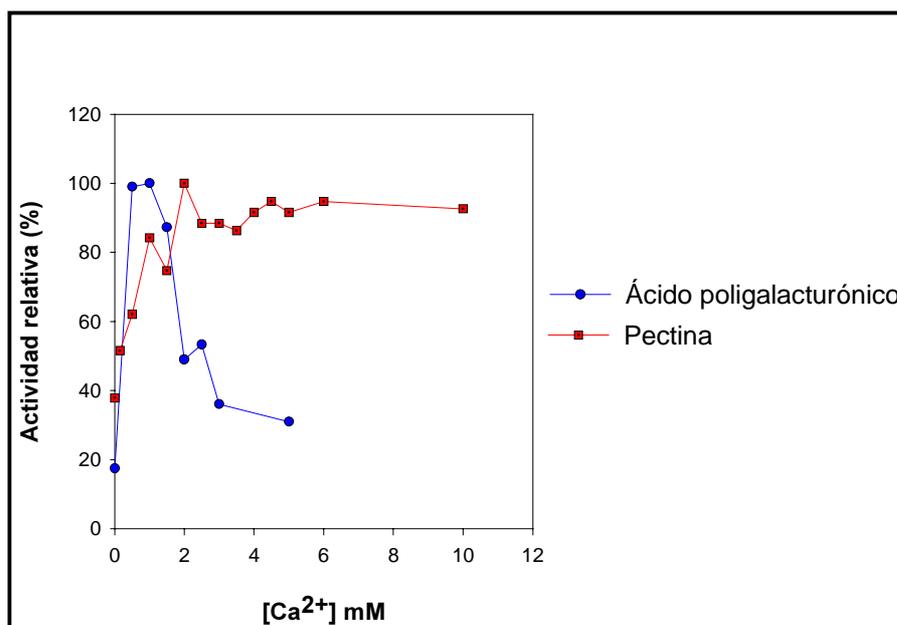
### **3.1.3.2. Caracterización de las actividades pectato y pectina liasa de *Bacillus* sp. BP-7**

#### 3.1.3.2.1. Determinación de la concentración óptima de calcio

Se realizó un estudio de la influencia del ión calcio a diferentes concentraciones en las actividades pectato y pectina liasa, las actividades pectinasa mayoritarias de *Bacillus* sp. BP-7.

Los resultados mostraron que la actividad máxima sobre ácido poligalacturónico se obtenía a una concentración de  $\text{CaCl}_2$  de 1 mM. La actividad pectato liasa en ausencia de calcio añadido fue del 17% de la máxima, sin embargo, cuando los ensayos se realizaron en presencia de EDTA 1 mM no se observó actividad. Estos resultados indican que la actividad pectato liasa de *Bacillus* sp. BP-7 presenta un requerimiento absoluto de  $\text{Ca}^{2+}$  para la degradación de ácido poligalacturónico (Fig. 3.1.5.).

Por el contrario, la actividad pectina liasa de *Bacillus* sp. BP-7 no mostró requerimiento de calcio. Aunque se obtuvieron valores máximos de actividad con  $\text{CaCl}_2$  2 mM, en ausencia de calcio añadido se observó actividad y en presencia de EDTA 1 mM o 2 mM se observaron niveles de actividad pectina liasa similares a los observados en ausencia de calcio añadido.



**Figura 3.1.5.** Influencia de la concentración de calcio añadido en las actividades pectato y pectina liasa de *Bacillus* sp. BP-7.

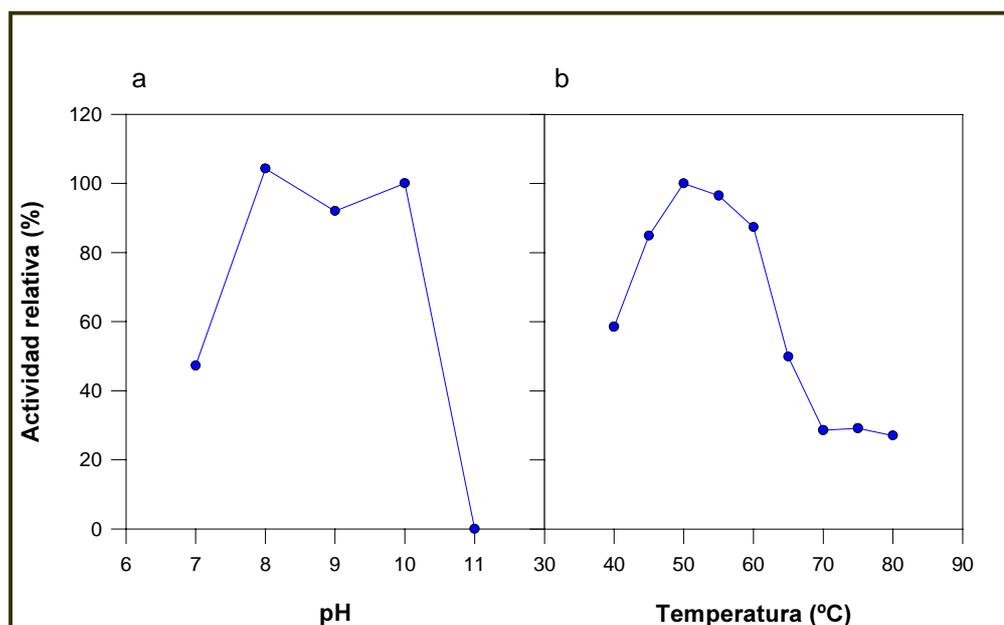
### 3.1.3.2.2. Estudio de la influencia del pH y de la temperatura

Para estudiar el efecto del pH sobre la actividad pectato liasa de *Bacillus* sp. BP-7, se realizaron ensayos enzimáticos a 40°C en el rango de pH entre 7,0 y 11,0.

La actividad pectato liasa máxima se observó en el rango de pH de 8,0 a 10,0, en el que se obtuvieron valores de actividad aproximadamente iguales. A pH 7,0 se detectó aproximadamente el 45% de la actividad máxima mientras que a pH 11,0 no se detectó actividad. (Fig. 3.1.6.a.).

Para analizar el efecto de la temperatura en la actividad pectato liasa de la cepa *Bacillus* sp. BP-7 se realizaron ensayos de actividad a pH 10 en el rango de temperaturas de 40 a 80°C.

La temperatura óptima resultó ser 50°C. En el intervalo comprendido entre 40 y 65°C se observó actividad superior al 50% de la máxima (Fig. 3.1.6.b.).



**Figura 3.1.6.** Efecto del pH (a) y de la temperatura (b) sobre la actividad pectato liasa de *Bacillus* sp. BP-7.

### 3.1.4. Determinación de la composición enzimática de los sistemas pectinolíticos

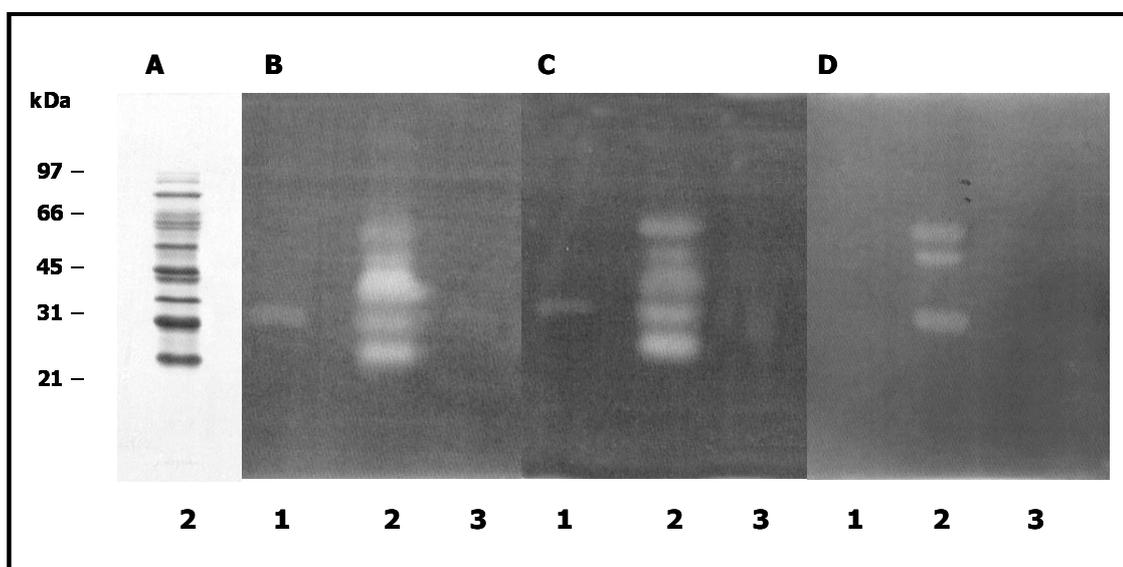
#### 3.1.4.1. Análisis zimográfico del sistema pectinolítico de *Paenibacillus* sp. BP-23

##### 3.1.4.1.1. Análisis en geles de poliacrilamida con SDS

Los sobrenadantes de cultivo de *Paenibacillus* sp. BP-23 en los distintos medios fueron concentrados y analizados en geles de poliacrilamida al 12% con SDS. Los geles fueron teñidos con Azul Brillante de Coomassie para revelar su composición proteica o, alternativamente, revelados para actividad degradadora de pectina mediante zimogramas realizados por superposición “overlay” con geles de agarosa conteniendo pectina (Fig. 3.1.7.).

Las muestras de cultivos en caldo nutritivo suplementado con pectina mostraron en los geles teñidos con Azul Brillante de Coomassie varias bandas proteicas prominentes. Los zimogramas correspondientes evidenciaron que cinco de las mismas, de pesos moleculares 25, 32, 38, 44 y 53 kDa presentaban actividad pectinasa, tal como

mostraron las bandas definidas de actividad que se visualizaron cuando los zimogramas fueron desarrollados a pH 10. Los zimogramas de cultivos en caldo nutritivo sin suplementar mostraron únicamente la banda de pectinasa de 32 kDa, mientras que en las muestras de cultivos suplementados con ácido poligalacturónico no aparecieron bandas de actividad. Cuando los zimogramas fueron desarrollados a pH 7 se observó el mismo patrón de bandas que a pH 10, sin embargo cuando fueron desarrollados a pH 5, únicamente aparecieron las bandas de pectinasa de 32, 44 y 53 kDa.



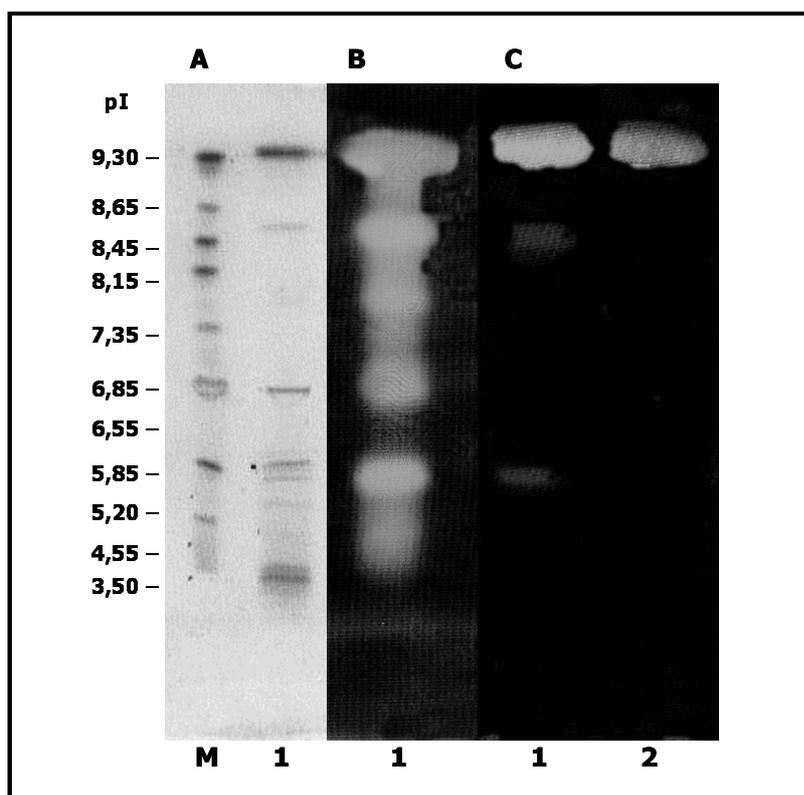
**Figura 3.1.7.** Análisis en geles de poliacrilamida con SDS del sistema pectinolítico de *Paenibacillus* sp. BP-23. Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie (A). Zimograma de actividad sobre pectina a pH 10 (B), pH 7 (C) o pH 5 (C). Sobrenadantes de *Paenibacillus* sp. BP-23 en caldo nutritivo sin suplementar (1), suplementado con pectina (2) o suplementado con ácido poligalacturónico (3).

#### 3.1.4.1.2. Análisis en geles de isoelectroenfoque

Las muestras de sobrenadantes de cultivo de *Paenibacillus* sp. BP-23 en medios suplementados con pectina se analizaron en geles de isoelectroenfoque que fueron revelados mediante tinción proteica y técnicas zimográficas (Fig. 3.1.8.).

En los geles se detectaron varias bandas proteicas, 6 de las cuales mostraron actividad pectinasa en los zimogramas desarrollados a pH 10. El pI de las bandas de pectinasa fue estimado en 5,2, 5,7, 6,6, 7,6 y 8,5, mientras que una sexta banda migró en el límite de pH superior del gel, indicando un pI igual o superior a 9. Cuando los

zimogramas se desarrollaron a pH 5, únicamente las bandas de pI 5,7, 8,5 y  $\geq 9$  mostraron actividad enzimática. Los zimogramas de cultivos de la cepa en caldo nutritivo sin suplementar mostraron únicamente la banda de actividad pectinasa de  $pI \geq 9$ .



**Figura 3.1.8.** Análisis en geles de isoelectroenfoque del sistema pectinolítico de *Paenibacillus* sp. BP-23. Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie (A). Zimograma de actividad pectinasa a pH 10 (B) o pH 5 (C). Sobrenadantes de *Paenibacillus* sp. BP-23 en caldo nutritivo sin suplementar (2) o suplementado con pectina (1). (M) Marcador de punto isoeléctrico.

### 3.1.4.2. Análisis zimográfico del sistema pectinolítico de *Bacillus* sp. BP-7

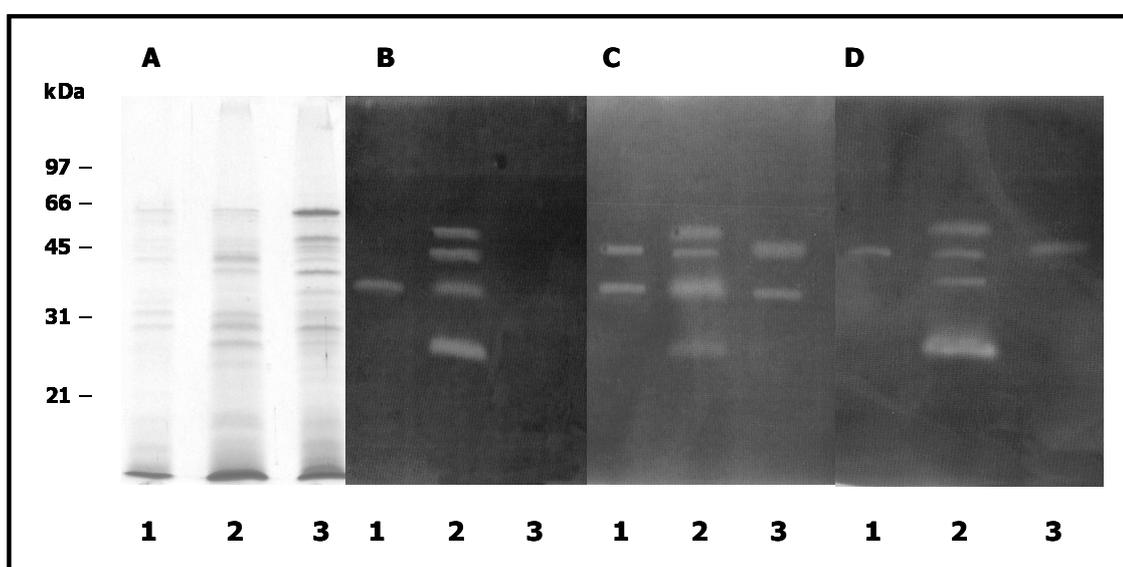
#### 3.1.4.2.1. Análisis en geles de poliacrilamida con SDS

Con el fin de estudiar la composición enzimática del sistema degradador de pectina de *Bacillus* sp. BP-7, los sobrenadantes de cultivo de la cepa en distintos medios

fueron analizados mediante geles de poliacrilamida y técnicas zimográficas. Igual que en el apartado anterior, se determinó tanto la composición proteica mediante tinción con Azul Brillante de Coomassie, como la actividad pectinasa mediante técnicas zimográficas.

Los zimogramas de muestras de cultivos en medios suplementados con pectina mostraron cuatro bandas de actividad pectinasa que presentaban pesos moleculares de 28, 42, 56 y 63 kDa. Las bandas de actividad aparecieron tanto en los zimogramas desarrollados a pH 10 como a pH 7 y 5, hecho que indica que deben corresponder a pectinasas activas en todo el rango de pH estudiado (Fig. 3.1.9.).

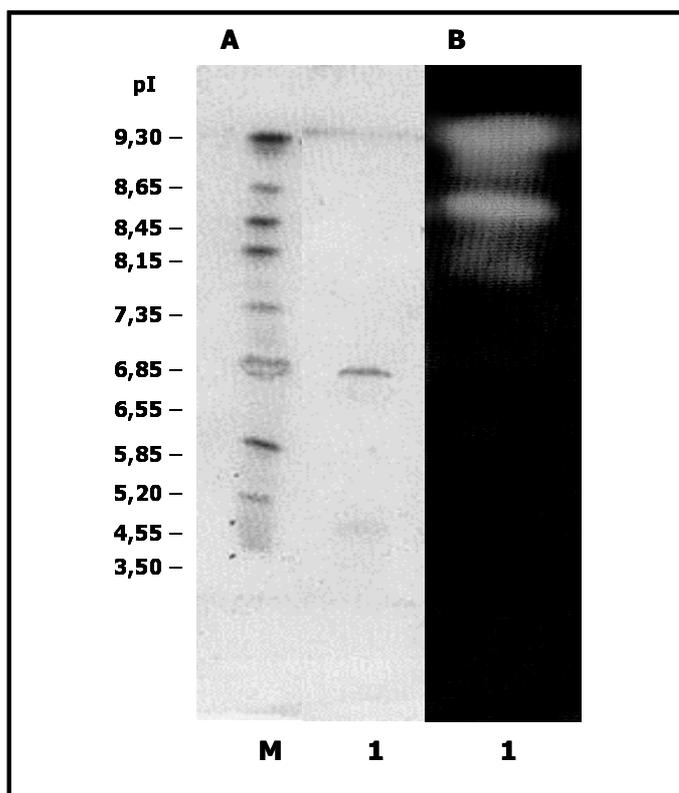
Las bandas de actividad de 42 y 56 kDa se detectaron también en cultivos suplementados con glucosa o con ácido poligalacturónico, aunque la intensidad de las mismas era menor que la observada en las muestras de cultivos suplementados con pectina.



**Figura 3.1.9.** Análisis en geles de poliacrilamida con SDS del sistema pectinolítico de *Bacillus* sp. BP-7. Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie (A). Zimograma de actividad sobre pectina a pH 10 (B), pH 7 (C) o pH 5 (C). Sobrenadantes de *Bacillus* sp. BP-7 en caldo nutritivo suplementado con glucosa (1), suplementado con pectina (2) o suplementado con ácido poligalacturónico (3).

### 3.1.4.2.2. Análisis en geles de isoelectroenfoque

Las muestras de sobrenadantes de cultivos suplementados con pectina se separaron en geles de isoelectroenfoque que fueron analizados mediante tinción proteica y mediante zimogramas que se desarrollaron a pH 10 (Fig. 3.1.10.). Los zimogramas mostraron 3 bandas de actividad pectinasa, de pI 7,8, 8,5 y  $\geq 9$ . Se apreció también una banda difusa de actividad entre las dos bandas de pI superior.



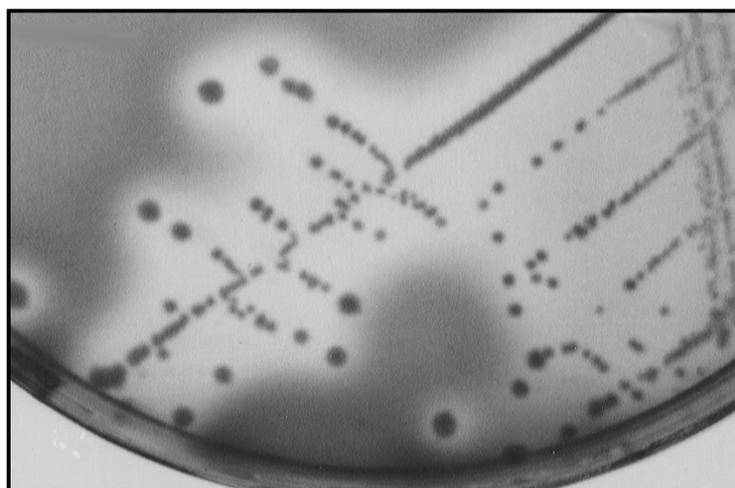
**Figura 3.1.10.** Análisis en geles de isoelectroenfoque del sistema pectinolítico de *Bacillus* sp. BP-7. Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie (A). Zimograma de actividad pectinasa a pH 10 (B). Sobrenadantes de *Bacillus* sp. BP-7 en caldo nutritivo suplementado con pectina (1). (M) Marcador de punto isoelectrico.

## 3.2. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PECTATO LIASA A (PeIA) DE *Paenibacillus* sp. BP-23

### 3.2.1. Clonación de *peIA*

Los resultados mostrados indican que la cepa *Paenibacillus* sp. BP-23 produce una elevada actividad degradadora de pectina y exhibe un sistema pectinolítico complejo con diversas enzimas con actividad pectinasa. Nos propusimos el estudio y caracterización de los mismos. Con este objetivo, a partir de una genoteca de *Paenibacillus* sp. BP-23, previamente construida en *Escherichia coli* (Blanco *et al.*, 1996), se realizó un escrutinio para identificar clones productores de pectinasa.

El escrutinio de la genoteca se realizó en placas de agar nutritivo suplementadas con ácido poligalacturónico. Los clones se sembraron en dichas placas y se incubaron durante 2 días a 37°C, tras los cuales las placas se revelaron para actividad pectinasa con HCl 1 N. Uno de los 4.000 clones analizados mostró un halo claro alrededor del crecimiento, hecho que indicaba la producción de enzimas degradadores de pectina. Por este motivo, el clon, que se denominó *Escherichia coli*/pP22, fue seleccionado para su estudio (Figura 3.2.1.).



**Figura 3.2.1.** Actividad enzimática del clon recombinante *Escherichia coli*/pP22 en placas de agar nutritivo suplementadas con ácido poligalacturónico.

Con el objetivo de determinar el tipo de actividad que producía el clon seleccionado, se realizaron ensayos de actividades liasa e hidrolasa sobre pectina y ácido poligalacturónico.

Los extractos crudos de *Escherichia coli*/pP22 mostraron elevada actividad liasa mientras que la actividad hidrolasa fue casi inapreciable. Los extractos exhibieron actividad liasa sobre los dos sustratos pécticos utilizados, pectina y ácido poligalacturónico, mostrando sobre éste último mayor actividad (Tabla 3.2.1.). Por ello se consideró que el enzima clonado era una pectato liasa, que se denominó pectato liasa A (PelA).

También se analizó la actividad del enzima clonado sobre diferentes sustratos no pécticos: xilano de madera de abedul, xilano de espelta de avena y CMC (carboximetilcelulosa). Los resultados mostraron que el enzima no presentaba actividad significativa sobre ninguno de ellos (Tabla 3.2.1.).

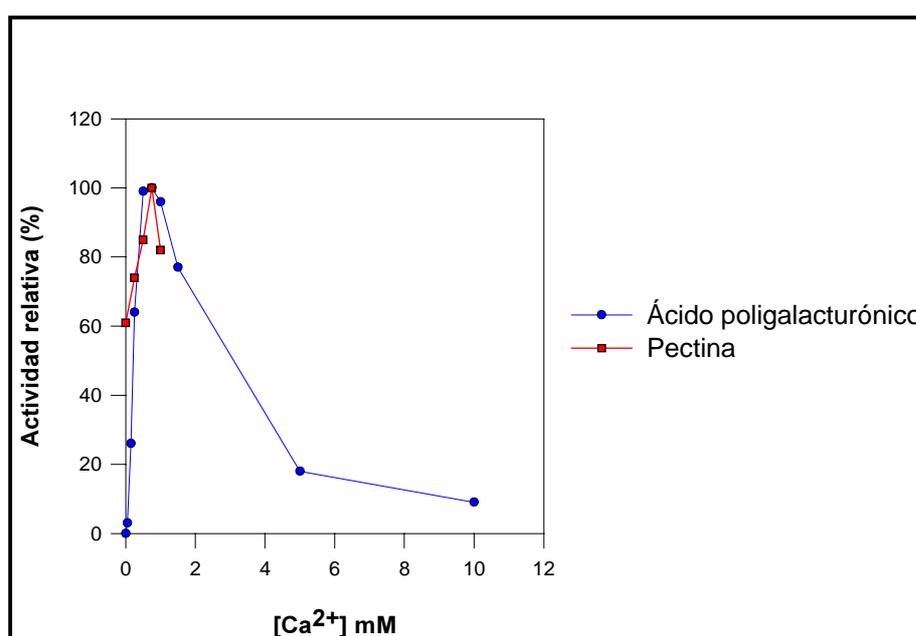
**Tabla 3.2.1.** Actividad hidrolasa y liasa de extractos crudos de *Escherichia coli*/pP22 sobre diferentes sustratos.

U/ml de cultivo	Pectina		Ácido poligalacturónico		CMC		Xilano de Abedul		Xilano de Avena	
	7	10	7	10	7	10	7	10	7	10
Actividad hidrolasa	2×10 <sup>-4</sup>	7×10 <sup>-3</sup>	4×10 <sup>-3</sup>	0,01	4×10 <sup>-4</sup>	0,00	2×10 <sup>-4</sup>	0,00	0,00	2×10 <sup>-4</sup>
Actividad liasa	0,01	4,66	0,05	5,13	-	-	-	-	-	-

Los ensayos de actividad liasa realizados contenían CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM en la mezcla de reacción. Con el objeto de verificar si el Ca<sup>2+</sup> era necesario para la actividad del enzima clonado, se realizó un estudio de la influencia de dicho ión, a diferentes concentraciones, en la actividad enzimática.

Los resultados mostraron que PelA necesitaba calcio añadido para la degradación de ácido poligalacturónico (Fig. 3.2.2.). La máxima actividad sobre este sustrato se encontró a una concentración de CaCl<sub>2</sub> entre 0,5 y 0,75 mM. A concentraciones mayores la actividad disminuía, observándose una actividad inferior al

9% de la máxima en presencia de  $\text{CaCl}_2$  10 mM. Por el contrario, para la degradación de pectina no fue necesaria la adición de calcio en la mezcla de ensayo, aunque dicha adición producía un aumento en la actividad. La máxima actividad sobre pectina se alcanzó a una concentración 0,75 mM de  $\text{CaCl}_2$ . La actividad sin calcio añadido al ensayo era seguramente resultado de la presencia del ión como contaminante en pequeñas cantidades en las pectinas usadas como sustrato. Cuando los ensayos se realizaron en presencia de EDTA 2 mM no se detectó actividad ni sobre pectina ni sobre ácido poligalacturónico. Estos resultados indican un requerimiento absoluto de calcio para la actividad del enzima sobre sustratos pécticos.



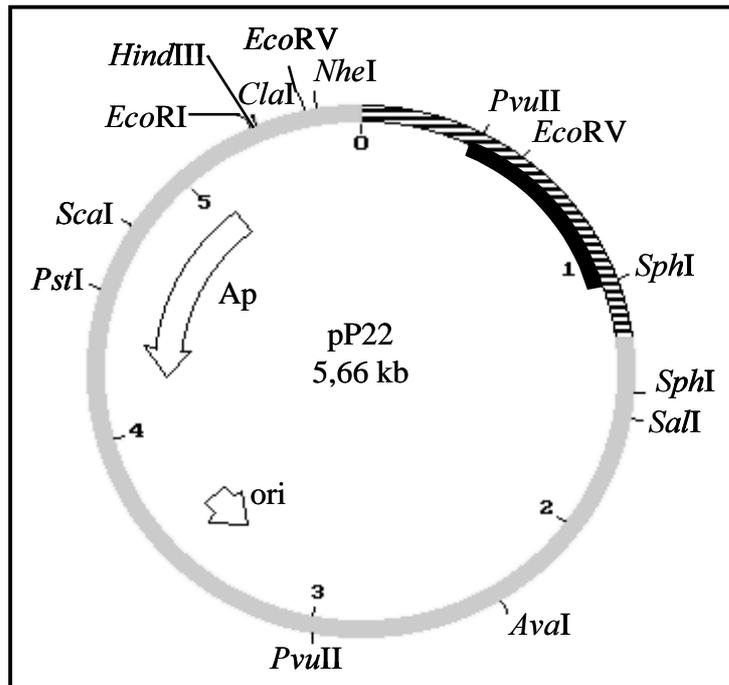
**Figura 3.2.2.** Influencia de la concentración de calcio añadido en la actividad de PelA. Se determinó la actividad lisa sobre ácido poligalacturónico y pectina de limón en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ .

### 3.2.2. Caracterización del plásmido recombinante

Se determinó a continuación el mapa físico del plásmido recombinante pP22 contenido en el clon en estudio (Fig. 3.2.3.). Dicho plásmido contiene un inserto de ADN de 2 Kb en la diana *Bam*HI del plásmido vector pBR322.

Para comprobar que el inserto contenido en pP22 pertenecía al genoma de *Paenibacillus* sp. BP-23, se realizó un experimento de hibridación Southern. Con este

motivo se fabricó una sonda con el fragmento *PvuII-SphI* de 655 pb del inserto del plásmido pP22. Dicha sonda se hibridó frente al ADN total de *Paenibacillus* sp. BP-23, el ADN total de *Escherichia coli*, el plásmido pP22 y el plásmido pBR322, digeridos todos ellos con *PvuII* y *SphI*, los mismos enzimas de restricción utilizados para obtener la sonda.



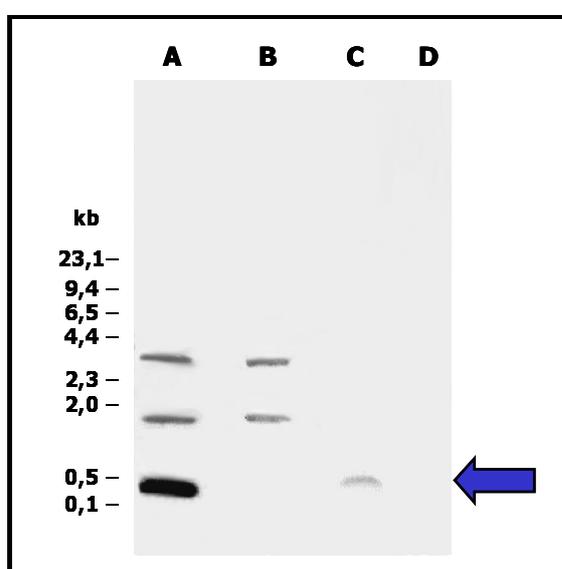
**Figura 3.2.3.** Mapa físico del plásmido pP22. El fragmento rayado corresponde al inserto, el negro corresponde al ADN utilizado como sonda en los ensayos de hibridación y el gris, al vector de clonación pBR322.

Se observó señal de hibridación frente al ADN de *Paenibacillus* sp. BP-23 y al plásmido pP22, mientras que el ADN de *Escherichia coli* no dio señal de hibridación con la sonda (Fig. 3.2.4.).

La hibridación frente al ADN de *Paenibacillus* sp. BP-23 dio lugar a una única banda, que mostraba un tamaño de 655 pb que coincidía con el de la sonda. Sin embargo, la hibridación de la sonda frente al ADN del plásmido pP22 dio sorprendentemente tres bandas, dos de las cuales no se esperaban. La banda más intensa coincidía en tamaño con el de la sonda y con la banda de hibridación del ADN de *Paenibacillus* sp. BP-23. Las otras dos bandas, más débiles, presentaban un tamaño de

3,0 kb y de 1,4 kb. En la hibridación de la sonda frente pBR322 se observaron dos bandas débiles, de tamaño similar a las bandas de menor intensidad detectadas en la hibridación frente al plásmido pP22. Esto parecía indicar que en la fabricación de la sonda con la banda de 655 pb se produjo una pequeña contaminación de la misma por las otras dos bandas, provenientes de pBR322, presentes en el mismo gel.

Los resultados obtenidos confirmaron que el ADN contenido en el plásmido pP22 provenía del genoma de *Paenibacillus* sp. BP-23.



**Figura 3.2.4.** Hibridación del fragmento *PvuII* y *SphI* de 655 pb del plásmido pP22 frente al plásmido pP22 (A), el plásmido pBR322 (B), el ADN total de *Paenibacillus* sp. BP-23 (C), y el ADN total de *Escherichia coli* (D), digeridos todos ellos con los enzimas de restricción *PvuII* y *SphI*.

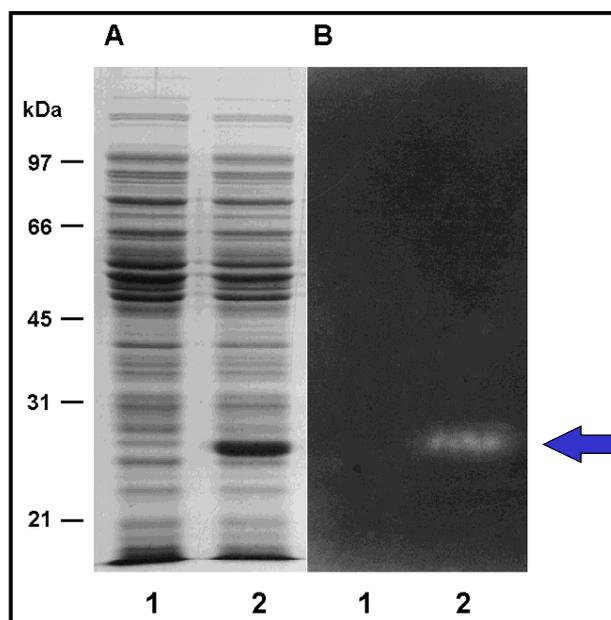
### 3.2.3. Determinación de las propiedades moleculares

#### 3.2.3.1. Determinación del peso molecular

Los extractos crudos del clon recombinante *Escherichia coli*/pP22 fueron analizados mediante geles de poliacrilamida al 13% con SDS y técnicas zimográficas. La tinción proteica de los geles mostró en los extractos de *E. coli*/pP22 una banda

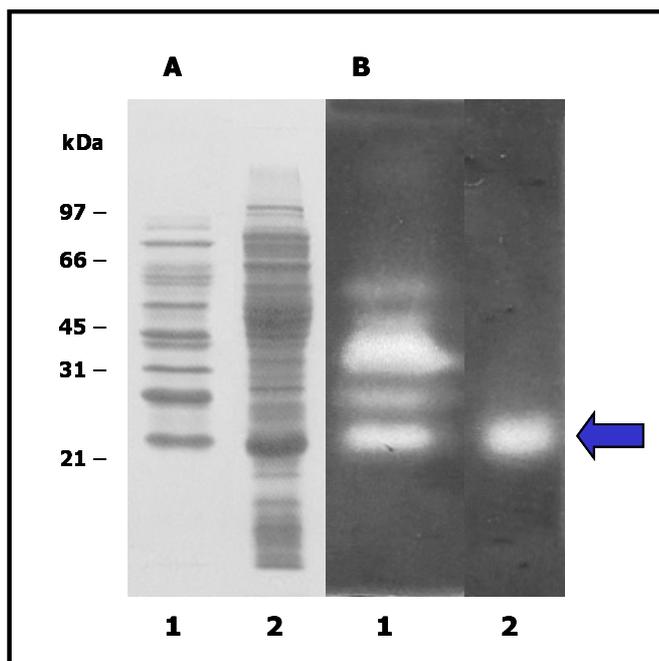
proteica prominente de tamaño molecular aparente de 25 kDa, que no se detectó en los extractos control de *E. coli*/pBR322 (Fig. 3.2.5.).

En los zimogramas de muestras paralelas se observó que la banda proteica de 25 kDa presentaba actividad degradadora de ácido poligalacturónico, mientras que en la muestra control no se observaron bandas de actividad (Fig. 3.2.5.). La banda de 25 kDa corresponde a la pectato liasa A.



**Figura 3.2.5.** Análisis de PelA en geles de poliacrilamida con SDS. (A) Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie. (B) Zimograma de actividad sobre ácido poligalacturónico. Extractos crudos de *E. coli*/pBR322 (1) y *E. coli*/pP22 (2).

Se analizaron a continuación mediante técnicas zimográficas los sobrenadantes de cultivo de *Paenibacillus* sp. BP-23 en medios suplementados con pectina, conjuntamente con extractos del clon recombinante *E. coli*/pP22 (Fig. 3.2.6.). Estos análisis mostraron que la pectato liasa A es la banda de actividad pectinasa de tamaño menor secretada por *Paenibacillus* sp. BP-23.

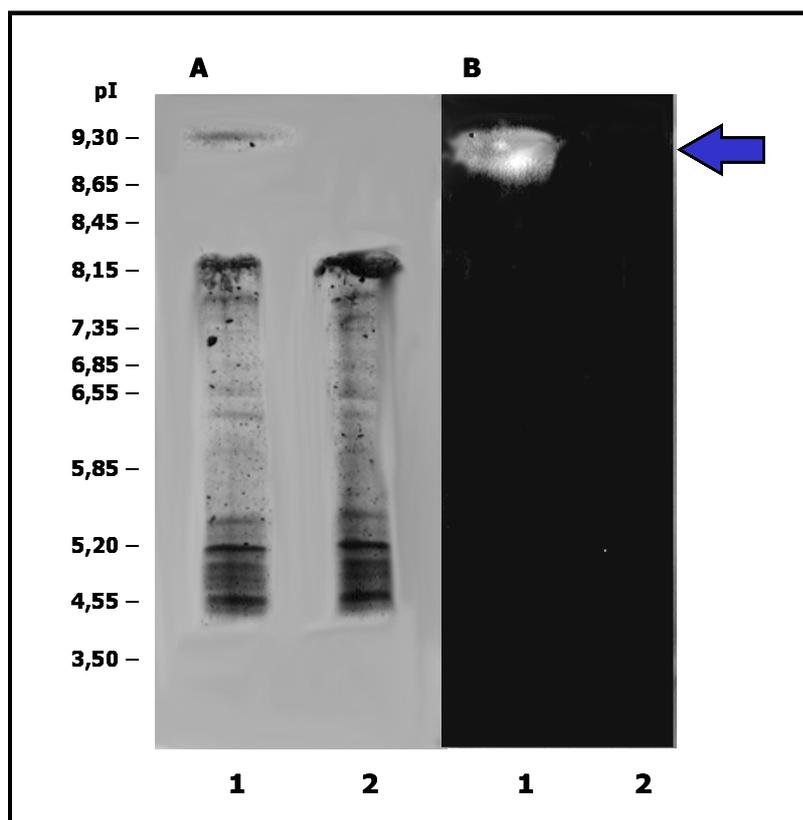


**Figura 3.2.6.** Análisis en geles de poliacrilamida con SDS del sobrenadante de cultivo de *Paenibacillus* sp. BP-23 (1) y extractos crudos de *E. coli*/pP22 (2). (A) Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie. (B) Zimograma de actividad sobre pectina a pH 10.

### 3.2.3.2. Determinación del punto isoeléctrico

Las muestras de extractos crudos de *E. coli*/pP22 y *E. coli*/pBR322 fueron analizadas en geles de isoelectroenfoque. Los geles fueron teñidos para proteínas y paralelamente fueron revelados como zimogramas.

El análisis de los extractos de *E. coli*/pP22 mostró una banda proteica intensa que migró junto al límite de pH superior del gel, que era pH 9 (Fig. 3.2.7.). La banda mostró actividad pectinasa en los zimogramas indicando que la pectato liasa A presenta un punto isoeléctrico igual o superior a 9. La muestra control no mostró bandas de actividad (Fig. 3.2.7.).



**Figura 3.2.7.** Análisis de PelA en geles de isoelectroenfoque. (A) Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie. (B) Zimograma de actividad sobre ácido poligalacturónico. Extractos crudos de *E. coli*/pP22 (1) y *E. coli*/pBR322 (2).

### 3.2.4. Secuenciación y caracterización del gen *pelA*

La secuencia de nucleótidos del gen *pelA* se determinó mediante la secuenciación automática de 1.214 pb del inserto de ADN exógeno contenido en el plásmido recombinante pP22. La secuencia obtenida fue depositada en la base de datos EMBL con el número de acceso AJ237980.

Se encontró una pauta abierta de lectura de 666 pb que codificaba una proteína de 222 aminoácidos. A una distancia de 8 nucleótidos del codón de inicio ATG se halló la secuencia AAGGGAGGA, similar a la región consenso de unión al ribosoma (Shine-Dalgarno). En posición 5' al gen estructural se encontraron secuencias con características similares a las regiones promotoras reconocidas por la subunidad  $\sigma^A$  de la ARN polimerasa de *Bacillus subtilis*. En concreto se encontraron las secuencias -35 (TAGACA) y -10 (TCAAAT) situadas a 50 y 27 nucleótidos del codón de inicio,

---

respectivamente. En posición 3' al gen estructural se encontró una repetición invertida de 20 pb que podría actuar como terminador de la transcripción (Fig. 3.2.8.).

El gen de la pectato liasa codifica una proteína de 222 aminoácidos con peso molecular y punto isoeléctrico deducidos de 23.223,2 Da y 9,28, respectivamente (<http://bo.expasy.org/tools/protparam.html>), en concordancia con el peso molecular y pI calculados a partir del análisis electroforético del enzima. El enzima presenta una región N terminal de 25 aminoácidos con las características típicas de los péptidos señal de *Bacillus* (Nagarajan, 1993; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/index.html#submission>). De esta forma, el enzima muestra dos residuos cargados positivamente en el extremo N terminal, seguidos de un tramo hidrófobo de 18 aminoácidos. Este núcleo hidrofóbico está seguido por un residuo de prolina, que favorece el giro  $\beta$ , y una secuencia de cuatro alaninas similar a las secuencias reconocidas por la peptidasa señal bacteriana (Von Heijne, 1986; Tjalsma *et al.*, 2000), que cortaría el enlace entre las dos últimas alaninas.

CAG	GCT	CCG	TAC	AAG	GGG	TGA	GCC	CGC	AGG	GTG	CCT	<u>GTA</u>	<u>GAC</u>	<u>AAG</u>	<u>CCA</u>	<u>GCG</u>	52
-35																	
<u>GCT</u>	<u>TGT</u>	<u>TTA</u>	<u>TCA</u>	<u>AAT</u>	TAC	TTA	AAT	<u>TAA</u>	<u>GGG</u>	<u>AGG</u>	<u>ATG</u>	TTG	ATG	<b>ATG</b>	AAA	AAA	103
-10																	
R.B.S.																	
ATG	TTA	ACG	CTC	TTG	CTG	TCT	GCC	GGT	CTT	GTT	GCT	TCC	ATA	TTT	GGT	GTA	154
<b>M</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	20
ATG	CCT	GCC	<u>GCG</u>	<u>GCT</u>	GCG	CCA	ACC	GTC	GTC	AAT	TCA	ACG	ATC	GTT	GTA	CCG	205
<b>M</b>	<b>P</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>P</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>P</b>	<b>V</b>	37
AAG	GGC	ACG	ACC	TAT	GAT	GGA	CAG	GGG	AAA	ACC	TTT	GTA	GCG	AAT	CCC	TCT	256
<b>K</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>T</b>	<b>F</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	54
ACA	TTA	GGT	GAC	GGT	TCT	CAA	GCG	GAG	AAT	CAG	AAG	CCT	GTA	TTC	CGG	CTG	307
<b>T</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>E</b>	<b>N</b>	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>V</b>	<b>F</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	71
GAA	GCA	GGG	GCA	ACT	TTG	AAA	AAT	GTT	ATT	ATT	GGT	GCA	CCC	GCA	GCG	GAT	358
<b>E</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>N</b>	<b>V</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>P</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	88
GGT	GTG	CAT	TGT	TAC	GGC	AGC	TGT	AAT	ATT	TCC	AAC	GTT	GTA	TGG	GAA	GAT	409
<b>G</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>C</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>C</b>	<b>N</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>W</b>	<b>E</b>	<b>D</b>	105
GTA	GGC	GAG	GAT	GCA	TTG	ACA	CTG	AAA	TCA	TCA	GGA	ACC	GTT	AAT	ATT	ACC	460
<b>V</b>	<b>G</b>	<b>E</b>	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>N</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	122
GGC	GGA	GCA	GCG	TAT	AAG	GCT	TAC	GAT	AAA	GTG	TTT	CAG	ATG	AAC	GCT	TCG	511
<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>Y</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>Y</b>	<b>D</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>F</b>	<b>Q</b>	<b>M</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	139
GGT	ACG	ATT	AAT	ATC	AAA	AAC	TTC	CGT	GCG	GAT	GAT	ATC	GGC	AAG	CTG	GTG	562
<b>G</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>N</b>	<b>I</b>	<b>K</b>	<b>N</b>	<b>F</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	156
CGG	CAA	AAT	GGA	GGA	ACC	TCC	TAT	GCG	GTT	AAC	ATG	ACA	CTG	GAT	AAT	TCC	613
<b>R</b>	<b>Q</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	173
AAC	ATA	TCC	AAC	GTG	AAG	GAT	TCC	ATT	ATG	CGC	ACG	GAC	AGC	AGT	GTA	TCT	664
<b>N</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>M</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	190
CAA	GGG	AAG	ATC	ACG	AAC	ACA	CGT	TAC	TCC	AAA	GTG	CCA	ACG	CTG	TTC	AAG	715
<b>Q</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>P</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>F</b>	<b>K</b>	207
GGC	TTT	GCT	TCA	GGC	AAG	ACG	AGC	CAG	TCC	<u>GGA</u>	<u>AAT</u>	<u>ACA</u>	<u>CAG</u>	<u>TAT</u>	<u>TAA</u>	<u>GCG</u>	766
<b>G</b>	<b>F</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>Q</b>	<b>Y</b>	<b>stop</b>	222	
<u>ACG</u>	CTT	GCA	GTA	AAA	AAT	AAA	GAA	GCG	GCT	GAA	GTT	CAA	GTA	CCA	CCT	GCT	817
CAG	CCG	TTG	AGG	AGA	<u>ACC</u>	<u>AAA</u>	<u>TAA</u>	<u>AAC</u>	<u>GGG</u>	<u>ATG</u>	<u>AAC</u>	CAG	TCA	ACA	TGG	CCT	868
<u>CAT</u>	<u>CCC</u>	<u>GTT</u>	<u>TTG</u>	<u>ATT</u>	<u>TGG</u>	<u>TTT</u>	<u>GTT</u>	<u>TGG</u>	<u>TTA</u>	<u>CAG</u>	<u>CCA</u>	<u>TGA</u>	<u>ATC</u>	<u>TGT</u>	<u>ATC</u>	<u>CAT</u>	919
ATC	GAA	TTA	CTT	<u>CTC</u>	<u>TCC</u>	<u>AGG</u>	<u>CAC</u>	<u>CTC</u>	<u>AAC</u>	GAA	CAG	TTT	GCC	TTG	GGA	TGG	970
AGC	AGC	AGA	ACC	GCT	ATC	CAA	GGA	GCC	GGA	TTT	GTT	CAT	GAT	CTC	ATA	AGC	1021
GGT	TTC	CTC	CAG	CAT	GCG	AGA	ATA	TTT	GAA	GGA	TAC	CAG	CGT	TTT	TCC	GGC	1072
TAC	AGA	TGG	ACG	GGT	TCC	TGC	CTC	GGC	AAC	GGG	TTT	TGC	CTT	GAT	AAA	GAA	1123
CAG	GTC	ACC	AAT	GGT	TCC	GGC	TTG	TTT	GCT	CAG	ATT	GGC	TTG	CCA	TTT	CAA	1174
CAG	TGC	ATT	TCC	GTT	CTC	CAT	CGT	ATA	ATA	ACT	GAC	CAG	A				1214

**Figura 3.2.8.** Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de PelA. Las hipotéticas regiones promotoras -10 y -35 y la región de unión al ribosoma (R.B.S.) se encuentran subrayadas. Se muestran de color morado los aminoácidos que ligarían calcio y de color naranja los aminoácidos básicos teóricamente relacionados con la catálisis. La repetición invertida de 20 pb se encuentra subrayada con una flecha. Se muestran subrayadas en negro las zonas correspondientes a los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y clonación de *pelA* en pET28a. Se encuentran subrayadas en rojo las zonas correspondientes a los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y clonación de *pelA* en los plásmidos lanzadera construidos (Apartado 3.4.2.). Se muestran sombreadas las zonas correspondientes a las dianas de restricción introducidas en los oligonucleótidos cebadores. En azul se muestran los aminoácidos de PelA. El hipotético lugar de corte por la peptidasa señal se indica con una flecha vertical.

La composición de aminoácidos de la peptato liasa A se muestra en la tabla 3.2.2. (<http://bo.expasy.org/tools/protparam.html>). El número de residuos cargados negativamente (Asp + Glu) es de 15 y el número de residuos cargados positivamente (Arg + Lys + His) es de 22.

**Tabla 3.2.2.** Composición de aminoácidos de la pectinasa PelA.

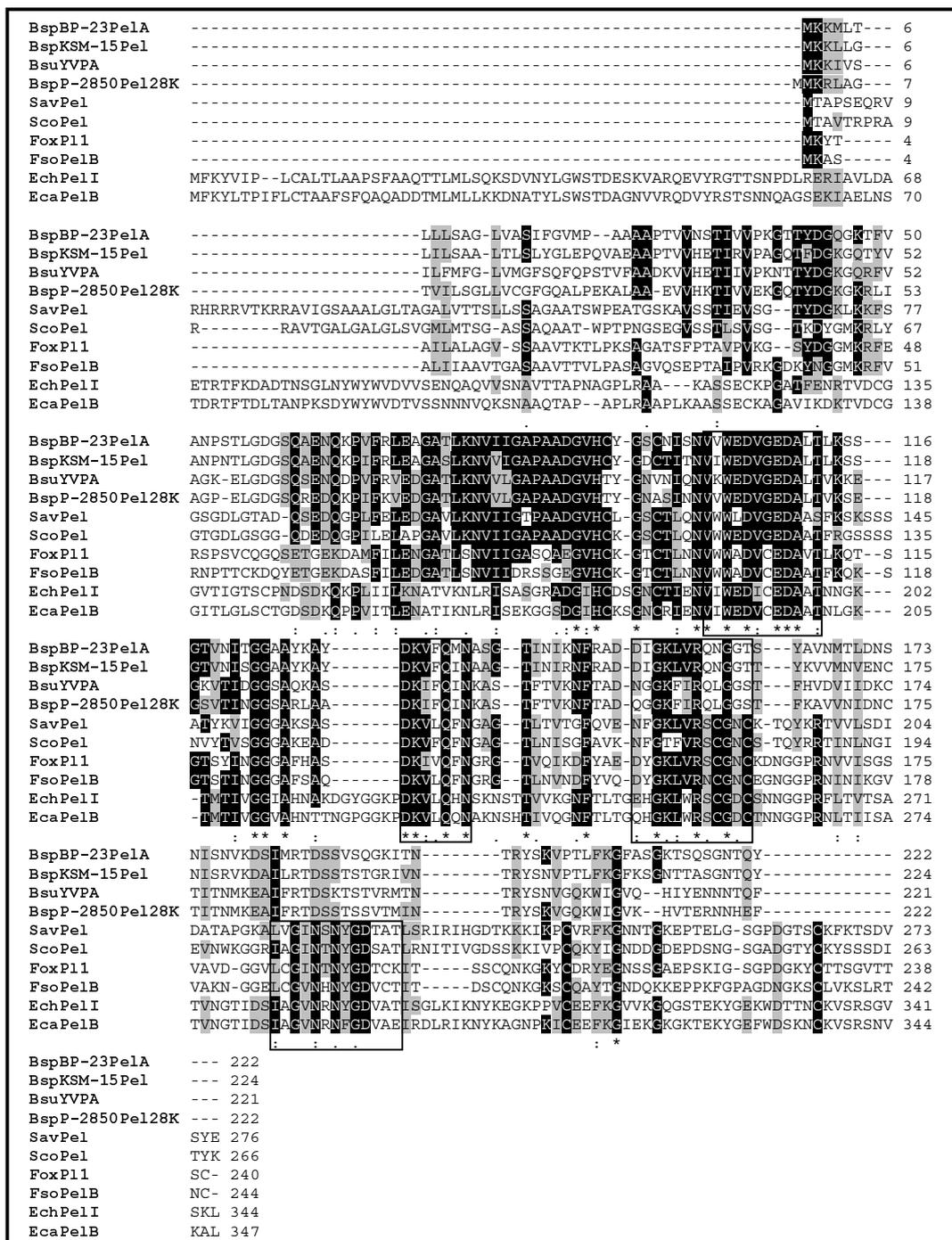
Aminoácidos	Nº de residuos	Composición (%)
Ala	21	9,5
Arg	5	2,3
Asn	17	7,7
Asp	11	5,0
Cys	2	0,9
Gln	8	3,6
Glu	4	1,8
Gly	23	10,4
His	1	0,5
Ile	12	5,4
Leu	13	5,9
Lys	16	7,2
Met	6	2,7
Phe	7	3,2
Pro	7	3,2
Ser	21	9,5
Thr	20	9,0
Trp	1	0,5
Tyr	7	3,2
Val	20	9,0

La secuencia de aminoácidos de PelA fue comparada con secuencias de proteínas contenidas en las bases de datos Swissprot y EMBL (Fig. 3.2.9.). Se encontró homología con las pectato liasas de la familia PL3, pero no se halló homología significativa con pectato liasas de otras familias. Los niveles de homología más elevados se hallaron con pectato liasas del género *Bacillus*, tales como la pectato liasa de *Bacillus* sp. KSM-15 (Hatada *et al.*, 2000) y la pectato liasa de *Bacillus* sp. P-2850 (spTREMBL Q8LOR5), que mostraron una identidad del 76 y 56%, respectivamente, con PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23. También se encontró homología alta con las pautas abiertas de lectura deducidas de los genes SCO1110 del genoma de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2002) y SAV683 de *Streptomyces avermitilis* (Omura *et al.*, 2001), que mostraron una identidad con el enzima clonado del 43 y 42%, respectivamente. Algunas pectato liasas de hongos fitopatógenos mostraron también homología elevada con el enzima clonado. De este modo P11 de *Fusarium oxysporum* (Huertas *et al.*, 1999), y PelD, PelC, PelB y PelA de *Fusarium solani* (Guo *et al.*, 1996, 1995a, b; González-Candelas y Kolattukudy, 1992) mostraron respectivamente

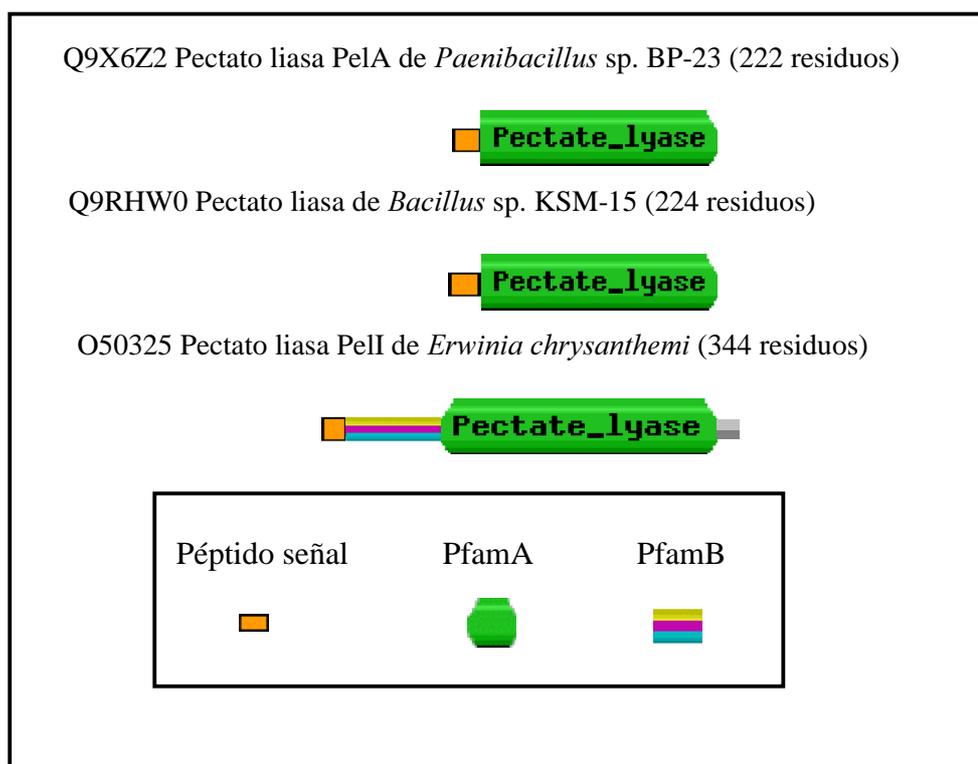
identidades del 41, 42, 40, 39 y 37% con PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23. El enzima también presentó homología, aunque inferior, con algunas pectato liasas de bacterias fitopatógenas tales como PelB de *Erwinia carotovora* (Heikinheimo *et al.*, 1995), Pel-3 de *Erwinia carotovora* (Liu *et al.*, 1994) y PelI de *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik *et al.*, 1997), que presentaron una identidad del 34, 33 y 31% con el enzima clonado, respectivamente. La comparación de secuencias mostró también que PelA es altamente homóloga (54% de identidad) a la proteína deducida del gen *yvpA* de *Bacillus subtilis* 168 (Kunst *et al.*, 1997), cuya función es desconocida.

La secuencia de aminoácidos de PelA contiene tres bloques de residuos conservados, propuestos como característicos de las pectato liasas de la familia PL3 (Shevchik *et al.*, 1997). Sin embargo, no se encontró un cuarto bloque conservado en esta clase de enzimas (Fig. 3.2.9.).

El análisis de los dominios proteicos de PelA con el programa Pfam indica que PelA presenta el dominio PF03211 (PfamA) común a las pectato liasas de la familia PL3 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.html>) (Fig. 3.2.10.). Este dominio abarca desde el aminoácido 26 al 221, es decir la totalidad de la proteína PelA madura. De forma similar, el análisis mediante el programa Prodom de NCBI (<http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom/current/html/home.php>) muestra el dominio ID: PD007605, que comprende del residuo 29 al 163 de PelA, presente en las pectato liasas de la familia PL3.



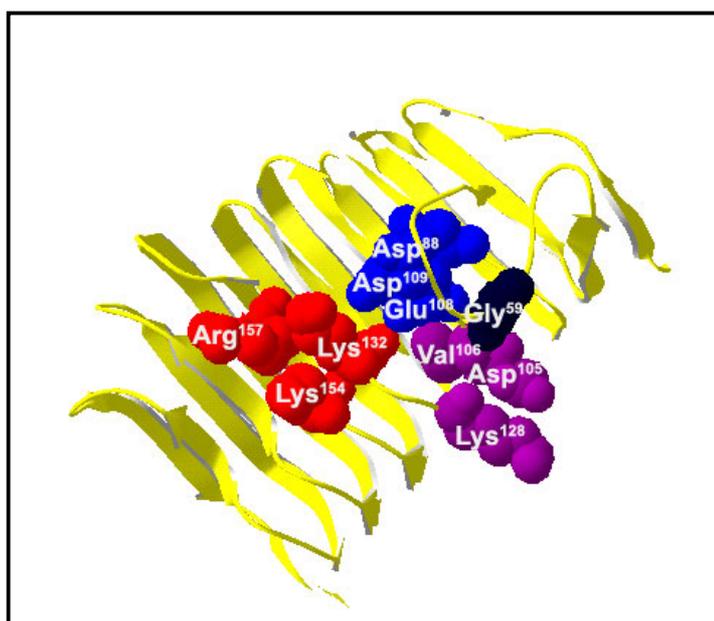
**Figura 3.2.9.** Alineamiento de aminoácidos de diferentes peptidato liasas pertenecientes a la familia PL3. El alineamiento fue realizado mediante el programa CLUSTAL W. Los asteriscos indican los aminoácidos idénticos y los puntos los residuos conservados. Los aminoácidos idénticos en al menos 6 secuencias están sombreados en oscuro y los aminoácidos homólogos en al menos 6 secuencias sombreados en claro. Los bloques de residuos conservados en las peptidato liasas de la familia PL3 han sido enmarcados con un recuadro. Las secuencias mostradas son: BspBP-23PelA, PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23; BspKSM-15Pel, Pel de *Bacillus* sp. KSM-15; BsuYvpA, YvpA de *Bacillus subtilis*; BspP-2850Pel28K, Pel28K de *Bacillus* sp. P-2850; SavPel, SAV683 de *Streptomyces avermitilis*; ScoPel, SCO1110 de *Streptomyces coelicolor*; FoxP11, P11 de *Fusarium oxysporum*; FsoPelB, PelB de *Fusarium solani*; EchPelI, PelI de *Erwinia chrysanthemi*; y EcaPelB, PelB de *Erwinia carotovora*.



**Figura 3.2.10.** Dominios estructurales de diferentes proteínas de la familia PL3.

A partir de la estructura descrita para la pectato liasa Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-15, determinada por análisis cristalográfico (Akita *et al.*, 2001), se generó el modelo estructural 3D teórico de PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23, utilizando para ello el programa SWISS-MODEL ([www.expasy.ch/swissmod/swiss-model.html](http://www.expasy.ch/swissmod/swiss-model.html)) (Schwede *et al.*, 2003) (Fig. 3.2.11.). Se observó una gran similitud con la estructura de la pectinasa Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-15. Similarmente a este enzima, la estructura de PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 consiste en una hélice  $\beta$  paralela hacia la derecha de 8 vueltas, con un largo bucle protuberante en un flanco de la hélice  $\beta$ . Al igual que Pel-15, PelA uniría al menos dos cationes calcio, uno de ellos esencial para la catálisis (neutralizando las cargas negativas del sustrato ácido) y un segundo con función estructural. Por comparación con Pel-15, los ligandos del ión calcio esencial para la catálisis serían los residuos Asp<sup>88</sup>, Glu<sup>108</sup> y Asp<sup>109</sup>, mientras que los ligandos del catión calcio involucrado en la estabilización de la estructura del enzima serían los oxígenos de los residuos Asp<sup>105</sup>, Val<sup>106</sup>, Lys<sup>128</sup> y 3 moléculas de H<sub>2</sub>O, una de las cuales interaccionaría con el oxígeno carbonílico del residuo Gly<sup>59</sup> (Akita *et al.*, 2001). Por comparación con Pel-15, los residuos del centro activo involucrados directamente en la

catálisis de PelA serían Arg<sup>157</sup>, Lys<sup>154</sup> y Lys<sup>132</sup>; correspondiendo el residuo de arginina con el abstrayente de protones catalítico, mientras que los otros dos mediarían la interacción con el sustrato y estabilizarían el intermediario de la reacción (Fig. 3.2.8., Fig. 3.2.11.).



**Figura 3.2.11.** Modelo tridimensional teórico de la pectato liasa PelA. Se muestran de color morado, negro, y azul los residuos que se unirían al calcio; y de color rojo los residuos básicos teóricamente relacionados con la catálisis.

### 3.2.5. Purificación de PelA

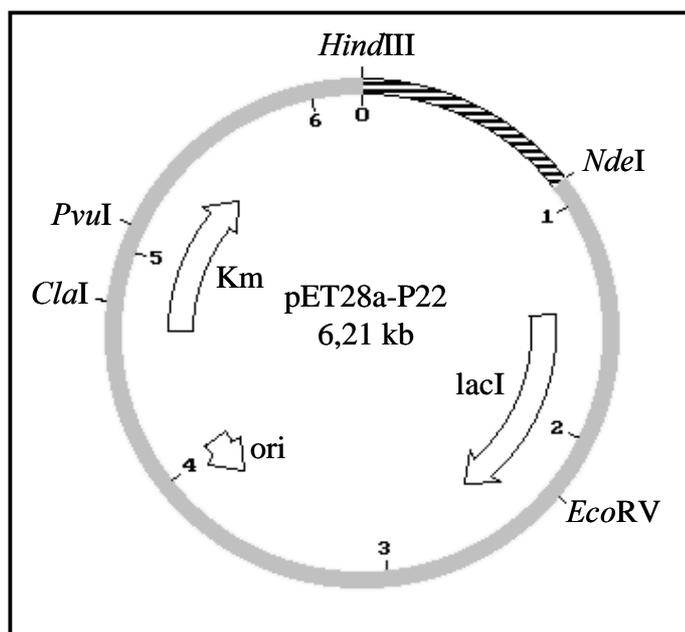
Con el fin de caracterizar bioquímicamente el enzima clonado se procedió a su purificación. Para facilitar dicho proceso se adicionó al enzima, mediante técnicas de ingeniería genética, una cola de histidinas que posibilitara la purificación por cromatografía de afinidad a níquel.

Inicialmente, con el objeto de clonar *pelA* en el vector de expresión pET28a, a partir de colonias de *Paenibacillus* sp. BP-23 se amplificó un fragmento de ADN que contenía la región codificadora de PelA desprovista de péptido señal, flanqueada por las dianas de restricción *NdeI* y *HindIII*. La tabla 3.2.3. muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados, cuya localización en la secuencia del plásmido pP22 se

indica en la figura 3.2.8. El fragmento amplificado de 609 pb se clonó en el vector de expresión pET28a entre las dianas *NdeI-HindIII*, dando lugar al plásmido pET28a-P22 (Fig. 3.2.12.), que fue introducido por transformación en *Escherichia coli* BL21(DE3). La secuenciación del ADN recombinante del plásmido pET28a-P22 mostró que se había añadido una cola de histidina fusionada en pauta con la proteína madura PelA, desprovista del péptido señal. La construcción se diseñó para que la eliminación con trombina de la cola de histidinas diese lugar a la proteína madura con el mínimo número posible de aminoácidos adicionales en el extremo N terminal, en concreto únicamente cinco aminoácidos adicionales (Gly, Ser, His, Met y Ala).

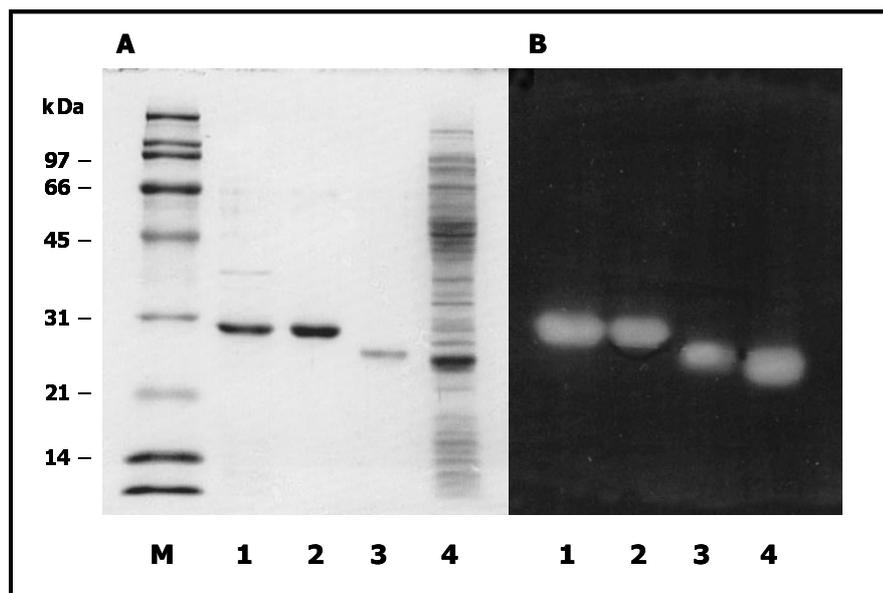
**Tabla 3.2.3.** Oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen *pelA*. La dianas de restricción se encuentran resaltadas en negrita. Los nucleótidos modificados sobre la secuencia original para introducir las dianas se encuentran subrayadas.

Nombre	Secuencia de nucleótidos	Diana de restricción
FWP221	5' - <b>CCCATATG</b> GCGCCAACCGTC- 3'	<i>NdeI</i>
BKP221	5' -GCA <b>AGCT</b> TTAATACTGTGTATTTCCG- 3'	<i>HindIII</i>



**Figura 3.2.12.** Mapa físico del plásmido pET28a-P22. El fragmento rayado corresponde al inserto, el gris corresponde al vector de expresión pET28a.

La cepa recombinante *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET28a-P22 fue cultivada en un litro de medio LB suplementado con kanamicina. Cuando el cultivo alcanzó una  $A_{600}$  entre 0,5 y 0,6, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó durante 2,5 h más. A continuación se recogieron las células, se obtuvo el extracto celular y se procedió a la purificación de la pectato liasa mediante el sistema  $Ni^{2+}$ -NTA-agarosa (apartado 2.6.2.) y a la posterior eliminación de la cola de histidina (apartado 2.6.3.). Las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de purificación se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y técnicas zimográficas (Fig. 3.2.13.). Los geles mostraron que la pectato liasa A aislada por este método presentaba un excelente grado de pureza y evidenciaron el elevado rendimiento obtenido por el proceso de purificación.



**Figura 3.2.13.** Purificación de PelA. Análisis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS. (A) Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie. (B) Zimograma de actividad pectinasa. (1) Extracto de *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-P22, (2) PelA purificada con la cola de histidinas, (3) PelA purificada sin la cola de histidinas, (4) Extracto de *E. coli*/pP22. (M) marcador de peso molecular.

### 3.2.6. Caracterización enzimática de PelA

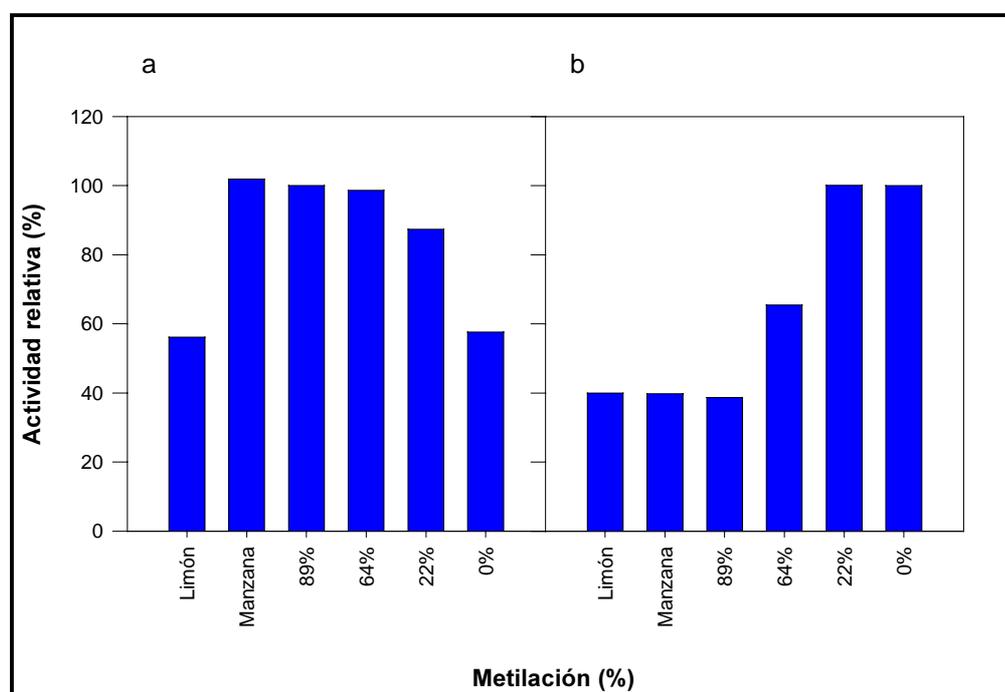
#### 3.2.6.1. Estudio de la influencia del grado de metilación de la pectina en la actividad enzimática

Una vez purificada la proteína se procedió a su caracterización enzimática. Se estudió en primer lugar la influencia del grado de metilación de la pectina en la actividad del enzima. Para ello se determinó la actividad liasa a pH 10 sobre sustratos de diferente grado de metilación. En concreto se ensayaron: ácido poligalacturónico (sin metilar), pectina de limón del 22%, 64% y 89% de metilación, pectina de manzana del 68% de metilación y pectina de limón del 71% de metilación.

Cuando los sustratos, previamente a la realización de los ensayos de actividad, permanecieron en contacto con tampón a pH 10 periodos de tiempo superiores a una hora, PelA mostró una actividad muy similar sobre todos ellos, aunque con ligera preferencia por los sustratos altamente metilados (Fig. 3.2.14.a.). Por el contrario, cuando los sustratos estuvieron en contacto con tampón a pH 10 durante periodos de

tiempo inferiores a 10 min, PelA mostró clara preferencia por sustratos sin metilar o poco metilados, presentando máxima actividad sobre ácido poligalacturónico y pectina del 22% de metilación (Fig. 3.2.14.b.). Estos resultados indican que tal como sugieren Brown *et al.*, 2001, la determinación de actividad pectinasa a pH alcalinos sobre sustratos metilados puede dar lugar a conclusiones falsas, al sufrir dichos sustratos la desmetilación espontánea si son almacenados en condiciones alcalinas por periodos de tiempo superiores a 10 min.

Para evitar datos erróneos de actividad sobre sustratos metilados, en lo sucesivo los sustratos fueron mezclados con los tampones a pH 10 inmediatamente antes de realizar los ensayos enzimáticos, de pocos minutos de duración. La mayor actividad de PelA sobre sustratos escasamente metilados indica que el enzima es una pectato liasa, aunque con una actividad anormalmente elevada sobre pectina de alto grado de metilación, ya que presenta sobre pectina del 89% de metilación el 40% de la actividad observada sobre ácido poligalacturónico.



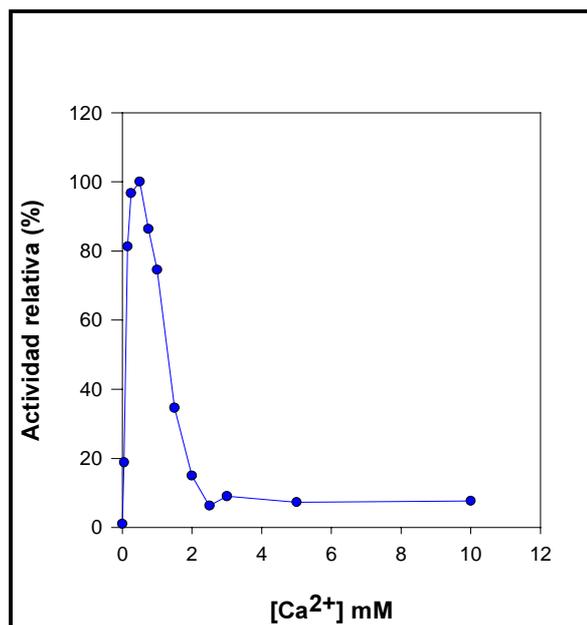
**Figura 3.2.14.** Influencia del grado de metilación de la pectina en la actividad de PelA. Se determinó la actividad liasa sobre ácido poligalacturónico, pectinas de limón del 22%, 64% y 89% de metilación, pectina de manzana del 68% de metilación y pectina de limón del 71% de metilación. Tiempo de contacto entre el sustrato y el tampón a pH 10 superior a 1 h (a) o inferior a 10 min (b).

El ácido poligalacturónico fue el sustrato que se utilizó a partir de este momento para continuar la caracterización de la pectato liasa A.

### 3.2.6.2. Determinación del efecto del ión calcio en la actividad

Con el fin de comprobar la concentración óptima de ión calcio para la actividad del enzima, se realizaron ensayos de actividad enzimática en presencia de  $\text{CaCl}_2$  a diferentes concentraciones.

Los resultados encontrados corroboraron que PelA necesita calcio añadido para la degradación de ácido poligalacturónico. La máxima actividad sobre dicho sustrato se alcanzó a una concentración 0,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , disminuyendo la actividad a concentraciones mayores. Se observó una actividad inferior al 8% de la máxima cuando la concentración de  $\text{CaCl}_2$  fue de 10 mM (Fig. 3.2.15.).



**Figura 3.2.15.** Influencia de la concentración de calcio en la actividad de PelA.

### 3.2.6.3. Determinación del pH óptimo

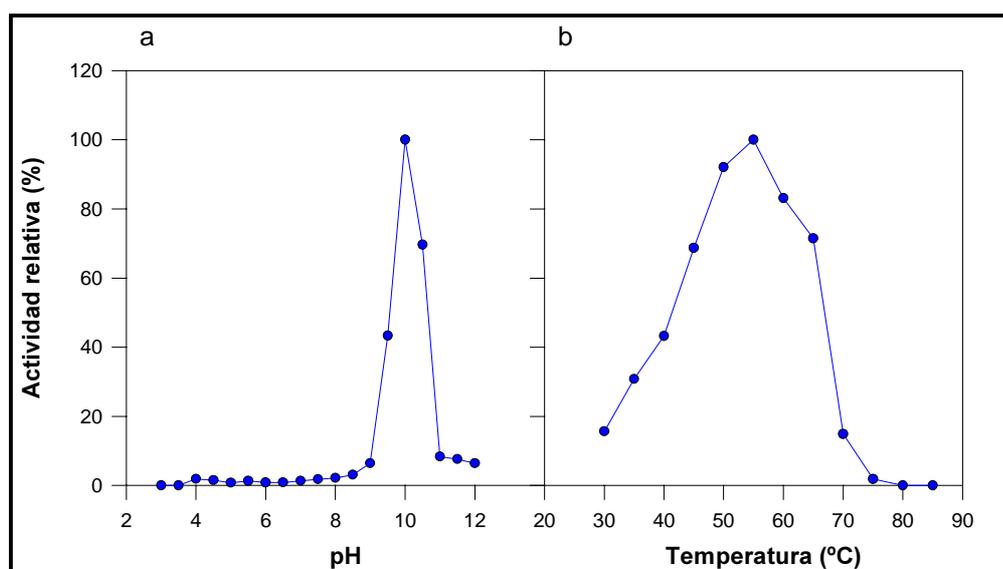
Se estudió el efecto del pH sobre la actividad pectato liasa del enzima purificado. Para ello se realizaron ensayos de actividad sobre ácido poligalacturónico a 55°C en el rango de pH entre 3,0 y 12,0 en presencia de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM.

El pH óptimo del enzima fue determinado en 10,0. PelA mostró una actividad aproximadamente del 40% de la máxima en el estrecho rango de pH entre pH 9,5 y 10,5. A pH inferior a 6,0 no se detectó actividad (Fig. 3.2.16.a.).

### 3.2.6.4. Determinación de la temperatura óptima

El efecto de la temperatura en la actividad enzimática se estudió en el rango de temperaturas de 30 a 85°C. Los ensayos se realizaron a pH 10, en el cual el enzima presentaba máxima actividad.

La temperatura óptima de la pectato liasa resultó ser 55°C. Se observó una actividad superior al 50% de la máxima en el intervalo comprendido entre los 40 y 65°C (Fig. 3.2.16.b.).



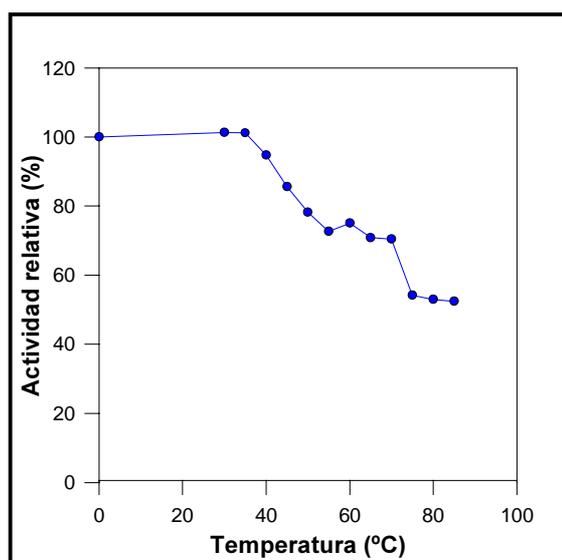
**Figura 3.2.16.** Efecto del pH (a) y de la temperatura (b) sobre la actividad enzimática de PelA.

### 3.2.6.5. Determinación de la termoestabilidad

El estudio del efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la pectato liasa A se realizó de tres maneras diferentes.

En primer lugar se valoró la estabilidad del enzima en el rango de temperaturas de 30 a 85°C. El enzima se incubó durante 1 h a pH 7 a dichas temperaturas, y a continuación se determinó la actividad pectato liasa residual en las condiciones óptimas de actividad.

PelA se mostró relativamente estable hasta los 75°C, observándose una actividad residual superior al 65% de la inicial tras incubación durante 1 h a temperaturas inferiores a dicha temperatura (Fig. 3.2.17.).

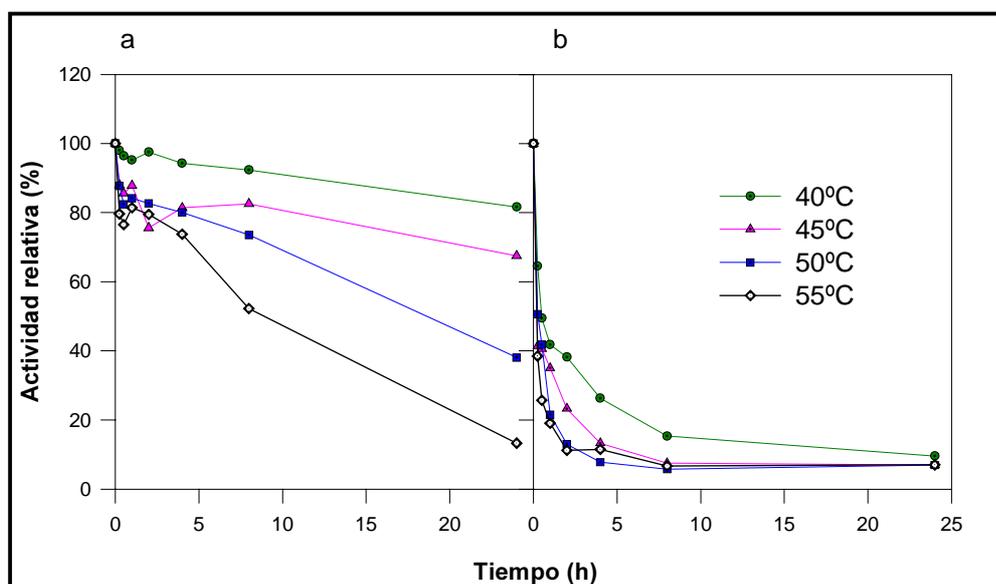


**Figura 3.2.17.** Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de PelA a pH 7.

A continuación, se estudió la estabilidad del enzima durante 24 h en las cuatro temperaturas más altas en las que se había observado que conservaba alrededor del 80% de actividad tras 1 h de incubación, es decir, 40, 45, 50 y 55°C. PelA se incubó a pH 7 o 10 a las cuatro temperaturas indicadas, se tomaron alícuotas a varios intervalos y se determinó la actividad enzimática residual.

En el ensayo de termoestabilidad a pH 7 se observó que el enzima permanecía básicamente estable durante 24 h a 40°C, mostrando alrededor del 90% de la actividad inicial tras 24 h de incubación a dicha temperatura. A 45°C el enzima mostró inactivación a partir de las 8 h de incubación, observándose tras 24 h una actividad superior al 70% de la inicial. A 50°C el enzima permaneció estable hasta las 4 h, mientras que a 55°C el enzima presentó inactivación a partir de las 2 h de incubación (Fig. 3.2.18.a.).

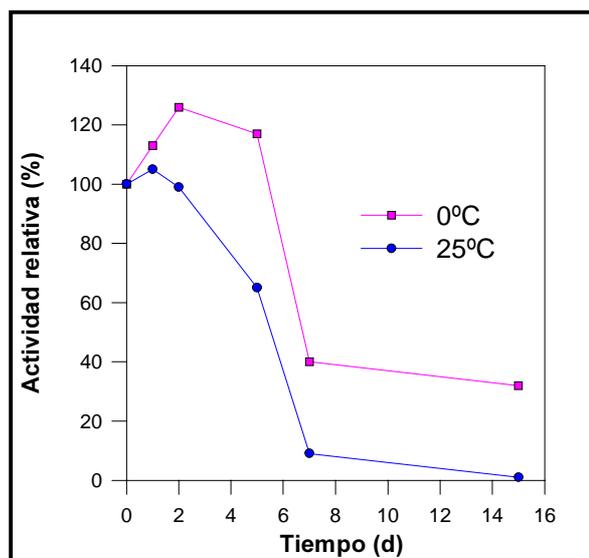
En el ensayo de termoestabilidad a pH 10 a todas las temperaturas estudiadas el enzima mostró importante inactivación desde los primeros momentos. A 40°C el enzima mostró el 40% de actividad inicial tras 1 h de incubación, mientras que en el resto de temperaturas ensayadas el enzima se inactivó más rápidamente. Tras 24 h de incubación en todas las condiciones ensayadas el enzima resultó inactivado casi por completo (Fig. 3.2.18.b.).



**Figura 3.2.18.** Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de PelA a pH 7 (a) y a pH 10 (b).

Por último, con el fin de estudiar la estabilidad del enzima a largo plazo en condiciones de almacenamiento, se evaluó la estabilidad de PelA a pH 7 durante 15 días a 0°C o a temperatura ambiente. Para estos análisis se utilizaron extractos crudos de *Escherichia coli*/pP22, en lugar del enzima purificado.

Se observó que a ambas temperaturas el enzima permaneció estable durante 2 días. A temperatura ambiente se observó una inactivación elevada del enzima a partir del segundo día de la incubación, en cambio a 0°C fue a partir del quinto día cuando se detectó dicha inactivación (Fig. 3.2.19.). Aún así, tras 15 días de incubación a 0°C el enzima mantuvo casi el 40% de la actividad inicial.

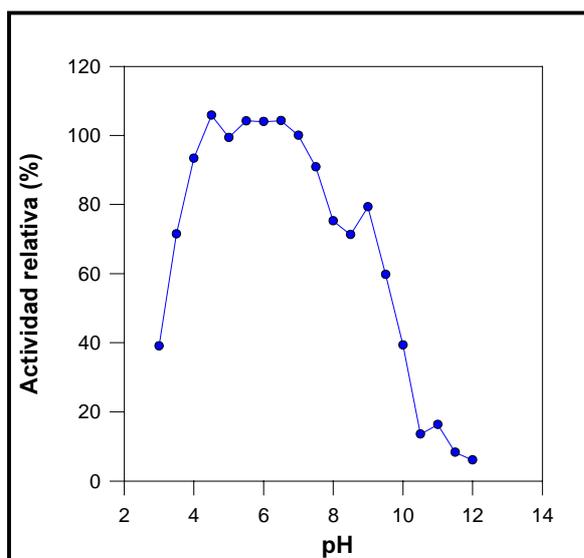


**Figura 3.2.19.** Efecto de la temperatura en la estabilidad de PelA a largo plazo.

### 3.2.6.6. Determinación del efecto del pH en la estabilidad

Después de estudiar la termoestabilidad de la pectato liasa A, y observando que a 40°C y pH 7,0 el enzima era estable durante periodos inferiores a un día, se estudió el efecto del pH en la estabilidad a dicha temperatura. El enzima se incubó durante 1 h a 40°C en tampones a diferentes pH entre 3,0 y 12,0, y posteriormente se midió la actividad residual.

El enzima se mostró estable en el rango de pH entre 4,0 y 7,5, presentando por tanto la máxima estabilidad en el intervalo de pH ácido-neutro. A pH alcalinos no superiores a 10,0 el enzima retuvo más del 40% de la actividad inicial, mientras que a pH superiores a 10,0 el enzima se inactivó casi por completo (Fig. 3.2.20.).



**Figura 3.2.20.** Efecto del pH en la estabilidad de PelA.

### 3.2.6.7. Determinación del efecto de iones metálicos

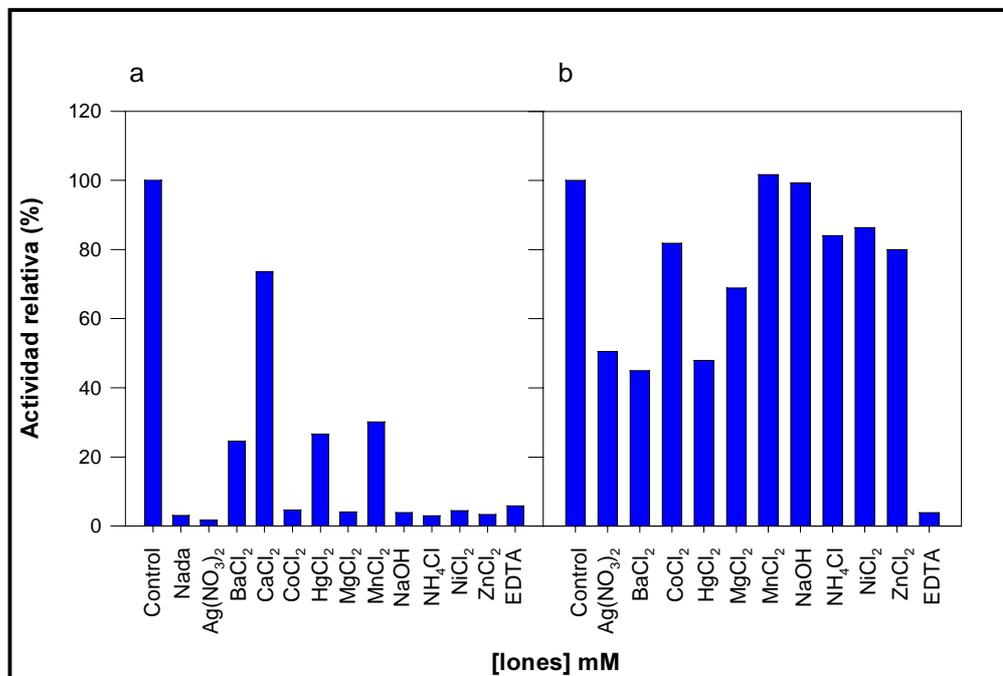
Con el fin de conocer la influencia de iones metálicos distintos del calcio sobre la actividad de la pectato liasa A, se realizaron ensayos de actividad en presencia de sales de estos iones a concentración 1 mM, sin adicionar calcio a la mezcla de ensayo.

Cuando el ensayo se realizó en presencia de bario, mercurio o manganeso se observó el 25, 27 o 30%, respectivamente, de la actividad máxima, detectada en presencia de calcio 0,5 mM (Fig. 3.2.21.a.). Sin embargo, con el resto de los iones ensayados no se detectó actividad pectato liasa. Estos resultados indican que ninguno de los iones evaluados puede sustituir al  $\text{Ca}^{2+}$ .

Con el fin de ensayar si los iones estudiados producían efecto inhibitor o estimulador de la actividad pectato liasa en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , se realizaron ensayos de actividad con la adición simultánea de  $\text{CaCl}_2$  y los iones metálicos a concentración 1 mM.

Se observó que bario, mercurio, plata y magnesio causaban una importante inhibición del enzima, detectándose una actividad del 45, 48, 51 y 68% del control, respectivamente. Zinc, cobalto, amoníaco y níquel causaron una pequeña inhibición (80, 82, 84 y 86% de actividad residual, respectivamente), mientras que manganeso y sodio

no inhibieron al enzima (Fig. 3.2.21.b). Tal como se esperaba, el EDTA inhibió la actividad de PelA.



**Figura 3.2.21.** Efecto de diferentes iones metálicos en la actividad PelA sobre ácido poligalacturónico en ausencia de calcio (a) y en presencia de calcio (b).

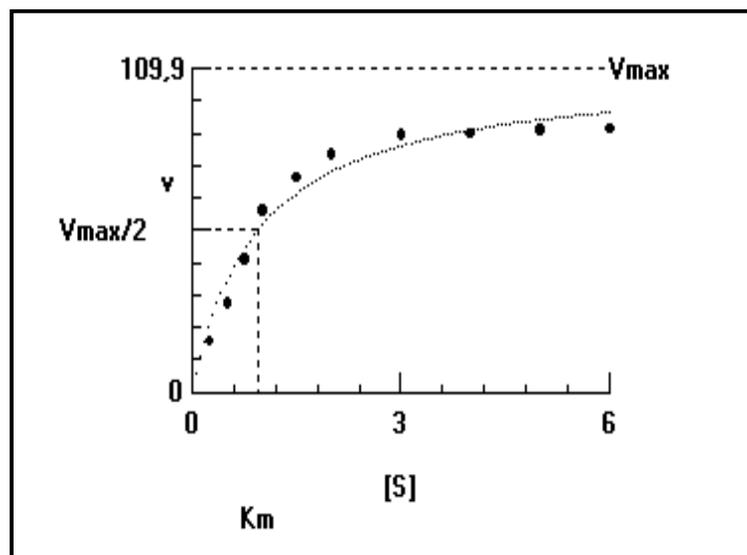
### 3.2.7. Determinación de las constantes cinéticas

Para determinar las constantes cinéticas del enzima se realizaron ensayos de actividad con una cantidad fija de PelA (0,26 µg) y cantidades crecientes de sustrato (ácido poligalacturónico) (Fig. 3.2.22.).

Las constantes cinéticas calculadas fueron:

$$V_{M\acute{a}x} = 109,9 \pm 13,36 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg de prote\acute{i}na}$$

$$k_M = 0,94 \pm 0,37 \text{ mg de sustrato}/\text{ml}$$



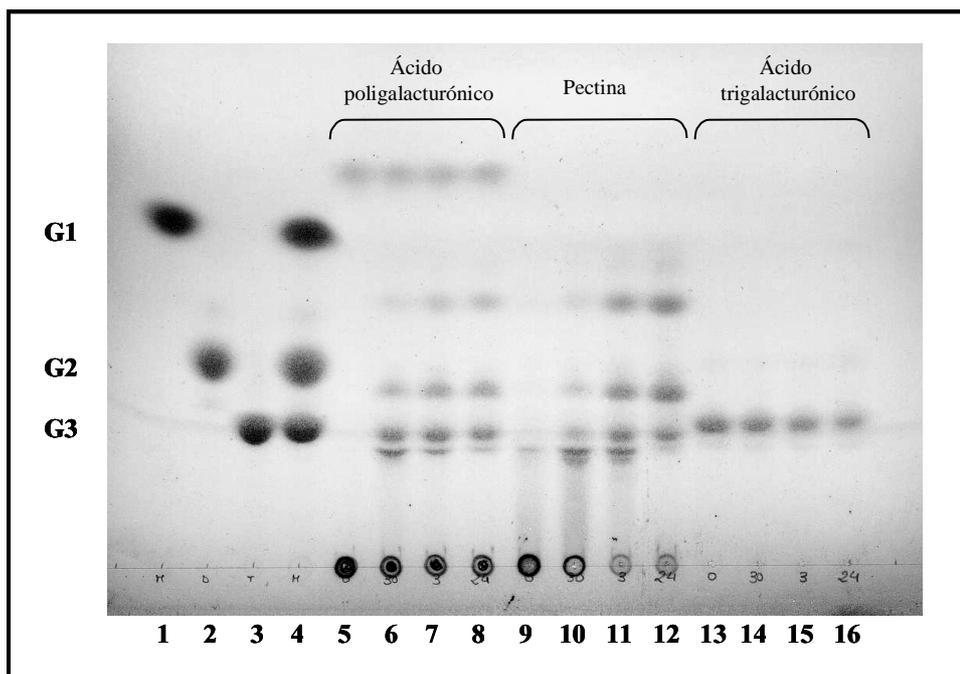
**Figura 3.2.22.** Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad de PelA.

### 3.2.8. Cromatografía en capa fina

Para estudiar el modo de acción de PelA sobre distintos sustratos, los productos liberados de los mismos por la acción enzimática fueron analizados por cromatografía en capa fina (TLC). Los sustratos ensayados fueron: ácido poligalacturónico, pectina de limón del 89 % de metilación y ácido trigalacturónico.

La mezcla reacción contenía tampón glicina 0,15 M pH 10,  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM, sustrato al 0,15% y 2,6  $\mu\text{g}$  de PelA. Las incubaciones se realizaron a 40°C durante 24 h y se extrajeron alícuotas de cada muestra a tiempo 0, 30 min, 3 h y 24 h.

El ácido poligalacturónico y la pectina de 89% de metilación originaron patrones similares de productos de reacción que consistían en una mezcla de oligosacáridos. En los dos casos aparecieron productos de movilidad intermedia entre los ácidos mono, di y trigalacturónico, que posiblemente se tratan de ácido digalacturónico y ácido trigalacturónico insaturados. Se liberaron también de los dos sustratos oligogalacturonatos de longitud superior. Por el contrario el enzima no causó degradación del ácido trigalacturónico. Estos resultados indicarían que la pectato liasa A tiene actividad endo, siendo por tanto una endopectato liasa.

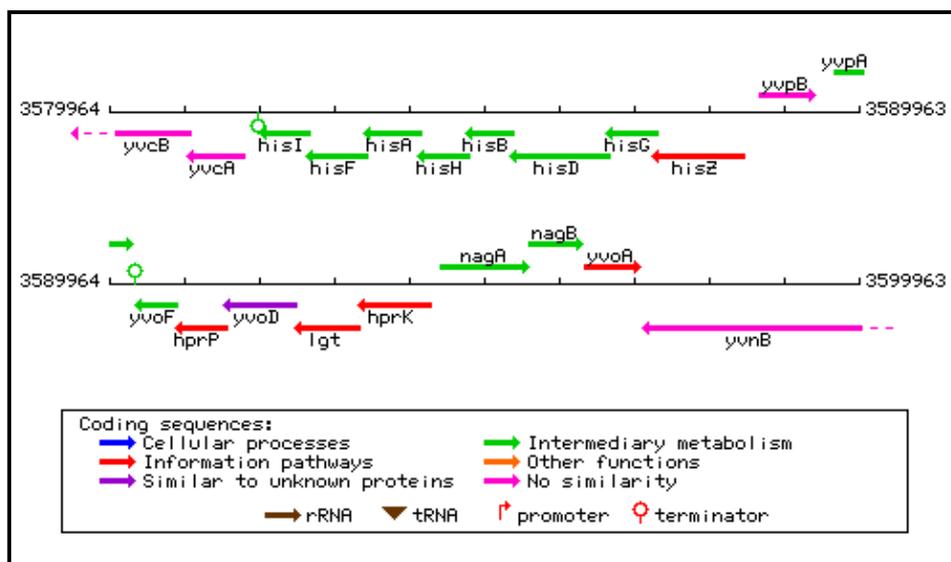


**Figura 3.2.23.** Análisis mediante cromatografía en capa fina de los productos de reacción de PelA. Los carriles 1, 2 y 3 muestran los patrones ácido monogalacturónico (G1), ácido digalacturónico (G2) y ácido trigalacturónico (G3), respectivamente. El carril 4 contiene la mezcla de los tres patrones. Productos de reacción del ácido poligalacturónico, carriles 5-8; pectina de limón del 89% de metilación, carriles 9-12; ácido trigalacturónico, carriles 13-16. Las incubaciones de los sustratos con el enzima se realizaron durante 0 min, carriles 5, 9 y 13; 30 min, carriles 6, 10 y 14; 3 h, carriles 7, 11 y 15; y 24 h, carriles 8, 12 y 16.

### 3.3. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PECTATO LIASA YvpA DE *Bacillus subtilis* 168

#### 3.3.1. Aislamiento y clonación de *yvpA*

La caracterización genética de la pectato liasa PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 mostró que el enzima presentaba homología con la pauta abierta de lectura deducida del gen *yvpA*, identificado en el genoma de *Bacillus subtilis* 168 (Kunst *et al*, 1997) (Fig. 3.3.1.). La hipotética proteína codificada por *yvpA* no había sido descrita hasta la fecha, pero dada su elevada homología (54% de identidad) con la pectato liasa A de *Paenibacillus* sp. BP-23, era probable que correspondiera a un enzima degradador de pectina similar. Con el fin de caracterizarlo se procedió a su clonación por amplificación por PCR a partir de la secuencia de *yvpA*.



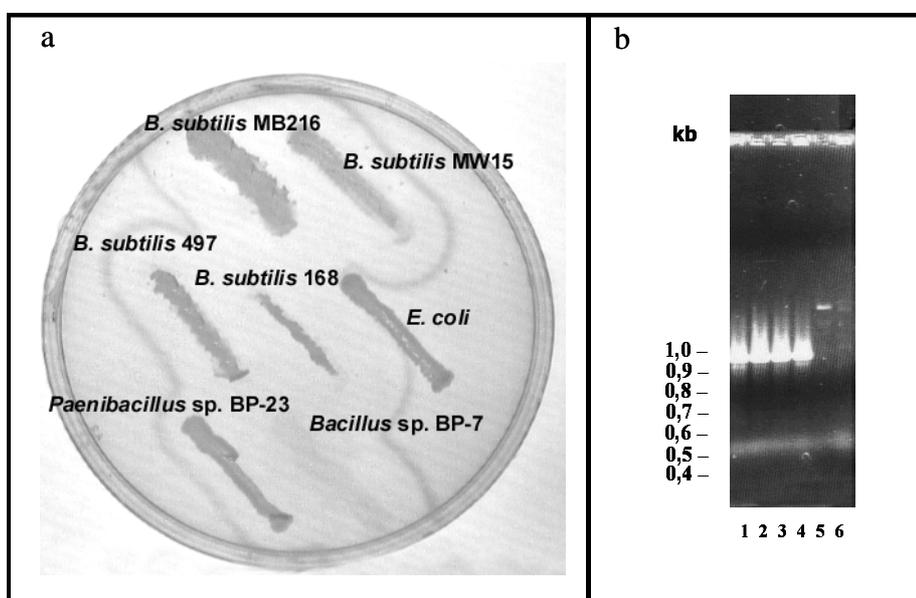
**Figura 3.3.1.** Localización de *yvpA* dentro del genoma de *Bacillus subtilis* 168 (Extraída de <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>).

Se diseñaron 2 cebadores de localización externa a la zona codificadora de *yvpA*, que se denominaron FW*yvpA* y BK*yvpA* (Tabla 3.3.1.). Dichos cebadores abarcaban la hipotética región codificante del gen *yvpA* y las putativas zonas promotora y terminadora.

**Tabla 3.3.1.** Oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen *yvpA*.

Nombre	Secuencia de nucleótidos
FW <sub>yvpA</sub>	5' -ATCACCCGGGAAGATCGATTC- 3'
BK <sub>yvpA</sub>	5' -CCGGAGCTCTTGTCCATAAG- 3'

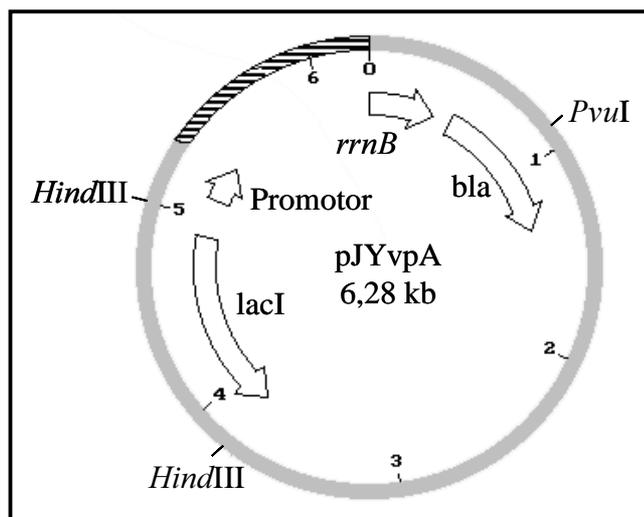
Como molde para la amplificación se utilizaron colonias de diferentes cepas de *Bacillus* y *Paenibacillus* que mostraban elevada actividad pectinolítica, tal como se observó tras su cultivo en placas de medio suplementado con ácido poligalacturónico (Figura 3.3.2.a.). Las cepas fueron *Bacillus subtilis* MB216, *Bacillus subtilis* MW15, *Bacillus subtilis* 497, *Bacillus subtilis* 168, *Bacillus* sp. BP-7 y *Paenibacillus* sp. BP-23. En todas las reacciones de amplificación con cepas de *Bacillus subtilis* se consiguió amplificar una única banda intensa de 980 pares de bases, del tamaño esperado. Por el contrario, cuando se utilizó como molde *Bacillus* sp. BP-7 o *Paenibacillus* sp. BP-23 se obtuvieron bandas de amplificación muy tenues de tamaño diferente al esperado (Fig. 3.3.2.b.).



**Figura 3.3.2.** Actividad pectinasas de las diferentes cepas de *Bacillus* sp. y *Paenibacillus* sp. (a) y análisis electroforético de las bandas de amplificación con cebadores específicos para el gen *yvpA* (b). 1, *Bacillus subtilis* MB216; 2, *Bacillus subtilis* MW15; 3, *Bacillus subtilis* 497; 4, *Bacillus subtilis* 168; 5, *Bacillus* sp. BP-7; 6, *Paenibacillus* sp. BP-23.

Los fragmentos amplificados con las cepas de *Bacillus subtilis* fueron secuenciados, mostrando elevada homología con la secuencia publicada del gen *yvpA*. El fragmento amplificado a partir de *Bacillus subtilis* 168 fue escogido para su estudio. Dicho fragmento, que presentaba los extremos romos al haber sido amplificado con la polimerasa Pfu, se ligó de manera no direccionada en el plásmido pJF118HE previamente linealizado con *SmaI* y se procedió a la transformación de *Escherichia coli* con la construcción obtenida. Los clones recombinantes que se obtuvieron fueron sembrados en placas de agar nutritivo suplementado con ácido poligalacturónico al 1%. Todos ellos produjeron un halo de degradación alrededor de las colonias, indicando la producción de pectinasas.

De entre ellos los clones obtenidos se escogió el clon *Escherichia coli*/pJYvpA. El clon contenía el plásmido pJYvpA, que incluía un inserto de 980 pb en la diana *SmaI* del vector pJF118HE (Fig. 3.3.3.).



**Figura 3.3.3.** Mapa físico del plásmido pJYvpA. El fragmento rayado corresponde al gen *yvpA* insertado en el vector de clonación pJF118HE en gris.

Con el fin de caracterizar el tipo de actividad pectinasa del enzima clonado, se realizaron ensayos de actividad liasa y de actividad hidrolasa, ambas actividades sobre pectina de limón y ácido poligalacturónico.

Los extractos crudos de *Escherichia coli*/pJYvpA mostraron actividad liasa pero no exhibieron actividad hidrolasa. La actividad liasa degradó los dos sustratos pécticos

ensayados, pectina y ácido poligalacturónico, pero sobre el primero fue más elevada (Tabla 3.3.2.).

Para conocer mejor la actividad enzimática de YvpA, se analizó la actividad hidrolítica sobre diferentes sustratos no pécticos: xilano de madera de abedul, xilano de espelta de avena y CMC (carboximetilcelulosa). Los resultados mostraron que el enzima no presenta actividad sobre los sustratos no pécticos ensayados (Tabla 3.3.2.).

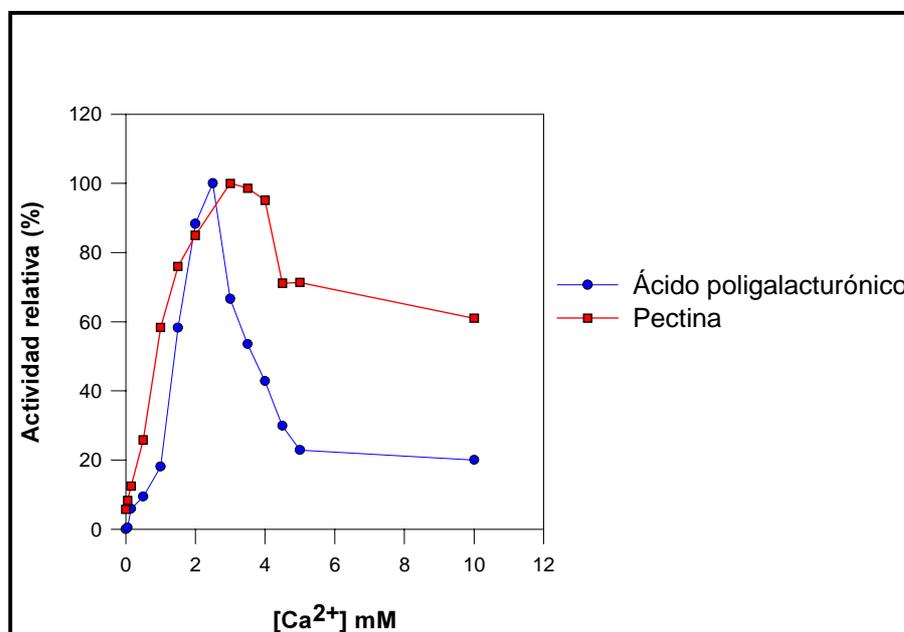
**Tabla 3.3.2.** Actividad hidrolasa y liasa de extractos crudos del clon recombinante *Escherichia coli*/pJYvpA sobre diferentes sustratos.

U/ml de cultivo	Pectina		Ácido poligalacturónico		CMC		Xilano de Abedul		Xilano de Avena	
	7	10	7	10	7	10	7	10	7	10
Actividad hidrolasa	0,00	$8 \times 10^{-5}$	0,00	$1,6 \times 10^{-4}$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Actividad liasa	0,01	1,77	0,00	0,07	-	-	-	-	-	-

La mayor actividad liasa sobre pectina que sobre ácido poligalacturónico parecía indicar que el enzima clonado era una pectina liasa. Sin embargo, para identificar correctamente la actividad del enzima clonado, era necesario estudiar el efecto de la concentración de calcio sobre la actividad enzimática.

Los resultados indicaron que YvpA necesitaba calcio añadido en la mezcla de ensayo para la degradación de ácido poligalacturónico. La máxima actividad se encontró a una concentración de  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM. A concentraciones mayores la actividad disminuía, obteniéndose una actividad inferior al 20% de la máxima a una concentración de  $\text{CaCl}_2$  10 mM (Fig. 3.3.4.). En cambio, para la degradación de pectina no fue necesaria la adición de calcio en la mezcla de ensayo, aunque la actividad sin calcio añadido fue muy baja. La adición de dicho ión producía un aumento de la actividad sobre pectina, alcanzándose la máxima actividad a una concentración 3 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Al igual de lo descrito con PelA, cuando se adicionó EDTA 1 mM a la mezcla de reacción no se detectó actividad ni sobre pectina ni sobre ácido poligalacturónico,

indicando un requerimiento absoluto de calcio para la actividad de YvpA sobre sustratos pécticos. Por lo tanto se concluyó que YvpA era una pectato liasa.



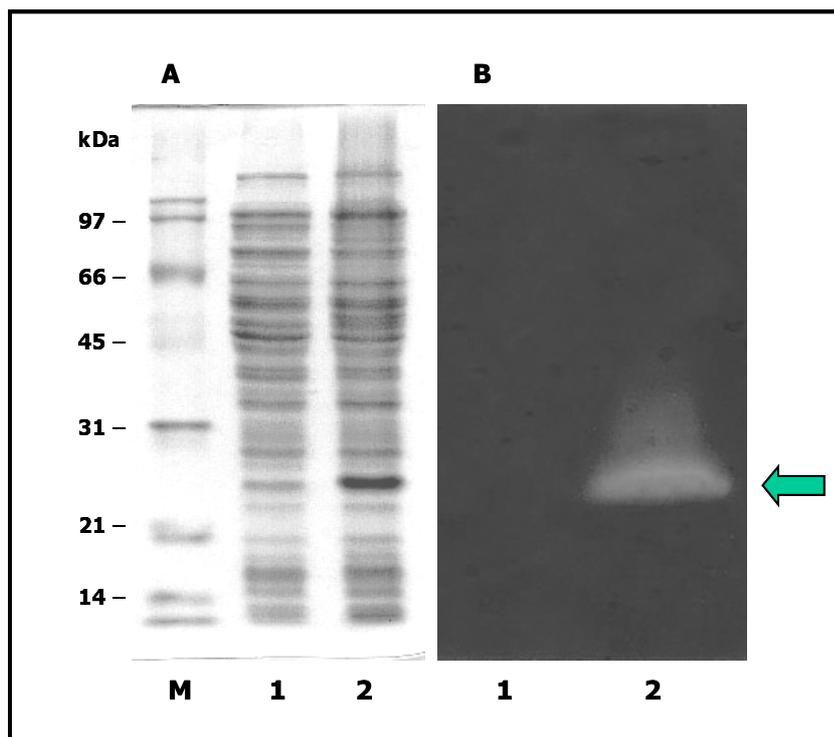
**Figura 3.3.4.** Influencia de la concentración de calcio añadido en la actividad de YvpA. Se determinó la actividad sobre ácido poligalacturónico y pectina de limón en presencia de diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub>.

### 3.3.2. Determinación de las propiedades moleculares

#### 3.3.2.1. Determinación del peso molecular

Los extractos crudos de *E. coli*/pJYvpA fueron analizados en geles de poliacrilamida al 12% con SDS. Se determinó tanto el peso molecular mediante la tinción con Azul Brillante de Coomassie como la actividad pectinasa mediante zimogramas.

Cuando los geles fueron revelados para proteínas se observó una banda prominente de unos 25 kDa en los extractos crudos de *E. coli*/pJYvpA, que no se detectó en los extractos control de *E. coli*/pJF118HE (Fig. 3.3.5.). En los zimogramas de muestras paralelas se observó que la banda proteica de 25 kDa presentaba actividad pectinasa, no observándose bandas de actividad en la muestra control (Fig. 3.3.5.). La banda de 25 kDa detectada corresponde a la pectato liasa YvpA.

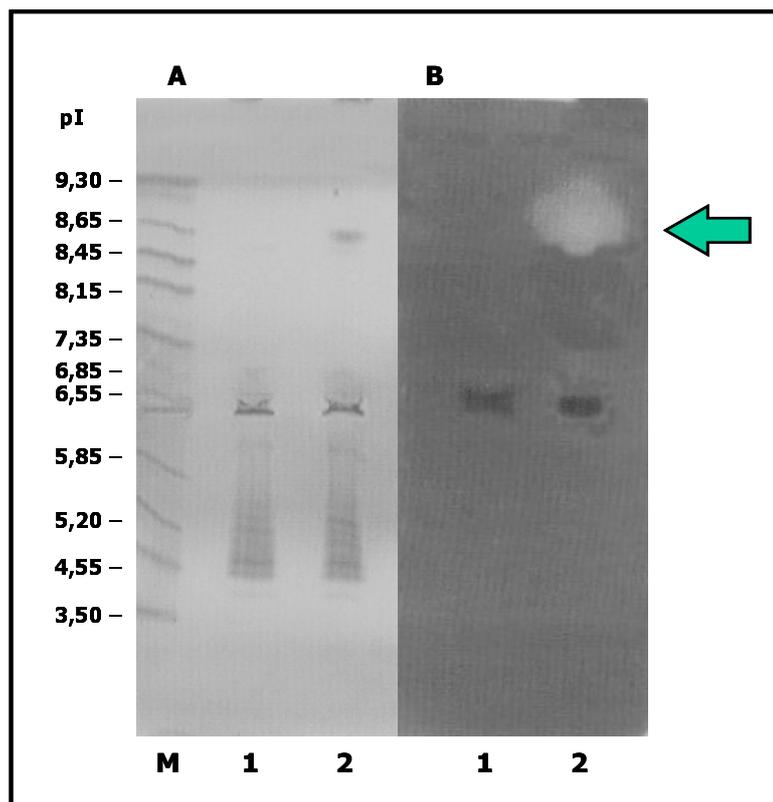


**Figura 3.3.5.** Análisis de YvpA en geles de poliacrilamida con SDS. (A) Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie. (B) Zimograma de actividad pectinasa. Extractos crudos de *E. coli*/pJF118HE (1) y *E. coli*/pJYvpA (2). (M) marcador de peso molecular.

### 3.3.2.2. Determinación del punto isoeléctrico

Las muestras de extractos crudos de *E. coli*/pJYvpA fueron analizadas mediante geles de isoelectroenfoque de rango de pH entre 3 y 9. Los geles fueron teñidos para proteínas y paralelamente se analizó la actividad pectinasa mediante zimogramas.

En el análisis proteico de los extractos de *E. coli*/pJYvpA se observó una banda intensa de punto isoeléctrico 8,6 que no aparecía en los extractos control (Fig. 3.3.6.). La banda observada en los geles proteicos presentó actividad pectinasa en los zimogramas, mientras que en la muestra control no se observaron bandas de actividad (Fig. 3.3.6.).



**Figura 3.3.6.** Análisis de YvpA en gels de isoelectroenfoque. (A) Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie. (B) Zimograma de actividad pectinasa. Extractos crudos de *E. coli*/pJF118HE (1) y *E. coli*/pJYvpA (2). (M) marcador de punto isoeléctrico.

### 3.3.3. Secuenciación del gen *yvpA*

La secuencia del gen *yvpA* clonado en *E. coli*/pJYvpA se obtuvo mediante secuenciación automática de 967 pb del inserto de ADN exógeno presente en dicho clon. La secuencia fue idéntica a la del gen *yvpA* del genoma de *Bacillus subtilis* 168 (Kunst *et al.*; 1997) (Fig. 3.3.7.). La secuencia deducida de aminoácidos del gen *yvpA* se encuentra depositada en la base de datos EMBL con el número de acceso O34310.

La secuencia de *yvpA* contiene una pauta abierta de lectura de 663 pb que codifica una proteína de 221 aminoácidos. A diferencia de la mayoría de genes estructurales de *Bacillus subtilis*, la región codificante comienza con el triplete TTG de inicio de traducción (Kunst *et al.*, 1997; Sawada *et al.*, 2001). Siete nucleótidos delante del codón de inicio se encuentra la secuencia GGAGGA, similar a la región consenso de unión al ribosoma (Shine-Dalgarno). En posición 5' al gen estructural se observan

regiones con características similares a los promotores reconocidos por la subunidad  $\sigma^A$  de la ARN polimerasa de *Bacillus subtilis*. En concreto se encuentran las secuencias -35 (TTTACT) y -10 (TATGAT) situadas a 125 y 102 nucleótidos del codón de inicio. En posición 3' al gen estructural se localiza una repetición invertida de 14 pb que podría actuar como terminador de la transcripción (Fig. 3.3.7.).

El gen *yvpA* codifica una proteína de 221 aminoácidos, con peso molecular y punto isoeléctrico deducidos de 24.281,4 Da y de 8,85, respectivamente, valores que concuerdan con los obtenidos experimentalmente. YvpA corresponde con toda probabilidad a una proteína de secreción, ya que presenta una región N terminal de 27 aminoácidos con las características típicas de los péptidos señal de *Bacillus subtilis* (Nagarajan, 1993). Dicha región muestra dos residuos cargados positivamente seguidos de un tramo hidrófobo de 18 aminoácidos. El aminoácido prolina, que favorece un giro  $\beta$ , se encuentra a continuación del núcleo hidrofóbico y seguidamente se encuentra la secuencia VFAA, similar a las reconocidas por la peptidasa señal bacteriana (Von Heijne, 1986; Tjalsma *et al.*, 2000), la cual cortaría entre las dos alaninas.

TAT	CAA	TCG	GTA	AGA	TCG	ATT	CAT	TTT	CCA	TTT	TTC	ACC	CAA	AAT	TGT	CTT	53
TAC	TTT	CAG	GCT	GTC	TGT	TTT	TAT	GAT	TAA	AGC	AGA	TTC	AGC	CTT	GCC	CCG	104
-35 -10																	
ATC	TAT	GCG	AGA	GAA	GCC	GGT	GCA	AGT	CGC	TGA	CGC	TTC	TCT	TGC	AAA	AAA	155
TGA	AAG	ATA	TCC	GGG	GAG	GAT	TTA	TCA	TTG	AAA	AAA	ATC	GTG	TCT	ATC	CTA	206
R.B.S.																	
TTT	ATG	TTC	GGT	TTG	GTT	ATG	GGT	TTC	AGC	CAG	TTT	CAG	CCA	TCA	ACC	GTT	257
F	M	F	G	L	V	M	G	F	S	Q	F	Q	P	S	T	V	25
TTT	GCA	GCT	GAC	AAA	GTG	GTG	CAC	GAA	ACA	ATT	ATC	GTA	CCA	AAA	AAT	ACA	308
F	A	A	D	K	V	V	H	E	T	I	I	V	P	K	N	T	42
ACA	TAT	GAC	GGG	AAA	GGA	CAG	CGG	TTT	GTG	GCA	GGG	AAA	GAA	TTA	GGT	GAC	359
T	Y	D	G	K	G	Q	R	F	V	A	G	K	E	L	G	D	59
GGA	AGC	CAG	TCA	GAA	AAC	CAA	GAC	CCT	GTT	TTT	CGT	GTG	GAG	GAT	GGA	GCA	410
G	S	Q	S	E	N	Q	D	P	V	F	R	V	E	D	G	A	76
ACC	CTG	AAA	AAT	GTG	GTG	CTT	GGT	GCA	CCT	GCA	GCT	GAT	GGC	GTG	CAC	ACT	461
T	L	K	N	V	V	L	G	A	P	A	A	D	G	V	H	T	93
TAT	GGA	AAC	GTT	AAC	ATT	CAG	AAT	GTG	AAA	TGG	GAA	GAT	GTT	GGT	GAG	GAT	512
Y	G	N	V	N	I	Q	N	V	K	W	E	D	V	G	E	D	110
GCG	TTA	ACG	GTG	AAG	AAG	GAA	GGA	AAA	GTG	ACG	ATC	GAC	GGC	GGT	TCT	GCT	563
A	L	T	V	K	E	G	K	V	T	I	D	G	G	S	A		127
CAA	AAA	GCG	TCA	GAT	AAG	ATA	TTC	CAA	ATC	AAT	AAA	GCC	AGT	ACC	TTC	ACA	614
Q	K	A	S	D	K	I	F	Q	I	N	K	A	S	T	F	T	144
GTG	AAA	AAT	TTC	ACG	GCG	GAT	AAT	GGC	GGG	AAG	TTC	ATT	AGA	CAG	CTT	GGT	665
V	K	N	F	T	A	D	N	G	G	K	F	I	R	Q	L	G	161
GGT	TCA	ACC	TTC	CAC	GTT	GAT	GTG	ATC	ATC	GAC	AAG	TGC	ACC	ATC	ACA	AAC	716
G	S	T	F	H	V	D	V	I	I	D	K	C	T	I	T	N	178
ATG	AAG	GAA	CGC	ATA	TTC	CGG	ACG	GAC	AGC	AAA	ACA	AGC	ACG	GTC	AGA	ATG	767
M	K	E	A	I	F	R	T	D	S	K	T	S	T	V	R	M	195
ACA	AAT	ACA	CGC	TAC	TCT	AAT	GTC	GGT	CAA	AAA	TGG	ATT	GGT	GTT	CAG	CAT	818
T	N	T	R	Y	S	N	V	G	Q	K	W	I	G	V	Q	H	212
ATT	TAC	GAA	AAC	AAC	AAC	ACT	CAA	TTT	TAA	CAA	AAA	AAG	TCC	GCT	GAT	GTT	869
I	Y	E	N	N	N	T	Q	F	stop								221
ATT	CAG	CGG	ACT	TTT	TCA	ATC	TTT	CTT	GCA	TTT	CTT	CCT	TCG	TAT	AGA	TGA	920
TCC	TCA	TCG	GAT	TTC	CGC	CGA	CAA	ATG	CCC	CGT	CAG	GCA	CAT	CCT	TAT	GGA	971
CAA	GCG	TTC	CGG	CGG	ACA											989	

**Figura 3.3.7.** Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de *yvpA*. Las regiones hipotéticas promotoras -10 y -35 y la región de unión al ribosoma (R.B.S.) se encuentran subrayadas. Se presenta de color morado los aminoácidos que ligarían calcio y de color naranja los aminoácidos básicos teóricamente relacionados con la catálisis. La repetición invertida de 14 pb se encuentra subrayada con una flecha. Se muestran subrayadas en rojo las zonas correspondientes a los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y clonación de *yvpA* en el plásmido pJF118HE, y subrayadas en negro las zonas correspondientes a los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y clonación de *yvpA* en el plásmido pET28a. Se encuentran sombreadas las zonas correspondientes a las dianas de restricción introducidas en los oligonucleótidos cebadores. En azul se muestran los aminoácidos de YvpA. El hipotético lugar de corte por la peptidasa señal se indica con una flecha vertical.

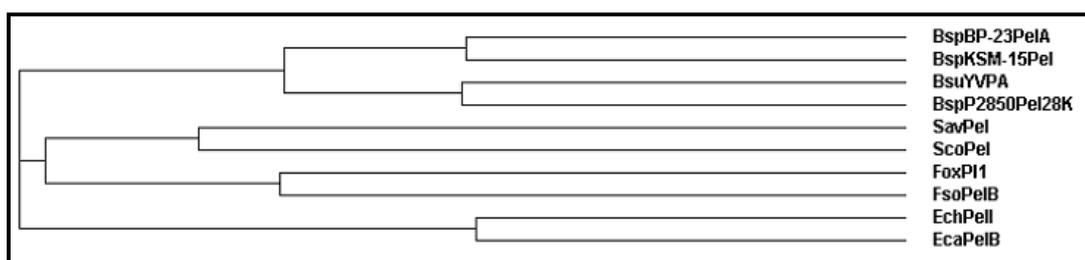
La composición de aminoácidos de YvpA se presenta en la tabla 3.3.3. (<http://bo.expasy.org/tools/protparam.html>). El número de residuos cargados negativamente (Asp + Glu) es de 23 y el número de residuos cargados positivamente (Arg + Lys + His) es de 30.

**Tabla 3.3.3.** Composición de aminoácidos de la pectinasa YvpA

Aminoácidos	Nº de residuos	Composición (%)
Ala	13	5,9
Arg	6	2,7
Asn	15	6,8
Asp	14	6,3
Cys	1	0,5
Gln	12	5,4
Glu	9	4,1
Gly	21	9,5
His	4	1,8
Ile	15	6,8
Leu	7	3,2
Lys	20	9,0
Met	5	2,3
Phe	14	6,3
Pro	4	1,8
Ser	12	5,4
Thr	20	9,0
Trp	2	0,9
Tyr	4	1,8
Val	23	10,4

La secuencia de aminoácidos de YvpA fue comparada con otras secuencias proteicas contenidas en las bases de datos Swissprot y EMBL (Fig. 3.2.9.). Igualmente que en el caso de PelA, se encontró homología con las pectato liasas de la familia PL3, pero no se halló homología con pectato liasas de otras familias. Las homologías más altas se encontraron con pectato liasas de cepas de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*. De esta forma, la pectato liasa de *Bacillus* sp. P-2850 (sp. TREMBL Q8LOR5), la pectato liasa de *Bacillus* sp. KSM-15 (Hatada *et al.*, 2000) y la pectato liasa PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 mostraron una identidad del 73, 54 y 54% con YvpA, respectivamente. También mostraron alta homología las pautas abiertas de lectura deducidas de los genes SAV683 del genoma de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2002) y SCO1110 de *Streptomyces avermitilis* (Omura *et al.*, 2001), que presentaron una identidad del 45 y 40%, respectivamente, con YvpA. Se observó también homología elevada con pectato liasas de hongos fitopatógenos, tales como P11 de *Fusarium oxysporum* (Huertas *et al.*, 1999), y PelA, PelB, PelC y PelD de *Fusarium solani* (González-Candelas y Kolattukudy, 1992; Guo *et al.*, 1995b, a; Guo *et al.*, 1996)

que mostraron una identidad del 44, 44, 36, 33 y 32%, respectivamente, con el enzima clonado. Pectato liasas de bacterias patógenas, como PelI de *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik *et al.*, 1997), PelB de *Erwinia carotovora* (Heikinheimo *et al.*, 1995) y Pel-3 de *Erwinia carotovora* (Liu *et al.*, 1994) presentaron identidades del 42, 37 y 36%, respectivamente, con YvpA. La figura 3.3.8. muestra un dendrograma de las pectato liasas que presentan mayor homología con YvpA.

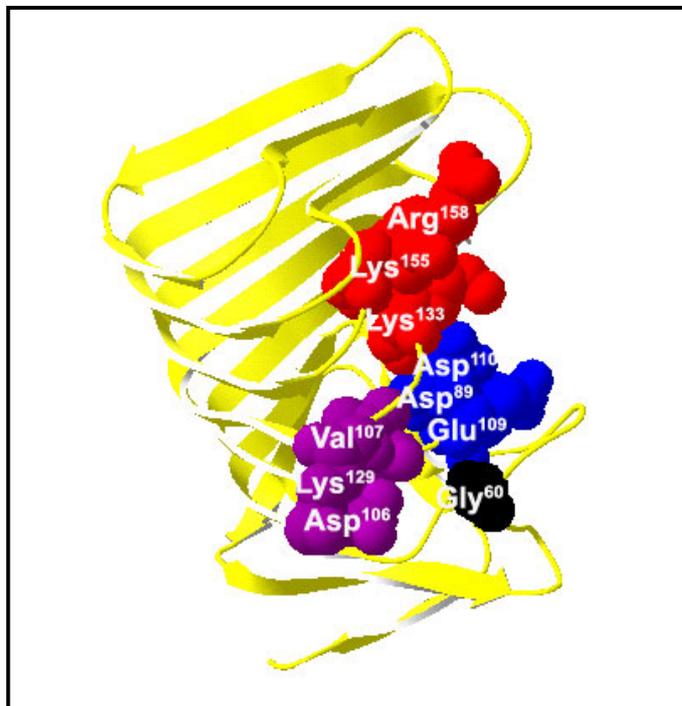


**Figura 3.3.8.** Dendrograma las pectato liasas homólogas a la pectato liasa YvpA de *Bacillus subtilis*.

De los cuatro bloques de residuos conservados de las pectato liasas de la familia PL3 propuestos por Shevchik *et al.* (1997), YvpA contiene únicamente los tres primeros bloques, similarmente a lo que ocurría con PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 (Fig. 3.2.9.).

El modelo estructural 3D teórico de YvpA se generó a partir de la estructura cristalizada descrita para la pectato liasa Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-15 (Akita *et al.*, 2001), utilizando para ello el programa SWISS-MODEL ([www.expasy.ch/swissmod/swiss-model.html](http://www.expasy.ch/swissmod/swiss-model.html)) (Schwede *et al.*, 2003) (Fig. 3.3.9.). YvpA, al igual que PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23, presenta una gran similitud con la pectato liasa Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-15. Análogamente a dicho enzima, la estructura teórica de YvpA es una hélice  $\beta$  paralela hacia la derecha de 8 vueltas con un largo bucle protuberante en un flanco de la hélice  $\beta$ . Similarmente a Pel-15, YvpA uniría dos cationes calcio. Los ligandos del ión calcio esencial para la catálisis corresponderían a los residuos Asp<sup>89</sup>, Glu<sup>109</sup> y Asp<sup>110</sup>. Los ligandos del catión calcio relacionado en la estabilidad estructural del enzima serían los oxígenos de los residuos Asp<sup>106</sup>, Val<sup>107</sup>, Lys<sup>129</sup> y 3 moléculas de H<sub>2</sub>O. Una de estas moléculas de H<sub>2</sub>O estaría ligada al oxígeno carbonílico del residuo

Gly<sup>60</sup>. Los residuos básicos del centro activo relacionados con la catálisis serían Arg<sup>158</sup>, Lys<sup>133</sup> y Lys<sup>155</sup> (Fig. 3.3.7., Fig. 3.3.9.).



**Figura 3.3.9.** Modelo tridimensional teórico de la pectato liasa YvpA. Se muestran de color morado, negro y azul los residuos que se unirían al calcio y de color rojo los residuos básicos teóricamente relacionados con la catálisis.

### 3.3.4. Purificación de YvpA

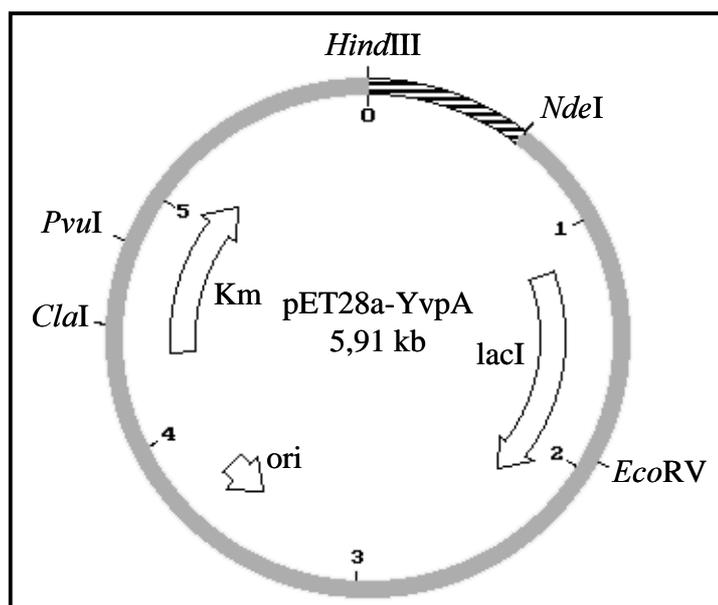
Se procedió a añadir a YvpA una cola de histidinas para facilitar su purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel.

En primer lugar, con el fin de clonar el gen de la pectato liasa YvpA en el vector de expresión pET28a, a partir de ADN cromosómico de *Bacillus subtilis* 168 se amplificó un fragmento de ADN que contenía la región codificadora de *yvpA* flanqueada por las dianas de restricción *NheI-HindIII*. La tabla 3.3.4. muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados, cuya localización en la secuencia de *yvpA* se indica en la figura 3.3.7. El fragmento amplificado de 602 pb se clonó en pET28a entre las dianas *NheI-HindIII*, obteniéndose el plásmido pET28a-YvpA que se introdujo

por transformación en *Escherichia coli* BL21(DE3) (Fig. 3.3.10.). La secuenciación del ADN recombinante del plásmido pET28a-YvpA mostró que se había añadido una cola de histidina fusionada en pauta con la proteína madura YvpA, desprovista del péptido señal. La construcción fue diseñada para que la eliminación con trombina de la cola de histidinas diese lugar a la proteína madura con únicamente seis aminoácidos adicionales (Gly, Ser, His, Met, Ala, y Ser) en el extremo N terminal.

**Tabla 3.3.4.** Oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen *yvpA*. La dianas de restricción se encuentran resaltadas en negrita. Los nucleótidos modificados sobre la secuencia original para introducir dianas se encuentran subrayadas.

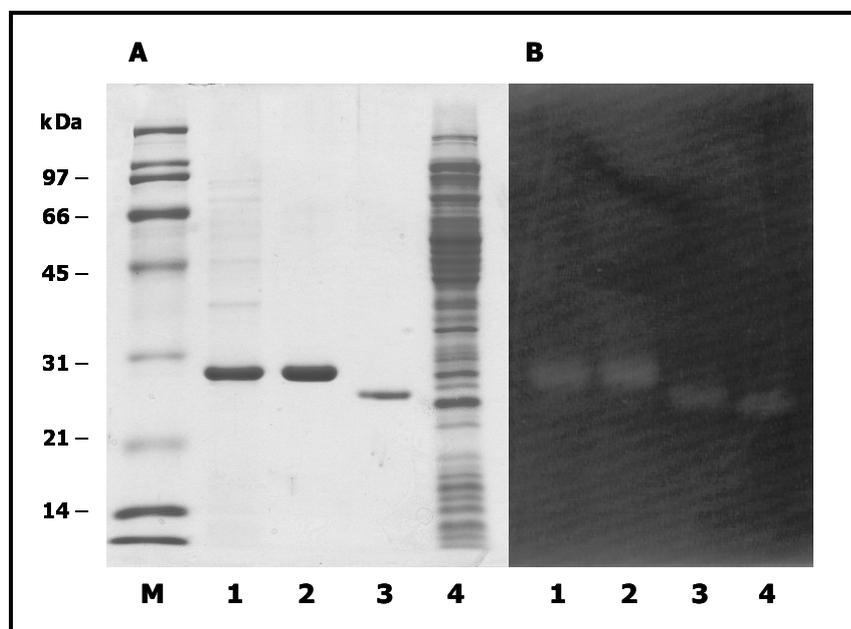
Nombre	Secuencia de nucleótidos	Diana de restricción
Fw $yvpAB$	5' –TT <b>GCTAGCG</b> CTGACAAAGTGG– 3'	<i>NheI</i>
BK $yvpAB$	5' –CTA <b>AGCTT</b> GTTAAAATTGAGTGTG– 3'	<i>HindIII</i>



**Figura 3.3.10.** Mapa físico del plásmido pET28a-YVPA. El fragmento de rayado corresponde al gen *yvpA* insertado en el vector de expresión pET28a en gris.

La cepa *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET28a-YvpA se cultivó en medio LB en condiciones de inducción de la expresión de *yvpA*. A partir de los extractos celulares de la cepa se purificó YvpA mediante el sistema Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa (apartado 2.6.2.) y se eliminó la cola de histidina (apartado 2.6.3.). Las diferentes fracciones obtenidas

durante el proceso de purificación se analizaron en geles de poliacrilamida con SDS y zimogramas (Fig. 3.3.11.). Se observó un excelente grado de pureza de la pectinasa YvpA aislada, así como un gran rendimiento en la purificación.



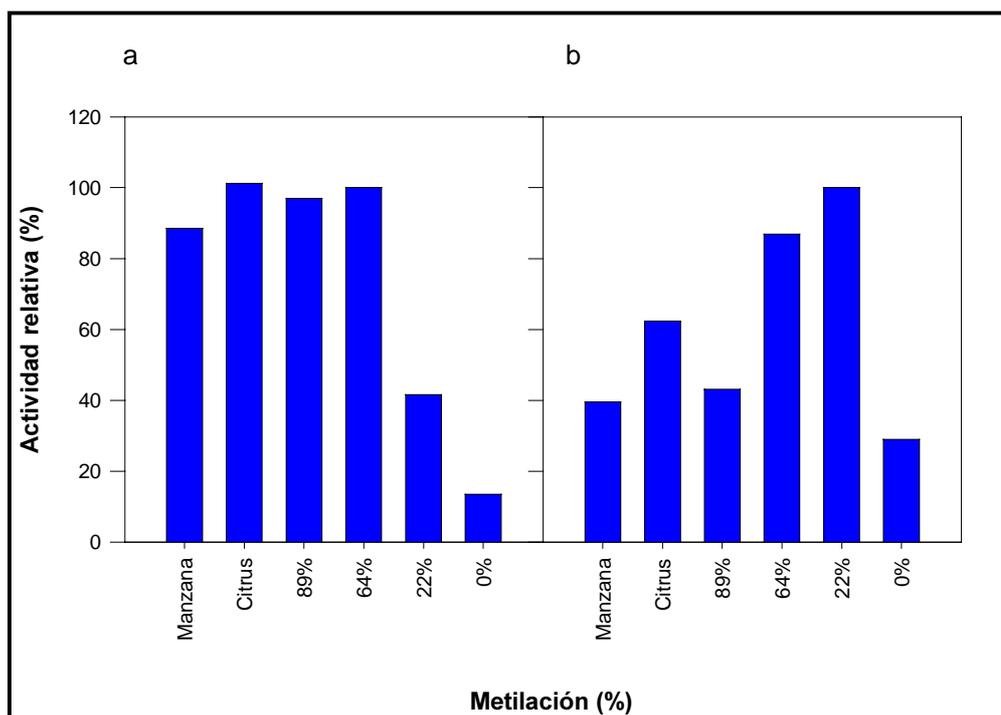
**Figura 3.3.11.** Purificación de YvpA. Análisis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS. (A) Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie. (B) Zimograma de actividad pectinasa. (1) Extracto de *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-YvpA, (2) YvpA purificada con la cola de histidinas, (3) YvpA purificada sin la cola de histidinas, (4) Extracto de *E. coli*/YvpA. (M) marcador de peso molecular.

### 3.3.5. Caracterización enzimática de YvpA

#### 3.3.5.1. Estudio de la influencia del grado de metilación de la pectina en la actividad enzimática

Se procedió a la caracterización enzimática de YvpA purificada. En primer lugar se estudió la influencia del grado de metilación de la pectina en la actividad del enzima. Se determinó la actividad liasa sobre sustratos con diferente grado de metilación. Se utilizaron para ello ácido poligalacturónico, pectina de limón del 22%, 64% y 89% de metilación, pectina de manzana del 68% de metilación, y pectina de limón del 71% de metilación.

Cuando los sustratos se mantuvieron en contacto con tampón a pH 10 periodos de tiempo superiores a una hora, previamente a la realización de los ensayos enzimáticos, se pudo observar que YvpA presentaba preferencia clara por pectinas de alto grado de metilación, mostrando actividad máxima sobre pectina del 64% de metilación. Sobre pectina del 22% de metilación y ácido poligalacturónico se detectó el 42% y el 14% de la actividad máxima, respectivamente (Fig. 3.3.12.a.). Por el contrario, cuando los sustratos permanecieron en contacto con el tampón previamente al ensayo periodos de tiempo inferiores a 10 min, los resultados fueron distintos. El enzima presentó máxima actividad sobre pectina del 22% de metilación. Sobre pectinas de alta metilación y sobre ácido poligalacturónico la actividad fue inferior. En concreto, la actividad sobre ácido poligalacturónico fue el 29% de la detectada sobre pectina del 22% de metilación (Fig. 3.3.12.b.). La especificidad de sustrato observada indica que YvpA es una pectato liasa con preferencia por pectinas de bajo grado de metilación, pectina de limón del 22% de metilación. Dicho sustrato se eligió para la caracterización enzimática de YvpA.

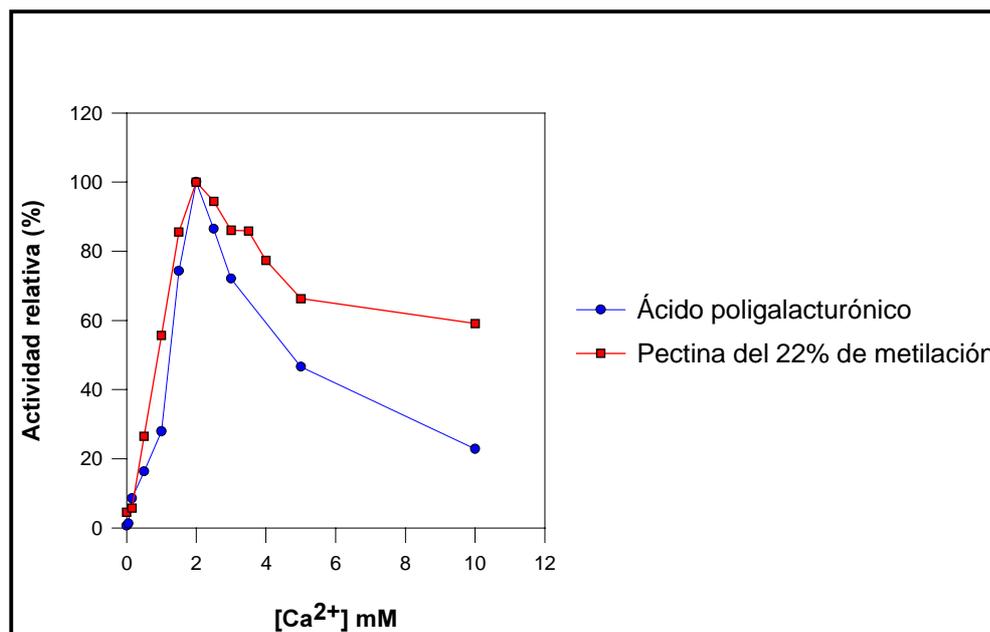


**Figura 3.3.12.** Influencia del grado de metilación de la pectina en la actividad de YvpA. Se determinó la actividad liasa sobre ácido poligalacturónico, pectinas de limón del 22%, 64% y 89% de metilación, pectina de manzana del 68% de metilación y pectina de limón del 71% de metilación. Tiempo de contacto entre el sustrato y el tampón a pH 10 superior a 1 h (a), o inferior a 10 min (b).

### 3.3.5.2. Determinación del efecto del ión calcio en la actividad

El estudio del efecto del ión calcio en la actividad liasa del enzima purificado verificó que YvpA necesita calcio para la degradación de sustratos pécticos. La degradación de ácido poligalacturónico requirió la adición de calcio en la mezcla de ensayo. Por el contrario, para la degradación de pectina del 22% de metilación no fue necesaria la adición de calcio en la mezcla de ensayo, aunque la actividad de YvpA en estas condiciones fue muy baja. La adición de calcio produjo un aumento muy importante de la actividad sobre pectina del 22% de metilación, alcanzándose la máxima actividad con una concentración 2 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Sin embargo, cuando se adicionó EDTA 1 mM a la mezcla de reacción no se detectó actividad sobre pectina.

Estos resultados evidenciaron un requerimiento absoluto de calcio para la actividad de YvpA sobre sustratos pécticos, y confirmaron a YvpA como pectato liasa.



**Figura 3.3.13.** Influencia de la concentración de calcio en la actividad de YvpA.

### 3.3.5.3. Determinación del pH óptimo

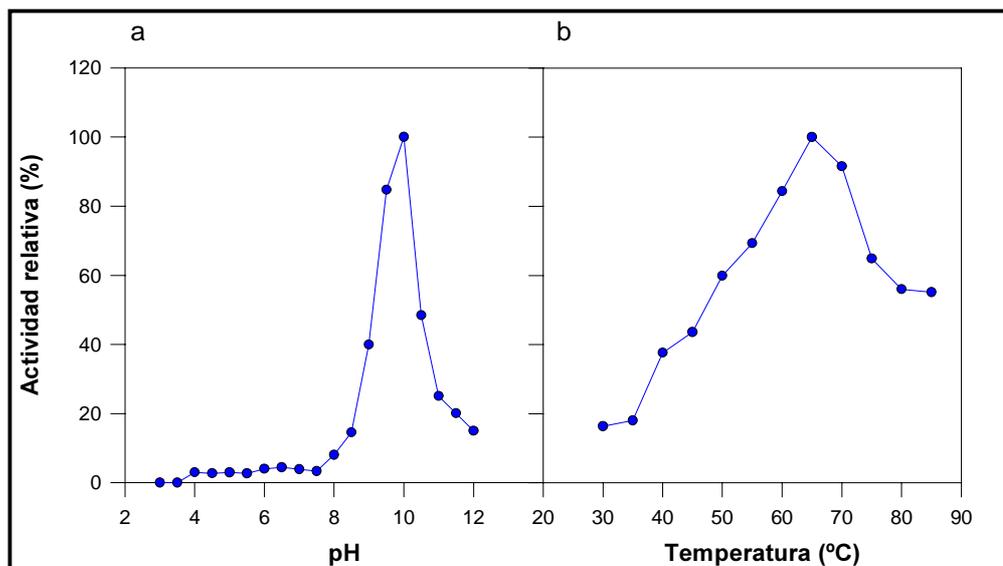
Se estudió el efecto del pH sobre la actividad enzimática de YvpA en el rango de pH entre 3,0 y 12,0. Los ensayos de actividad se realizaron sobre pectina del 22% de metilación a 65°C en presencia de CaCl<sub>2</sub> 2 mM.

El enzima mostró actividad en un estrecho margen de pH alcalino. El pH óptimo del enzima fue de 10,0, mostrando una actividad de aproximadamente el 50% de la actividad máxima entre pH 9,5 y 10,5 (Fig. 3.3.14.a.).

### 3.3.5.4. Determinación de la temperatura óptima

El efecto de la temperatura se estudió en el rango de temperatura de 30 a 85°C. Los ensayos se realizaron a pH 10 en presencia de CaCl<sub>2</sub> 2 mM.

La temperatura óptima resultó ser 65°C. En el intervalo comprendido entre 50 y 85°C se observó una actividad superior al 50% de la máxima (Fig. 3.3.14.b.).



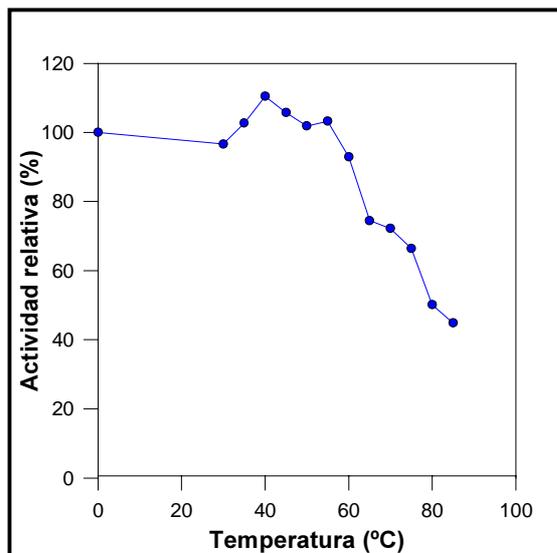
**Figura 3.3.14.** Efecto del pH (a) y de la temperatura (b) sobre la actividad enzimática de YvpA.

### 3.3.5.5. Determinación de la termoestabilidad

El estudio del efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la pectato liasa YvpA se realizó de dos maneras diferentes.

Primeramente, se valoró la estabilidad de la pectato liasa en el rango de temperaturas de 30 a 85°C. El enzima se incubó durante 1 hora a pH 7 a dichas temperaturas, y a continuación se determinó la actividad enzimática residual en las condiciones óptimas de actividad.

El enzima se mostró estable hasta los 60°C. A partir de dicha temperatura se observó una inactivación progresiva de YvpA, observándose una actividad residual del 45% tras 1 hora a 85°C (Fig. 3.3.15.).

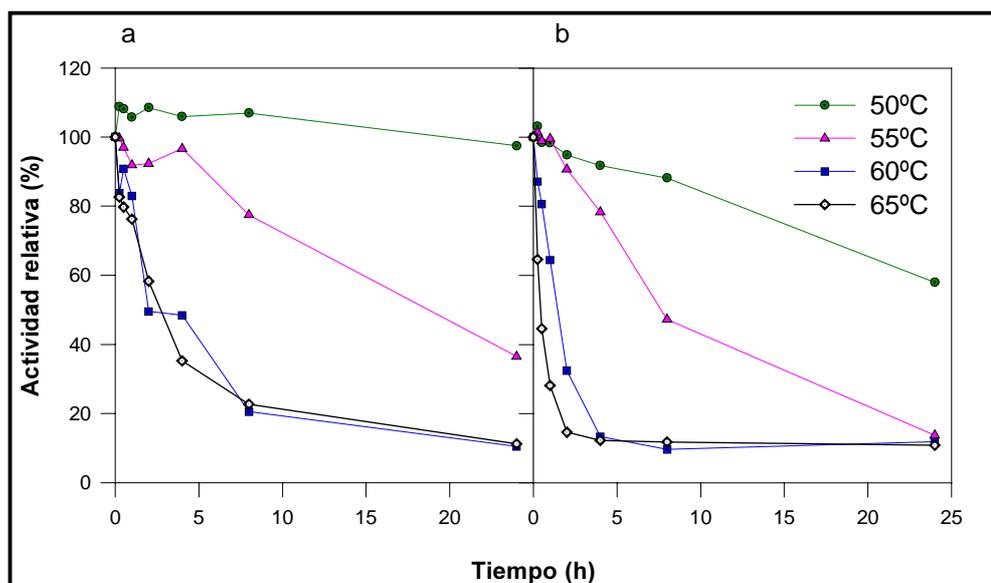


**Figura 3.3.15.** Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de YvpA a pH 7.

A continuación, se estudió la estabilidad del enzima durante 24 h a las cuatro temperaturas más altas en las que se había observado que permanecía básicamente estable durante 1 hora de incubación, es decir, 50, 55, 60 y 65°C. YvpA se incubó a pH 7 o 10 a las cuatro temperaturas indicadas, se tomaron alícuotas a varios intervalos y se determinó la actividad enzimática residual.

Cuando las incubaciones se realizaron a pH 7, se observó que el enzima permanecía estable durante 24 h a 50°C. A 55°C YvpA mostró inactivación a partir de las 4 h, observándose una actividad residual del 37% de la inicial tras 24 h en dichas condiciones. A 60°C y 65°C el enzima mostró un patrón de inactivación más rápido, observándose inactivación casi completa tras 24 h (Fig. 3.3.16.a.).

A continuación se realizó el ensayo de termoestabilidad a pH 10. Se observó que a todas las temperaturas estudiadas el enzima mostraba inactivación desde los primeros momentos. Sin embargo, tras 24 h a 50°C YvpA mostraba casi el 60% de la actividad inicial, mientras que a 55°C se observó aproximadamente el 50% de la actividad inicial después de 8 h de incubación. A 60°C y 65°C el enzima se inactivó rápidamente en las primeras 4 h de incubación (Fig. 3.3.16.b.).

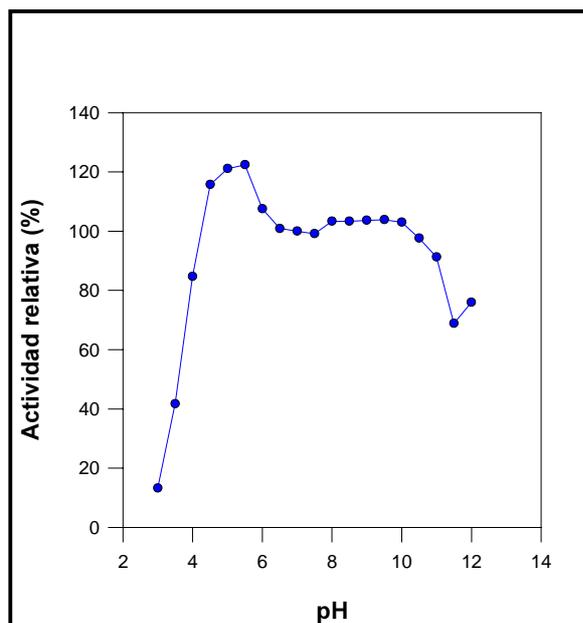


**Figura 3.3.16.** Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de YvpA a pH 7 (a) y a pH 10 (b).

### 3.3.5.6. Determinación del efecto del pH sobre la estabilidad

Después de estudiar la termoestabilidad de la pectato liasa YvpA, y observando que dicho enzima era estable a 55°C y pH 7 durante 1 hora, se estudió la estabilidad en diferentes pH a dicha temperatura. El enzima se incubó durante una hora a 55°C en diferentes tampones a pH entre 3,0 y 12,0, y posteriormente se midió la actividad residual.

El enzima se mostró básicamente estable en el rango de pH entre 4,0 y 11,0. Fuera de este intervalo, a pH inferior a 4,0 la actividad residual fue inferior al 40% de la inicial, mientras que a pH superior a 11,0, la actividad residual tras el tratamiento fue superior al 70% (Fig. 3.3.17.).



**Figura 3.3.17.** Efecto del pH sobre la estabilidad de YvpA a 55°C.

### 3.3.5.7. Determinación del efecto de iones metálicos

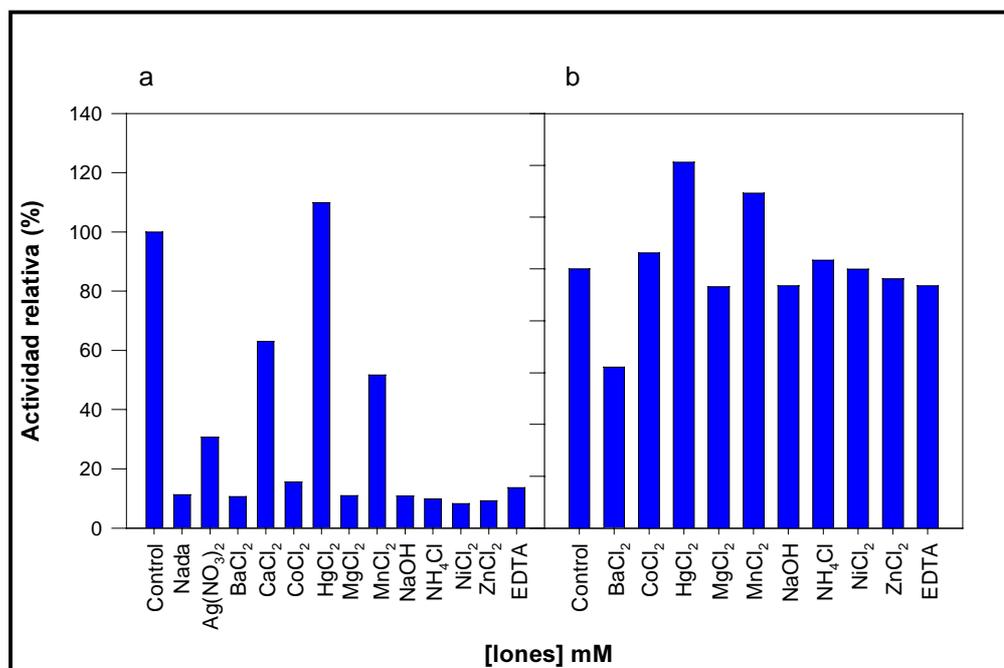
Con el objeto de estudiar la influencia de iones metálicos distintos del calcio sobre la actividad enzimática de YvpA, se realizaron ensayos de actividad en presencia de sales de estos iones a una concentración de 1 mM, sin añadir calcio a la mezcla de ensayo.

Cuando el ensayo se realizó en presencia de mercurio se detectó actividad superior a la actividad máxima, detectada en presencia de calcio 2,0 mM. Al realizar el ensayo en presencia de plata o manganeso se observó el 30 y el 50% de la actividad máxima, respectivamente. Por el contrario, con el resto de los iones ensayados se observó actividad pectinasa muy baja (Fig. 3.3.18.a.). Estos resultados indican que, de entre todos los iones ensayados, el mercurio podría sustituir al  $\text{Ca}^{2+}$ .

Con el fin de ensayar si los iones estudiados producían efecto inhibitor o estimulador de la actividad pectato liasa en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , se realizaron ensayos de actividad con  $\text{CaCl}_2$  2 mM y los iones metálicos a una concentración 1 mM.

Se observó que mercurio, manganeso y cobalto incrementaban la actividad del enzima, dando lugar a actividades del 141, 129 y 106% del control, respectivamente. El

amonio, no afectó a la actividad enzimática. El resto de los iones, bario, magnesio, sodio, zinc y níquel causaron una pequeña inhibición, 62, 93, 93, 96 y 99% de actividad residual, respectivamente (Fig. 3.3.18.b.).



**Figura 3.3.18.** Efecto de diferentes iones metálicos en la actividad enzimática de YvpA sobre pectina con 22% de metilación en ausencia (a) y en presencia de calcio (b).

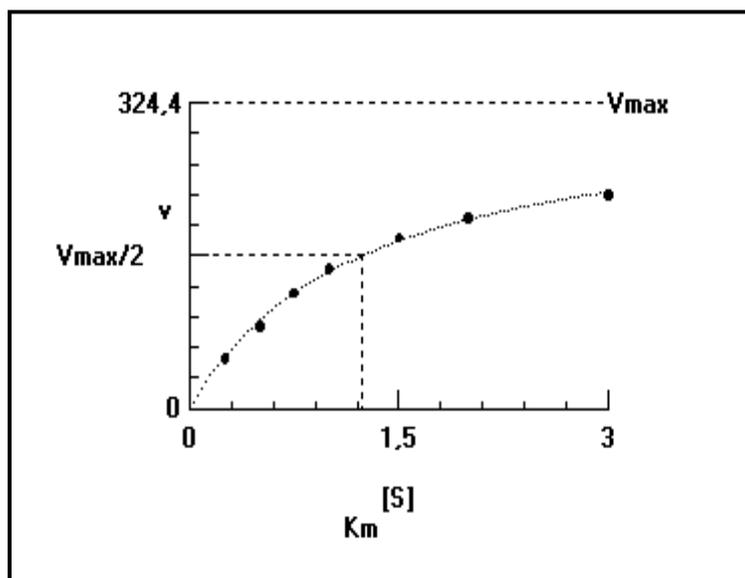
### 3.3.6. Determinación de las constantes cinéticas

Para estudiar las constantes cinéticas de YvpA se realizaron ensayos de actividad pectato liasa con una cantidad fija de enzima (0,12 µg) y cantidades crecientes de sustrato, pectina de limón del 22% de metilación (Fig. 3.3.19.).

Las constantes cinéticas calculadas fueron:

$$V_{M\acute{a}x} = 324,4 \pm 26,84 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg de prote\acute{i}na}$$

$$k_M = 1,24 \pm 0,23 \text{ mg de sustrato}/\text{ml}$$



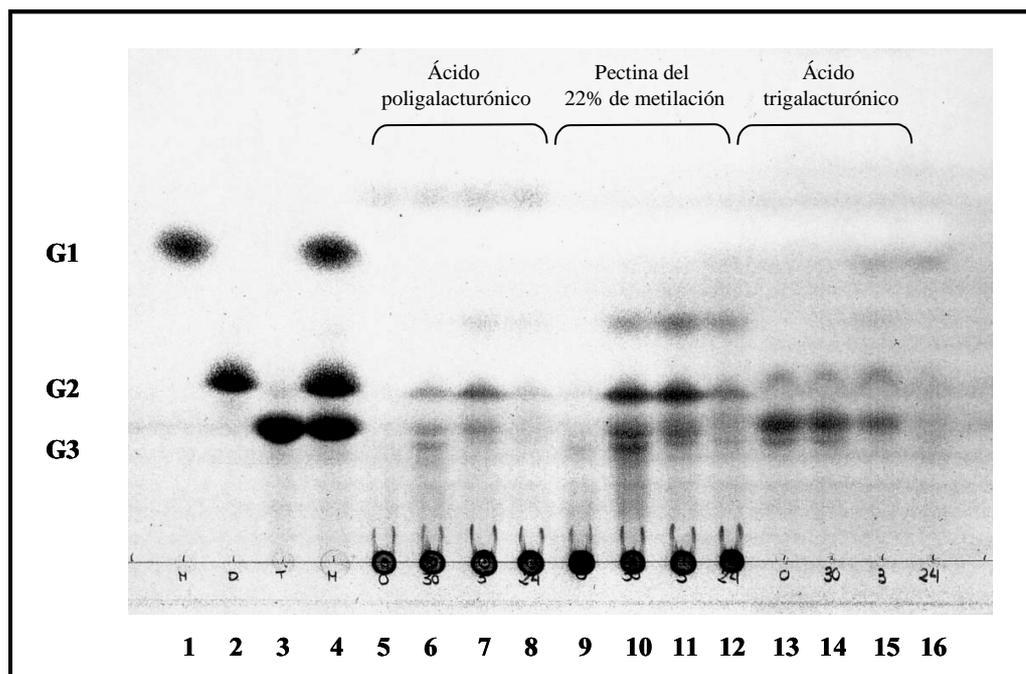
**Figura 3.3.19.** Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad YvpA.

### 3.3.7. Cromatografía en capa fina

Con el fin de estudiar el modo de acción enzimática de YvpA, los productos de reacción liberados por el enzima a partir de diferentes sustratos (ácido poligalacturónico, pectina del 22% de metilación y ácido trigalacturónico) fueron analizados mediante cromatografía en capa fina (TLC).

La mezcla de reacción contenía tampón glicina 0,15 M pH 10, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, sustrato al 0,15% y 1,2 µg de YvpA. Las incubaciones se realizaron a 55°C durante 24 h y se extrajeron alícuotas de cada muestra a tiempo 0, 30 min, 3 h y 24 h.

YvpA catalizó la formación de una mezcla de diferentes productos de reacción a partir de la pectina y del ácido poligalacturónico. Entre ellos se encontraron productos que por movilidad corresponderían a ácidos digalacturónico y trigalacturónico insaturados y a oligogalacturonatos insaturados de longitud superior. Estos resultados indican que YvpA es una endopectato liasa, similarmente a PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23. Sin embargo, a diferencia de PelA, YvpA fue capaz de degradar ácido trigalacturónico, observándose como productos de reacción mayoritarios los ácidos monogalacturónico y digalacturónico insaturado.



**Figura 3.3.20.** Análisis mediante cromatografía en capa fina de los productos de reacción de YvpA. Los carriles 1, 2 y 3, muestran los patrones ácido monogalacturónico (G1), ácido digalacturónico (G2) y ácido trigalacturónico (G3), respectivamente. El carril 4 contiene la mezcla de los tres patrones. Productos de reacción del ácido poligalacturónico, carriles 5-8; pectina de limón del 22% de metilación, carriles 9-12; ácido trigalacturónico, carriles 13-16. Las incubaciones de los sustratos con el enzima se realizaron durante 0 min, carriles 5, 9 y 13; 30 min, carriles 6, 10 y 14; 3 h, carriles 7, 11 y 15; y 24 h, carriles 8, 12 y 16.

### 3.4. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES LANZADERA Y PRODUCCIÓN DE LA PECTATO LIASA A EN HUÉSPEDES HETERÓLOGOS

#### 3.4.1. Construcción de vectores lanzadera

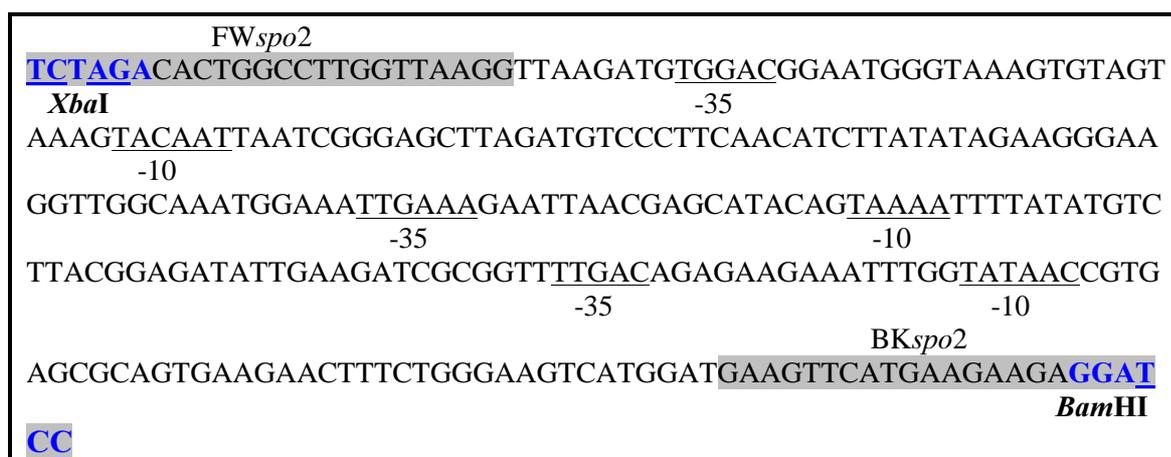
En el contexto de utilización creciente de enzimas en la industria se planteó la producción de la pectato liasa PelA en cantidades elevadas para poder realizar ensayos de aplicación industrial. Para ello, se procedió a la clonación del enzima en cepas huésped de *Bacillus subtilis*, dada la eficiente expresión y secreción de enzimas por este microorganismo.

Con este fin, en primer lugar se construyeron vectores lanzaderas que replicaran tanto en *Bacillus subtilis* como en *Escherichia coli*. Se partió para ello de los plásmidos multicopias pUC19 y pBR322 de *Escherichia coli* (Yanisch-Perron *et al.*, 1985; Bolivar *et al.*, 1977), y pUB110 y pC194, vectores de clonación en *Bacillus subtilis* (McKenzie *et al.*, 1986; Horinouchi y Weisblum, 1982). Para conseguir niveles elevados de expresión de la pectato liasa, delante del lugar de clonación múltiple de los vectores lanzaderas construidos, se insertaron promotores fuertes en *Bacillus subtilis*, como el promotor del fago SPO2 (Williams *et al.*, 1981) y el promotor de la amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (P-amy) (Palva *et al.*, 1981). Estos promotores se obtuvieron mediante amplificación por PCR con cebadores deducidos de las secuencias correspondientes, contenidas en el plásmido pGAL9 (Pérez *et al.*, 1992) en el caso del promotor P-*spo2*, o en el genoma de *Bacillus amyloliquefaciens* en el caso del promotor P-*amy*. Con el objeto de mejorar la expresión de la pectato liasa, a continuación del lugar de clonación múltiple de los vectores lanzadera se insertó el terminador de transcripción *rrnB* de *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1981).

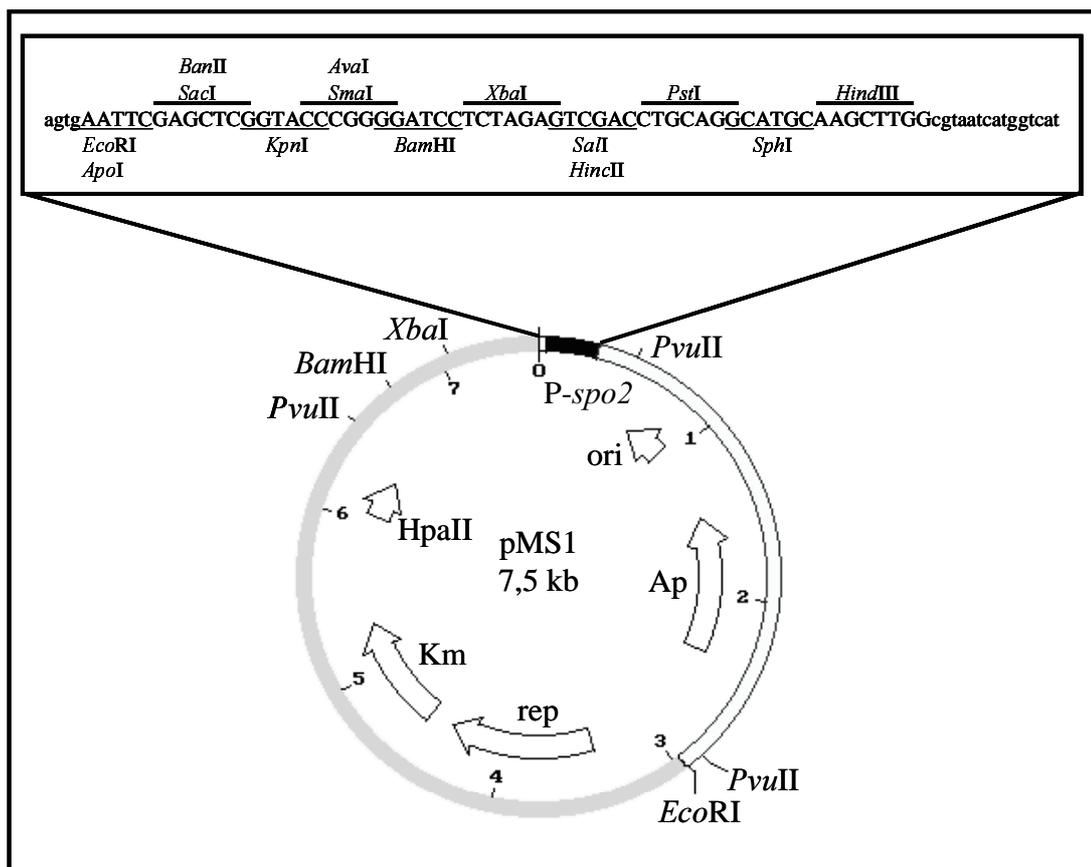
##### 3.4.1.1. Construcción del vector lanzadera pMS1

El vector se construyó a partir de los plásmidos pUC19 y pUB110, y del promotor P-*spo2*. El promotor P-*spo2* se obtuvo por amplificación mediante PCR con

los cebadores FW<sub>spo2</sub> y BK<sub>spo2</sub> (Fig. 3.4.1.). Mediante dichos cebadores se amplificó un fragmento de 281 pb conteniendo el promotor P-*spo2*, que se clonó en la región de multiclonaje del plásmido pUC19 entre las dianas *Xba*I y *Bam*HI. El plásmido resultante se digirió con *Eco*RI y se ligó al plásmido pUB110 previamente digerido con el mismo enzima. Se obtuvo de esta forma el vector lanzadera pMS1, de 7,5 kb (Fig. 3.4.2.).



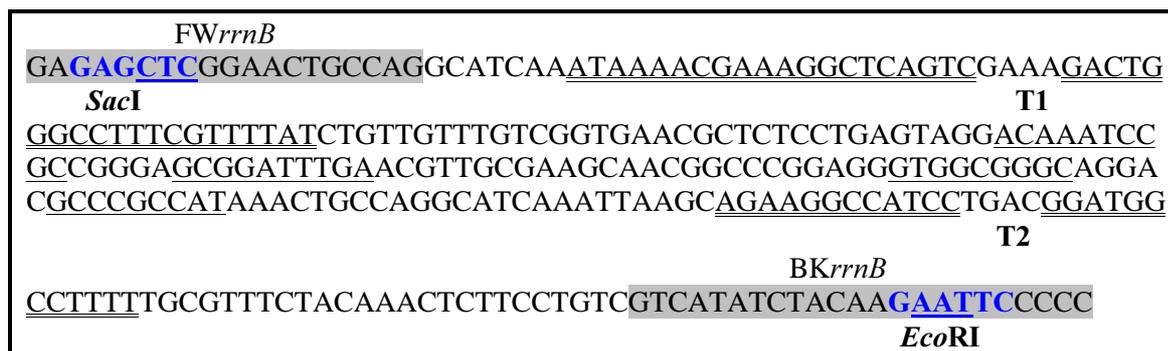
**Figura 3.4.1.** Secuencia de nucleótidos del promotor P-*spo2* contenida en el plásmido pGAL9. Las regiones promotoras -35 y -10 del promotor se encuentran subrayadas. Las secuencias correspondientes a los cebadores utilizados en la amplificación se encuentran sombreadas. Las dianas introducidas en los cebadores se encuentran resaltadas en negrita. La sustitución de nucleótidos sobre la secuencia original para introducir las dianas se hallan subrayadas.



**Figura 3.4.2.** Mapa físico del vector lanzadera pMS1. El fragmento de color blanco corresponde a pUC19 y el de color gris a pUB110. El promotor *P-spo2*, introducido entre las dianas *XbaI* y *BamHI* se muestra de color negro. La región de multiclonaje de pUC19 se encuentra enmarcada en negro.

### 3.4.1.2. Construcción del vector lanzadera pMS-R

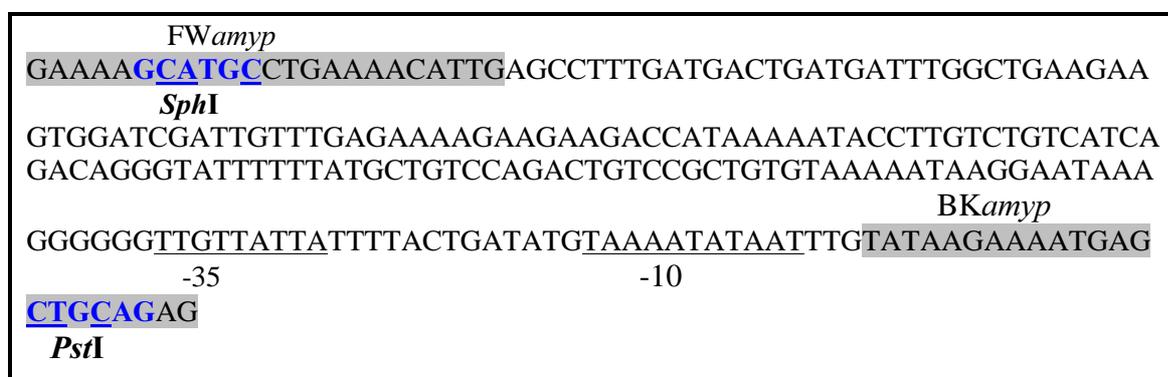
Se construyó a partir de los plásmidos pUC19, pUB111 (construido en este trabajo) y del terminador *rrnB*. El plásmido pUB111 es un vector derivado de pUB110, del que se eliminó el fragmento *ScaI* y *ThaI* de 1.351 pb con el fin de disminuir su tamaño, pero manteniendo el marcador de resistencia a kanamicina. El terminador de transcripción *rrnB* de *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1981) fue obtenido por amplificación mediante PCR con los cebadores FW*rrnB* y BK*rrnB* (Fig. 3.4.3.) utilizando como molde colonias de *Escherichia coli*. Con los mencionados cebadores se amplificó un fragmento de 277 pb conteniendo *rrnB* que se clonó entre las dianas *SacI* y *EcoRI* de la región de multiclonaje de pUC19. El plásmido resultante fue digerido con *EcoRI* y ligado al plásmido pUB111 digerido con el mismo enzima, dando lugar al vector pMS-R de 6,2 kb.



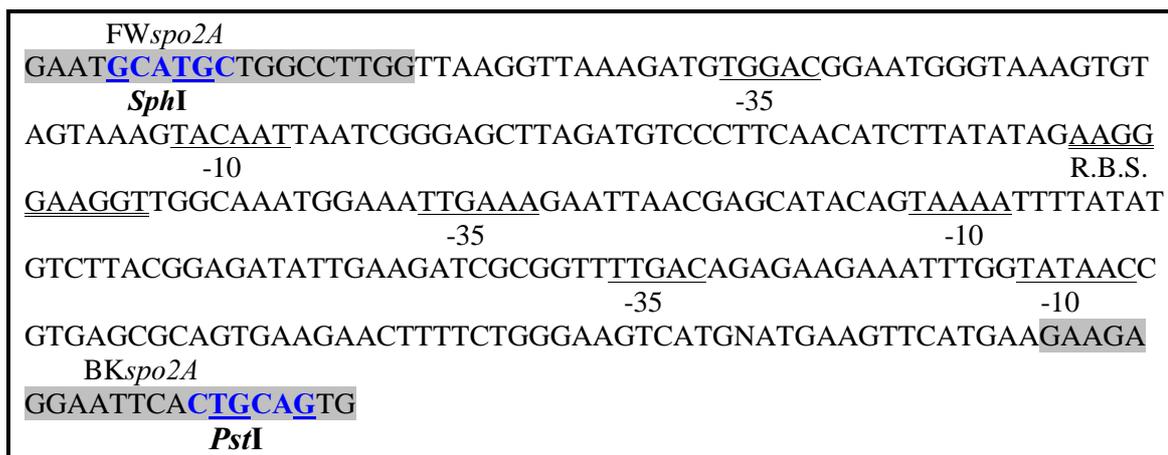
**Figura 3.4.3.** Secuencia de nucleótidos del terminador *rrnB* de *Escherichia coli*. Las zonas correspondientes a las estructuras T1 y T2 del terminador están doblemente subrayadas. Las secuencias correspondientes a los cebadores utilizados en la amplificación están sombreadas. Las dianas introducidas en los cebadores se encuentran resaltadas en negrita. La sustitución de nucleótidos sobre la secuencia original para introducir las dianas se hallan subrayadas.

### 3.4.1.3. Construcción de los vectores lanzadera pMS-RA y pMS-RS

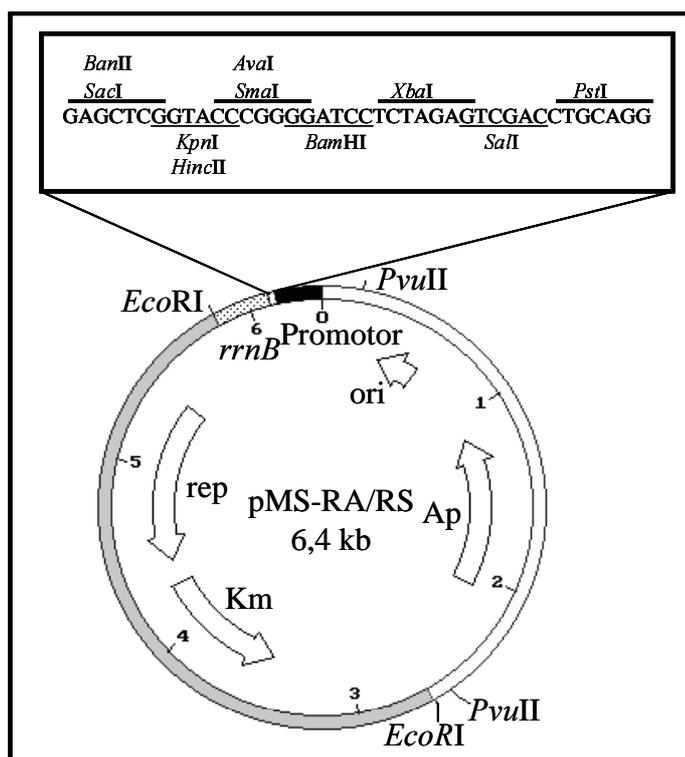
Los vectores pMS-RA y pMS-RS se construyeron a partir del plásmido pMS-R y de los promotores P-*amy* o P-*spo2*, respectivamente. Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR de la secuencia del promotor P-*amy* se denominaron FW*amyp* y BK*amyp* (Fig. 3.4.4.) y los utilizados para la amplificación del promotor P-*spo2* se denominaron FW*spo2A* y BK*spo2A* (Fig. 3.4.5.). Los fragmentos amplificados se clonaron entre las dianas *SphI* y *PstI* de la región de multiclonaje del plásmido pMS-R, dando lugar al vector pMS-RA cuando se insertó el promotor P-*amy*, o pMS-RS en el caso del promotor P-*spo2* (Fig. 3.4.6.).



**Figura 3.4.4.** Secuencia de nucleótidos del promotor P-*amy* de *Bacillus amyloliquefaciens*. Las regiones promotoras -35 y -10 del promotor se encuentran subrayadas. Las secuencias correspondientes a los cebadores utilizados en la amplificación están sombreadas. Las dianas introducidas en los cebadores se encuentran resaltadas en negrita. La sustitución de nucleótidos sobre la secuencia original para introducir las dianas se hallan subrayadas.



**Figura 3.4.5.** Secuencia de nucleótidos del promotor P-*spo2* del plásmido pGAL9. Las regiones promotoras -35 y -10 del promotor se encuentran subrayadas. Las secuencias correspondientes a los cebadores utilizados en la amplificación están sombreadas. Las dianas introducidas en los cebadores se encuentran resaltadas en negrita. La sustitución de nucleótidos sobre la secuencia original para introducir las dianas se hallan subrayadas.



**Figura 3.4.6.** Mapa físico de los vectores lanzadera pMS-RA y pMS-RS. El fragmento de color blanco corresponde a pUC19 y el de color gris a pUB111. El promotor, introducido entre las dianas *SphI* y *PstI* se muestra de color negro y el terminador, intercalado entre las dianas *EcoRI* y *SacI*, se muestra punteado. La región de multiclonaje de pUC19 se encuentra enmarcada en negro.

### 3.4.2. Clonación de la pectato liasa PelA en los vectores lanzadera

La secuencia de nucleótidos de *pelA* se amplificó por PCR a partir del plásmido pP22 mediante los cebadores FWp222 y BKp222 (Tabla 3.4.1.), deducidos de la secuencia del gen y modificados por la introducción de las dianas de restricción *SmaI* y *SacI*. El fragmento amplificado, de 904 pb, contenía la región codificante completa del gen *pelA* precedida por 42 pb en los que se encontraba una secuencia con similitud a la región -10 de promotores de *Bacillus subtilis* (Fig. 3.2.8.). El fragmento amplificado se digirió con los enzimas *SmaI* y *SacI*, y se ligó a continuación a los distintos vectores lanzadera construidos, previamente digeridos con los mismos enzimas, para orientar el gen *pelA* a continuación de los promotores P-*spo2* o P-*amy*, y delante del terminador *rrnB*.

El gen *pelA* se clonó en los vectores construidos así como en el vector lanzadera pN5, vector derivado de pUC19 y pUC194 que no contiene promotores ni terminador de transcripción flanqueando la región de multiclonaje (Pastor *et al.*, 1999).

**Tabla 3.4.1.** Oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen *pelA*. Las dianas de restricción se encuentran resaltadas en negrita. Los nucleótidos modificados sobre la secuencia original para introducir dianas se encuentran subrayados.

Nombre	Secuencia de nucleótidos	Diana de restricción
FWp222	5' – GCC <u>C</u> GGGGCTTGT <u>T</u> TATC – 3'	<i>SmaI</i>
BKp222	5' – GTT <u>G</u> AGCTCCCTGGAGAG – 3'	<i>SacI</i>

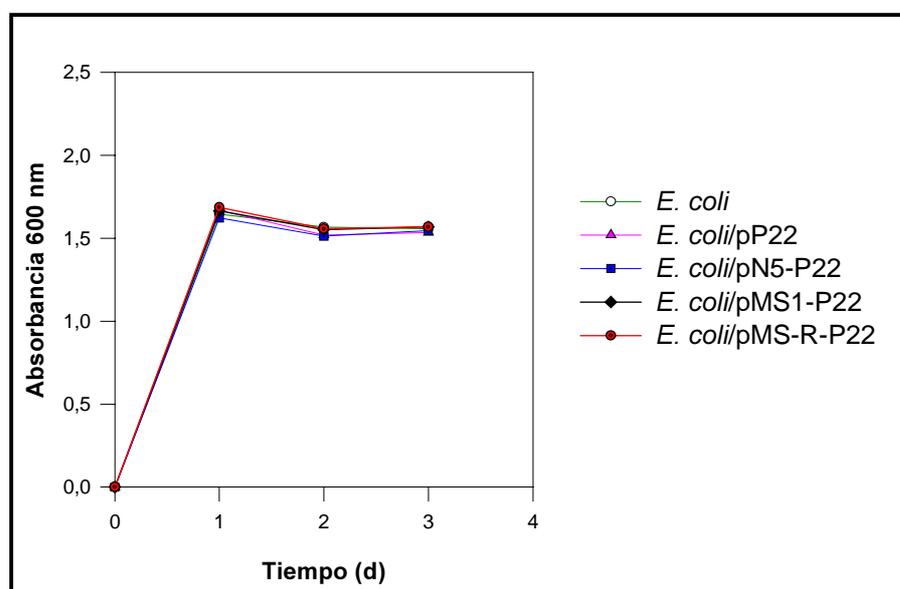
#### 3.4.2.1. Expresión en *Escherichia coli* de la pectato liasa A clonada en los diferentes vectores lanzadera

Las construcciones realizadas, pN5-P22, pMS1-P22, pMS-R-P22, pMS-RA-P22 y pMS-RS-P22 se introdujeron por transformación en *Escherichia. coli* con la finalidad de garantizar su mantenimiento y de poder obtener ADN en cantidad suficiente para poder transformar posteriormente la cepa huésped *Bacillus subtilis* MW15. Se

obtuvieron clones recombinantes de *Escherichia coli* con las construcciones pN5-P22, pMS1-P22 y pMS-R-P22, mientras que con las construcciones pMS-RA-P22 y pMS-RS-P22 no se consiguieron clones estables en dicho organismo. Estos resultados sugirieron que la pectato liasa A resultaba tóxica para *E. coli*, y por ello no se podía obtener clones estables con las construcciones que teóricamente producían la expresión más elevada de dicho enzima, que eran las construcciones con el gen *peIA* bajo control de los promotores fuertes P-*spo2* y P-*amy*, y conteniendo simultáneamente el terminador de transcripción *rrnB*, que garantizaba la formación de mensajeros estables.

Con el objeto de evaluar la producción de la pectato liasa A en las diferentes cepas recombinantes de *E. coli*, se realizaron cultivos de las mismas en medio LB suplementado con ampicilina. Como control se cultivaron *E. coli*/pP22 y *E. coli* sin transformar.

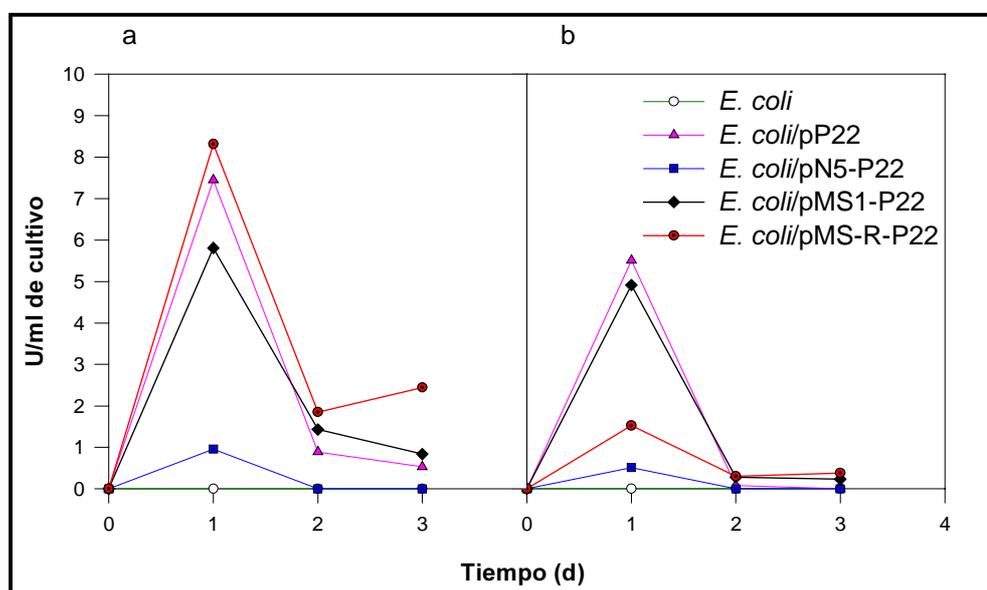
Las diferentes cepas recombinantes mostraron un crecimiento similar al de las cepas control, obteniéndose en todas ellas los valores máximos de absorbancia a 600 nm a las 24 h tras cultivo (Fig. 3.4.7.).



**Figura 3.4.7.** Crecimiento de las cepas recombinantes de *Escherichia coli*.

Las muestras de los diferentes cultivos fueron centrifugadas para separar los sobrenadantes de las células, siendo estas últimas lisadas por sonicación para obtener

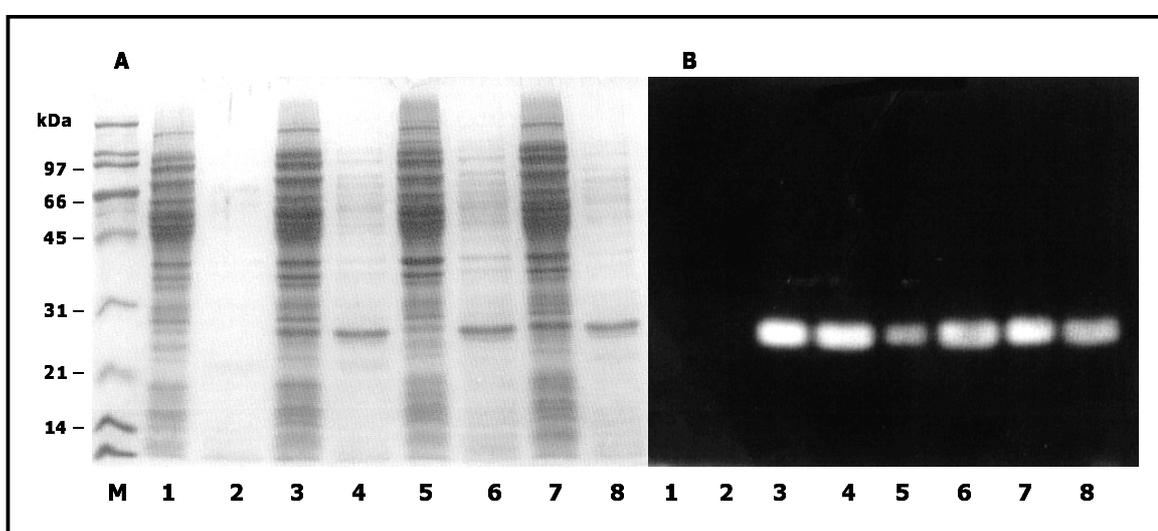
los extractos celulares correspondientes. Se determinó a continuación la actividad pectato liasa en condiciones óptimas de actividad de PelA, pH 10 y 55°C, en los sobrenadantes y extractos celulares obtenidos (Fig. 3.4.8.). En todas las cepas recombinantes de *E. coli* los máximos valores de actividad se obtuvieron tras 24 h de cultivo. Las distintas cepas recombinantes mostraron niveles de producción de actividad pectato liasa aproximadamente similares, a excepción de la cepa que contenía el plásmido pN5-P22, que produjo niveles de actividad notablemente inferiores. En todas las cepas los valores de actividad detectada en los extractos celulares fueron similares a los obtenidos en los sobrenadantes, a excepción de la cepa *E. coli*/pMS-R-P22 que mostró valores de actividad extracelular aproximadamente 5 veces superiores a los encontrados en sus extractos celulares. En dicha cepa se obtuvieron valores de actividad pectato liasa total de 9,83 U/ml de cultivo. La detección de niveles importantes de actividad en los sobrenadantes de cultivo indica la existencia de lisis celular, seguramente como consecuencia de la toxicidad del enzima apuntada anteriormente.



**Figura 3.4.8.** Actividad pectato liasa de las cepas recombinantes de *Escherichia coli*. (a) Actividad enzimática en los sobrenadantes de cultivo, (b) actividad enzimática en los extractos celulares.

Las muestras de extractos crudos y sobrenadantes de las cepas recombinantes de *Escherichia coli* se analizaron a continuación mediante geles de poliacrilamida con SDS y técnicas zimográficas.

La tinción proteica de los geles mostró que los sobrenadantes y extractos crudos de todas las cepas recombinantes contenían una banda prominente de 25 kDa, correspondiente a PelA, que no se detectó en las muestras control (Fig. 3.4.9.). En los zimogramas de muestras paralelas se observó que la banda de 25 kDa presentaba actividad pectinasa, no observándose bandas de actividad en el cultivo control (Fig. 3.4.9.). La intensidad de las bandas de pectinasa detectadas en las distintas muestras fue aproximadamente similar, en concordancia con los datos de actividad enzimática expuestos.



**Figura 3.4.9.** Análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y zimograma de las cepas recombinantes de *E. coli*. (A) Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie. (B) Zimograma de actividad pectinasa. Extractos celulares (1, 3, 5 y 7) y sobrenadantes (2, 4, 6 y 8) de cultivos de *E. coli* (1, 2), *E. coli*/pMS1-P22 (3, 4), *E. coli*/pMS-R-P22 (5, 6) y *E. coli*/pP22 (7, 8).

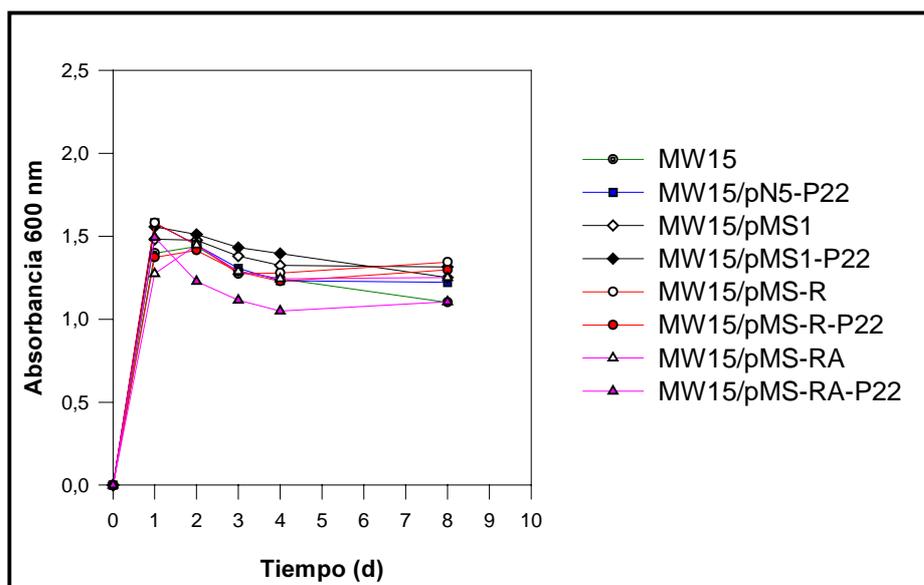
### 3.4.2.2. Expresión en *Bacillus subtilis* MW15 de la pectato liasa A clonada en los diferentes vectores lanzadera

*Bacillus subtilis* es frecuentemente considerado como un huésped idóneo para la producción y secreción de proteínas, tanto endógenas como heterólogas, debido a su capacidad secretora y rendimiento productivo (Harwood y Archibald, 1990). En el presente trabajo se utilizó la cepa *Bacillus subtilis* MW15 como huésped para la expresión de PelA, por ser deficiente en las proteasas neutra y alcalina (Wolf *et al.*, 1995).

*Bacillus subtilis* MW15 se transformó con las construcciones pN5-P22, pMS1-P22 y pMS-R-P22, derivadas de *E. coli*, y con las construcciones pMS-RA-P22 y pMS-RS-P22, procedentes directamente de ligación. Para ello se utilizó el método de transformación de protoplastos (Contente y Dubnau, 1979) y los clones transformantes se seleccionaron en placas de agar DM3 suplementadas con kanamicina, a excepción de los transformantes con la construcción pN5-P22, que fueron seleccionados en placas suplementadas con cloranfenicol. La construcción pMS-RS-P22 no se pudo introducir en la cepa huésped. Este hecho podría ser debido a la dificultad de transformar *Bacillus subtilis* a partir de ligación, o a que la pectinasa se expresaba a elevado nivel en esta construcción resultando tóxica para la cepa. Los clones que se obtuvieron con el resto de construcciones se mantuvieron por resiembra en agar LB con kanamicina o agar nutritivo con cloranfenicol. El análisis de restricción del ADN plasmídico de los clones obtenidos y su posterior secuenciación reveló que contenían las construcciones correctas.

A continuación, las cepas recombinantes de *Bacillus subtilis* MW15 se cultivaron en LB con el correspondiente antibiótico durante 8 días a 30°C. Se tomaron muestras cada 24 h, determinándose la absorbancia a 600 nm y la actividad pectinasa.

Los diferentes cepas recombinantes mostraron un crecimiento muy similar al de la cepa control *Bacillus subtilis* MW15. Los valores máximos de absorbancia a 600 nm de los diferentes cultivos se obtuvieron a las 24 h, y a partir de este momento la absorbancia fue disminuyendo ligeramente (Fig. 3.4.10.).

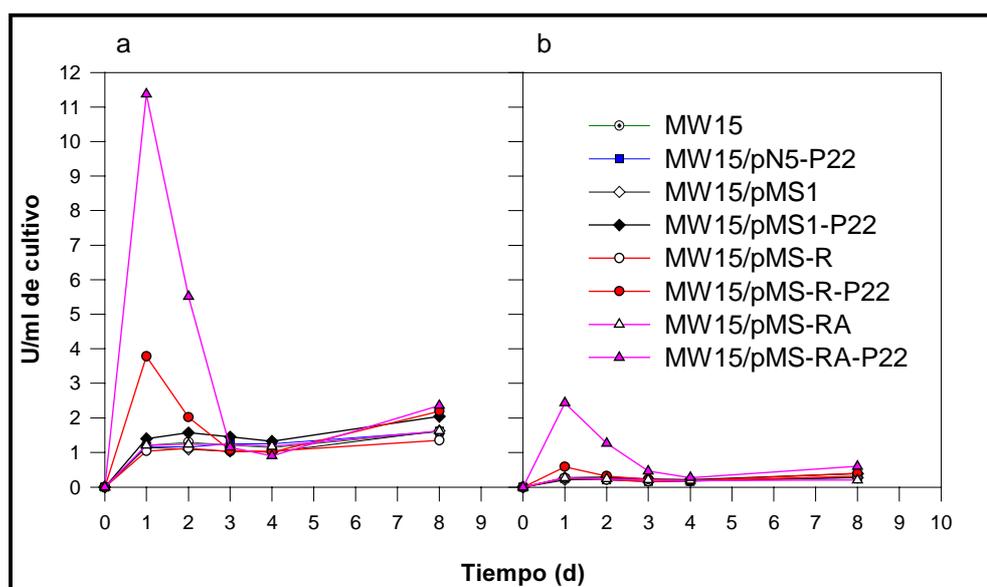


**Figura 3.4.10.** Crecimiento de los clones recombinantes de *Bacillus subtilis* MW15.

La actividad pectato liasa se determinó a pH 10 y 55°C de temperatura. En las muestras de extractos celulares se observó actividad enzimática muy baja, mientras que en las muestras de sobrenadantes se obtuvieron buenos niveles de actividad pectato liasa, que mostraron su máximo valor a las 24 h de cultivo (Tabla 3.4.2.). Los valores más altos de actividad se obtuvieron con la cepa *Bacillus subtilis* MW15/pMS-RA-P22, en la que se produjeron 13,8 U de actividad pectato liasa/ml de cultivo (Fig. 3.4.11.). Por su parte, la cepa *Bacillus subtilis* MW15/pMS-R-P22 originó valores totales de actividad pectinasa de 4,36 U/ml, mientras que las cepas que contenían los plásmidos recombinantes pN5-P22 o pMS1-P22 originaron niveles bajos de producción, sólo ligeramente superiores a los mostrados por las cepas control, que produjeron un nivel basal de actividad pectinasa autóctona.

**Tabla 3.4.2.** Actividad pectato liasa de sobrenadantes de cultivo de las cepas recombinantes de *Bacillus subtilis* MW15.

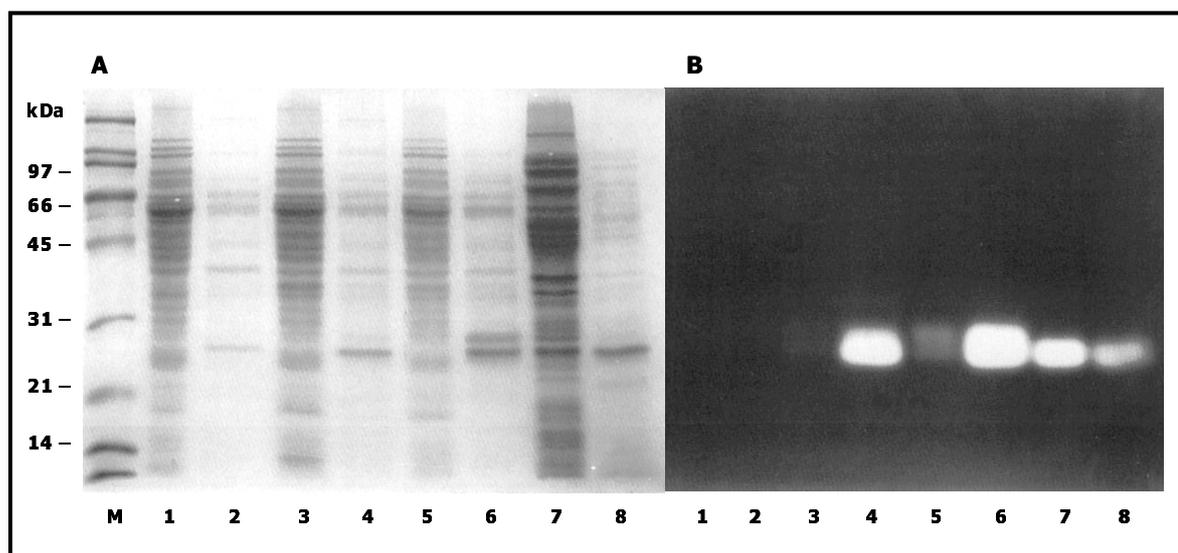
Plásmido	Días de cultivo				
	1	2	3	4	8
-	1,20	1,30	1,21	1,14	1,60
pN5-P22	1,18	1,16	1,25	1,25	1,61
pMS1	1,15	1,09	1,03	1,01	1,63
pMS1-P22	1,40	1,57	1,45	1,33	2,04
pMS-R	1,04	1,12	1,03	1,04	1,35
pMS-R-P22	3,78	2,02	1,06	1,01	2,19
pMS-RA	1,21	1,24	1,23	1,17	1,62
pMS-RA-P22	11,37	5,51	1,15	0,90	2,36



**Figura 3.4.11.** Actividad pectato liasa de las cepas recombinantes de *Bacillus subtilis* MW15. (a) Actividad enzimática en los sobrenadantes de cultivo, (b) actividad enzimática en los extractos celulares.

Los sobrenadantes y los extractos crudos de las distintas cepas recombinantes fueron analizados en geles de poliacrilamida al 12% con SDS. La tinción proteica de los geles mostró la banda de 25 kDa correspondiente a PelA en los sobrenadantes de las cepas recombinantes, mientras que como era de esperar dicha banda no se detectó en la cepa control (Fig. 3.4.12.). En los zimogramas de muestras paralelas se comprobó que la banda de 25 kDa presentaba actividad pectinasa (Fig. 3.4.12.). Es de destacar que en

el sobrenadante de *Bacillus subtilis* MW15/pMS-RA-P22, cepa que presentaba la máxima producción, se pudo observar una segunda banda proteica de 27,5 kDa que podría corresponder al precursor de PelA, con el péptido señal sin procesar (Fig. 3.4.12., calle A6). El precursor de PelA se liberaría al exterior de la célula por lisis bacteriana debida a fenómenos de toxicidad de la proteína sobreexpresada. El hecho de que la banda de actividad pectinasa detectada en los zimogramas correspondientes (Fig. 3.4.12., calle B6) sea más gruesa indica que, con toda probabilidad, se trata de una banda doble resultado de la coalescencia de las dos bandas de actividad correspondientes a la pectato liasa madura y al enzima sin el procesamiento del péptido señal.



**Figura 3.4.12.** Análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y zimograma de las cepas recombinantes de *Bacillus subtilis* MW15. (A) Tinción de proteínas con Azul Brillante de Coomassie. (B) Zimograma de actividad pectinasa. Extractos celulares (1, 3, 5 y 7) y sobrenadantes (2, 4, 6 y 8) de cultivos de *Bacillus subtilis* MW15 (1, 2), *Bacillus subtilis* MW15/pMS-R-P22 (3, 4), *Bacillus subtilis* MW15/pMS-RA-P22 (5, 6) y *Escherichia coli*/pP22 (7, 8).



## **DISCUSIÓN**



## 4. DISCUSIÓN

El objetivo principal del grupo de investigación en el que se ha desarrollado el presente trabajo es la identificación y estudio de enzimas microbianos con actividades degradadores de polímeros vegetales y su posterior evaluación en procesos industriales. En este contexto el grupo dispone de una amplia colección de microorganismos aislados a partir de suelo de arrozal, de entre los que se seleccionaron para su estudio las cepas *Paenibacillus* sp. BP-23 (Blanco y Pastor, 1993) y *Bacillus* sp. BP-7 (López *et al.*, 1998) por presentar una elevada actividad degradadora de pectina. El trabajo realizado se ha centrado en la caracterización del sistema pectinolítico de las dos cepas seleccionadas, la clonación y aislamiento de dos pectinasas de elevada actividad, así como la construcción de cepas recombinantes secretoras de pectinasas.

### 4.1. Caracterización de los sistemas pectinolíticos de *Paenibacillus* sp. BP-23 y *Bacillus* sp. BP-7

Las dos cepas microbianas objeto de estudio secretaron elevada actividad pectinolítica cuando se cultivaron en medios suplementados con pectina. En las dos cepas la máxima producción de pectinasas se obtuvo a las 48 h de cultivo, momento en que existía mayor biomasa en la mayoría de los medios ensayados. El hecho de que las cepas requieran únicamente 2 días para alcanzar una producción máxima es un factor favorable para su aplicación industrial.

De entre los distintos tipos de pectinasas despolimerizantes producidas por las cepas en estudio, tanto *Paenibacillus* sp. BP-23 como *Bacillus* sp. BP-7 produjeron como mayoritarias las actividades liasa (pectato y pectina liasa), mientras que las actividades hidrolasa (poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa) se produjeron en niveles notablemente inferiores. Estos resultados concuerdan con los descritos en *Bacillus subtilis* y otras bacterias gram positivas, que muestran liasas como enzimas pectinolíticos mayoritarios (Dave y Vaughn, 1971; Chesson y Codner, 1978; Tardy *et al.*, 1997; Zhai *et al.*, 2003). En el mismo sentido, han sido caracterizadas y clonadas diferentes pectato y pectina liasas del género *Bacillus* (Nasser *et al.*, 1993; Sakamoto *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1999b), mientras que existen muy pocos datos acerca de

hidrolasas despolimerizantes de pectina en estas bacterias (Dosanjh y Hoondal, 1996) y sólo recientemente ha sido clonada una poligalacturonasa del género *Bacillus* (Sawada *et al.*, 2001). Los resultados indicarían una preferencia por actividades despolimerizantes tipo liasa en las cepas en estudio, en concordancia con la escasez de hidrolasas bacterianas degradadoras de pectina y en contraste con la abundancia de este tipo de enzimas entre los hongos (De Vries y Visser, 2001).

En las dos cepas en estudio se detectaron niveles de actividad pectina liasas superiores a los de pectato liasa. Estos resultados contrastan con los descritos por otros autores que indican que las bacterias producen predominante pectato liasas, mientras que los hongos secretan pectina liasas preferentemente (Pitt, 1988).

El estudio del efecto de la fuente de carbono del medio en la producción de liasas por *Paenibacillus* sp. BP-23 y *Bacillus* sp. BP-7 mostró que en las dos cepas la producción fue máxima en medios suplementados con pectina. En estos medios se obtuvieron valores de actividad pectato y pectina liasa muy superiores a los obtenidos al cultivar las cepas en medios sin este polisacárido. El efecto inductor de la pectina fue muy notable en *Paenibacillus* sp. BP-23, donde la producción de actividades liasa en medios suplementados con pectina alcanzó valores hasta 300 veces superiores a los obtenidos en medios sin suplementar. En la cepa *Bacillus* sp. BP-7 los valores de producción de actividades liasa en medios suplementados con pectina fueron hasta 5 veces superiores a los observados en medios sin suplementar. Estos resultados concuerdan con los descritos en numerosas cepas microbianas donde la pectina es un buen inductor de la expresión de liasas y de pectinasas en general (Moran y Starr, 1969; De Vries y Visser, 2001). Los resultados son también similares a los descritos en cepas de *Bacillus* sp. que muestran que medios con extracto de levadura y pectina son los más apropiados para la producción de liasas (Kashyap *et al.*, 2000). La expresión de pectato liasas ha sido estudiada en *Erwinia chrysanthemi* mediante la realización de fusiones génicas de los promotores de las pectato liasas con proteínas marcadoras. Los resultados obtenidos han permitido la identificación del gen *kdgR*, regulador de la expresión de pectato liasas en *E. chrysanthemi* (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1994, 1996). En *Bacillus subtilis* se ha descrito también un gen regulador similar (Pujic *et al.*, 1998).

La glucosa ejerció un efecto negativo en la producción de liasas por *Paenibacillus* sp. BP-23, no detectándose actividad en los medios suplementados con este azúcar. Este hecho sugiere que la expresión de las liasas en la cepa está sometida a represión por catabolito, tal como se ha descrito en *E. chrysanthemi* (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996), *Amylocota* sp. (Brühlmann, 1995) y hongos como *Fusarium oxysporum*, en el que no se detectan transcritos de la pectato liasa P11 en medios con glucosa (Huertas-González *et al.*, 1999).

Por el contrario, la expresión de actividades liasa en la cepa *Bacillus* BP-7 no resultó reprimida por glucosa, detectándose elevados niveles de actividad en medios con este azúcar. La ausencia de represión catabólica de las pectato y pectina liasas en esta cepa contrasta con los resultados obtenidos con numerosas liasas microbianas citados en el párrafo anterior, pero son similares a los descritos para la pectato liasa Pel de *Bacillus subtilis* que muestra elevados niveles de expresión en medios con glucosa (Nasser *et al.*, 1990). De forma similar, en otros tipos de pectinasas microbianas, tales como algunas poligalacturonasas y protopectinasas, se han descrito varios ejemplos en los que la expresión tampoco resulta reprimida por glucosa (Riou *et al.*, 1992; Sakamoto *et al.*, 1994).

La caracterización enzimática de las actividades liasa de las cepas en estudio indica que mientras en el caso de *Paenibacillus* sp. BP-23 las preparaciones enzimáticas crudas requieren calcio para despolimerizar tanto el ácido poligalacturónico como la pectina, las muestras de *Bacillus* sp. BP-7 únicamente requieren calcio para degradar el ácido poligalacturónico. Una de las diferencias entre las pectato liasas y las pectina liasas descritas hasta la fecha es el absoluto requerimiento de calcio para la actividad de las pectato liasas, mientras que las pectina liasas no requieren calcio para su actividad enzimática (Jurnak *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos indicarían que la cepa *Bacillus* sp. BP-7 produce auténticas pectina y pectato liasas, mientras que *Paenibacillus* sp. BP-23 produciría únicamente pectato liasas. La realización de los ensayos de actividad liasa con preparaciones enzimáticas crudas permitiría la actividad simultánea de varios tipos de pectinasas presentes en las muestras. En el caso de la cepa *Paenibacillus* sp. BP-23, la actividad liasa detectada sobre pectina, que requería calcio, podría no corresponder a la despolimerización de pectina, sino a la despolimerización de ácido poligalacturónico procedente de la pectina de la mezcla de reacción, que habría

sido desmetilada previamente por pectinesterasas que también estarían presentes en las preparaciones enzimáticas crudas. Alternativamente, la pectina podría ser desesterificada de forma espontánea al pH de la reacción enzimática (pH 10) hasta ácido poligalacturónico, tal como sugieren Brown *et al.* (2001), y por tanto la actividad liasa encontrada sobre pectina en el caso de *Paenibacillus* sp. BP-23 correspondería realmente a pectato liasas. Por último, hay que indicar que algunas pectato liasas, además de despolimerizar el ácido poligalacturónico, pueden degradar la pectina aunque con menor actividad específica (Tardy *et al.*, 1997). Es posible por tanto que la actividad pectina liasa mostrada por *Paenibacillus* sp. BP-23 corresponda a pectato liasas con actividad sobre pectina.

El análisis del sistema pectinolítico de *Paenibacillus* sp. BP-23 mediante geles de poliacrilamida con SDS y zimogramas mostró una multiplicidad de bandas de actividad pectinasa. Se visualizaron 5 bandas de actividad de pesos moleculares 25, 32, 38, 44 y 53 kDa. Todas las bandas mostraron actividad a pH 10 y 7, mientras que tres de ellas, las bandas de 32, 44 y 53 kDa, presentaron también actividad a pH 5. La banda de 32 kDa fue la única que se detectó en medios de cultivo sin suplementar, mientras que el resto de bandas de actividad sólo aparecieron en los medios suplementados con pectina, indicando por tanto que corresponden a enzimas inducidos por dicho polisacárido.

Cuando el sistema pectinolítico de *Paenibacillus* sp. BP-23 fue analizado mediante geles de isoelectroenfoque y zimogramas desarrollados a pH 10, se visualizaron 6 bandas de actividad pectinasa. La detección de mayor número de bandas de actividad en los zimogramas de geles de isoelectroenfoque que en los de geles de poliacrilamida con SDS es relativamente frecuente y puede indicar heterogeneidad en algunos enzimas. La producción de diferentes isoenzimas del mismo producto génico se ha descrito en muchos microorganismos, tal como *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia carotovora*, donde los diferentes isoenzimas de pectato liasas y poligalacturonasas pueden diferir ampliamente en su punto isoeléctrico (Collmer, 1987; Guevara *et al.*, 1997). Cuando los zimogramas de geles de isoelectroenfoque se desarrollaron a pH 5, únicamente se observaron 3 bandas de actividad de pI 5,7, 8,5 y  $\geq 9,0$ . Estas bandas corresponderían a las 3 bandas activas a pH 5 observadas en los zimogramas de los

geles de poliacrilamida con SDS. La banda de  $pI \geq 9$  debe corresponder a la banda de 32 kDa ya que fue la única que se detectó en medio de cultivo sin suplementar.

La banda de actividad pectinasa de 25 kDa corresponde a la pectato liasa A (PelA), clonada y caracterizada en el presente trabajo (capítulo 2 de resultados), que presenta alta actividad sobre ácido poligalacturónico y sobre pectina de alto grado de metilación, constituyendo por tanto un nuevo tipo de pectato liasa. El hecho de que los zimogramas fueron realizados en presencia de calcio 1,5 mM, condiciones que inhiben a las poligalacturonasas, conjuntamente con los bajos niveles de actividad hidrolasa producidos por la cepa *Paenibacillus* sp. BP-23, sugiere que todas las bandas observadas en los zimogramas corresponden a liasas. Dado que tal como se ha indicado anteriormente, *Paenibacillus* sp. BP-23 únicamente producía pectato liasas, las distintas bandas de actividad deben corresponder a pectato liasas que, de forma similar a PelA, presentan actividad simultánea sobre ácido poligalacturónico y sobre pectina. Estas pectato liasas diferirían entre sí en el rango de pH de actividad y en su expresión, inducida o no por pectina. Los resultados obtenidos indican que *Paenibacillus* sp. BP-23 posee un sistema complejo para degradar la pectina, con una batería de pectato liasas, despolimerizadoras de dicho polisacárido.

La multiplicidad de pectato liasas producidas por *Paenibacillus* sp. BP-23 tiene paralelismo con los sistemas multienzimáticos degradadores de pectina descritos en varios microorganismos. En *Erwinia chrysanthemi* se han clonado y caracterizado al menos 8 pectato liasas, todas ellas productos génicos distintos, que difieren, entre otros caracteres, en cuanto a especificidad de sustrato y regulación de expresión (Shevchik *et al.*, 1999b ; Tardy *et al.*, 1997; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). *Fusarium solani* también presenta múltiples genes de pectato liasa, habiéndose clonado y caracterizado cuatro pectato liasas diferentes (Guo *et al.*, 1996). La multiplicidad de enzimas degradadores de pectina presentes en los microorganismos pectinolíticos también incluye a las poligalacturonasas, habiéndose descrito en el caso de *Aspergillus niger* hasta 7 poligalacturonasas distintas (Pařenicová *et al.*, 1998, De Vries y Visser, 2001).

El análisis zimográfico del sistema pectinolítico de *Bacillus* sp. BP-7 mostró también un patrón múltiple con varias bandas de actividad pectinasa. Se observaron 4 bandas de actividad de pesos moleculares 28, 42, 56 y 63 kDa, todas ellas con

actividad en el rango de pH entre 5 y 10. Las bandas de 42 y 56 kDa se produjeron en todos los medios de cultivo ensayados, incluyendo los suplementados con glucosa, indicando expresión constitutiva. Por el contrario, las otras dos bandas, de 28 y 63 kDa, aparecieron únicamente en medios con pectina indicando que su expresión era inducida por éste polisacárido. Similarmente a estos resultados, numerosos microorganismos producen pectato liasas tanto de expresión constitutiva como de expresión inducible. Este es el caso de *Fusarium solani*, donde la expresión de *pelA* es inducida por pectina y la expresión de *pelB* es constitutiva (Guo *et al.*, 1996). Los análisis zimográficos del sistema pectinolítico de *Bacillus* sp. BP-7 mediante geles de isoelectroenfoque mostraron 3 bandas de actividad de pI 7,8, 8,5 y  $\geq 9,0$ . Dado que la última de estas bandas de pI  $\geq 9,0$  corresponde al límite de pH superior del gel, posiblemente sea el resultado de la coalescencia de varias bandas de actividad de pI superiores a 9. Las bandas de actividad pectinasa detectadas en la cepa *Bacillus* sp. BP-7 corresponderían a liasas, aunque los resultados obtenidos no permiten inferir si a pectato liasas o a pectina liasas. Los sobrenadantes de la cepa en estudio muestran actividad pectina liasa en presencia del quelante de calcio EDTA, resultado que indicaría que la cepa produce auténticas pectina liasas. Por este motivo, proponemos que el sistema degradador de pectina de *Bacillus* sp. BP-7 contiene tanto pectina liasas como pectato liasas.

#### **4.2. Caracterización de PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis***

La caracterización de las cepas en estudio mostró que *Paenibacillus* sp. BP-23 posee un elevado poder pectinolítico y secreta un sistema multienzimático para degradar la pectina. Nos propusimos el aislamiento y estudio de los diferentes enzimas degradadores. Para ello, realizamos un escrutinio de la genoteca de *Paenibacillus* sp. BP-23 en *Escherichia coli*, construida previamente en el grupo de investigación (Blanco *et al.*, 1996), para aislar clones recombinantes con actividad pectinasa. Como resultado de dicho escrutinio se aisló el clon recombinante *E. coli*/pP22 que expresaba la pectato liasa PelA.

Las pectato liasas conocidas presentan habitualmente un pH de actuación entre 8 y 10. Se ha descrito que en estas condiciones alcalinas pueden hidrolizarse de forma

espontánea los enlaces éster que unen los grupos metilo al ácido poligalacturónico en las pectinas esterificadas (Daas *et al.*, 1998). Dicho proceso de saponificación puede tener lugar durante el contacto del tampón con el sustrato en el transcurso de las determinaciones enzimáticas y dar lugar a conclusiones erróneas en cuanto a valores de actividad sobre pectinas esterificadas. Brown *et al.* (2001) demostraron que la saponificación era insignificante en intervalos de tiempo inferiores a 10 min, aunque transcurrido este tiempo podía ser significativa en el rango de pH entre 9,5 y 10,5. Los estudios de especificidad de sustrato que se realizaron con las pectinasas clonadas mostraron claramente la influencia que el tiempo de contacto enzima-sustrato a pH 10 puede tener en los resultados que se obtienen.

En el caso de PelA, cuando los diferentes sustratos ensayados (ácido poligalacturónico y pectinas de diferentes grados de metilación) se mantuvieron, previamente a las determinaciones enzimáticas, en tampón a pH 10 intervalos de tiempo superiores a una hora, se observó preferencia por las pectinas en lugar del ácido poligalacturónico. Sin embargo, cuando los sustratos permanecieron a pH 10 únicamente durante la realización de los ensayos enzimáticos (menos de 10 min), el enzima mostró máxima actividad sobre ácido poligalacturónico y pectina del 22% de metilación (actividad aproximadamente idéntica). La actividad disminuyó a medida que aumentaba el grado de metilación de la pectina, y sobre pectina del 89% de metilación se observó el 40% de la actividad máxima.

La especificidad de sustrato de la mayoría de las pectato liasas descritas hasta el momento consiste en que degradan ácido poligalacturónico como sustrato preferido, pero también degradan pectinas, aunque con actividad decreciente a medida que aumenta su grado de metilación, no siendo activas sobre pectinas altamente metiladas (Burns, 1991; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1999a, b, 2000; Hatada *et al.*, 2001). Sin embargo, se han caracterizado algunas pectato liasas, como PelB y PelC de *Erwinia chrysanthemi*, que aunque muestran elevada actividad sobre ácido poligalacturónico, presentan la máxima actividad específica sobre pectinas con bajo grado de metilación (7-22%), y muestran actividad, aunque muy reducida, sobre pectinas de elevada metilación (Tardy *et al.*, 1997). PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23, por el contrario, presenta una especificidad de sustrato singular al presentar actividad elevada tanto sobre ácido poligalacturónico como sobre pectina altamente metilada. La

actividad sobre pectina de elevado grado de metilación podría indicar que el enzima clonado es una pectina liasa. Sin embargo, las pectina liasas conocidas presentan actividad creciente a medida que el grado de metilación de la pectina aumenta, y no muestran actividad significativa sobre ácido poligalacturónico. Adicionalmente, las pectina liasas no suelen requerir  $\text{Ca}^{2+}$  para su actividad, mientras que el enzima clonado no muestra actividad en ausencia de este ión. De los resultados obtenidos podemos concluir que PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 es una pectato liasa con una inusual alta actividad sobre pectina de alto grado de metilación.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de PelA con las presentes en las bases de datos Swissprot y EMBL muestra que el enzima clonado presenta homología con las pectato liasas pertenecientes a la familia PL3, indicando que pertenece a dicha familia de polisacárido liasas. PelA muestra la homología más elevada con la pectato liasa Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-P15, con la que presenta el 76% de identidad (Hatada *et al.*, 2000). El análisis de los dominios proteicos de PelA mediante los programas Prodom de NCBI y Pfam indica que el enzima presenta el dominio característico de las pectato liasas de la familia PL3.

La comparación de secuencia con las pectato liasas Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-P15 y PelC de *Erwinia chrysanthemi* (perteneciente a la familia PL1), enzimas cuya estructura cristalina ha sido determinada (Akita *et al.*, 2001; Yoder *et al.*, 1993), ha permitido identificar los aminoácidos de PelA potencialmente involucrados en la catálisis por reacción de  $\beta$ -eliminación. Dichos residuos corresponderían a Arg<sup>157</sup>, que actuaría como base catalítica o abstrayente de protones; Lys<sup>154</sup>, que mediaría la interacción con el sustrato (podría actuar hipotéticamente como donador de protones al oxígeno glucosídico); y Lys<sup>132</sup>, que estabilizaría el intermediario de reacción. La comparación de secuencia también ha permitido identificar una serie de residuos que actuarían como ligandos de los dos iones calcio esenciales para la catálisis y para el mantenimiento de la estructura del enzima. Estos residuos son Asp<sup>88</sup>, Glu<sup>108</sup>, Asp<sup>109</sup>, Asp<sup>105</sup>, Val<sup>106</sup>, Lys<sup>128</sup> y Gly<sup>59</sup>. La comparación de secuencia con Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-P15 ha permitido identificar en PelA los residuos Cys<sup>92</sup> y Cys<sup>96</sup>, que establecerían un puente disulfuro responsable de conectar láminas  $\beta$  adyacentes y del mantenimiento de la estabilidad estructural de la hélice  $\beta$  en este enzima (Akita *et al.*, 2001).

PelA, similarmente al resto de las pectato liasas de la familia PL3, no presenta las tres regiones conservadas en la superfamilia de las pectato liasas (Heffron *et al.*, 1995; Henrissat *et al.*, 1995), que se han propuesto como esenciales para la catálisis y/o el mantenimiento de la integridad de la estructura proteica. Este hecho indica que PelA y las pectato liasas de la familia PL3 tienen unos rasgos moleculares y estructurales claramente distintos al resto de polisacárido liasas.

Las pectato liasas de la familia PL3 suelen presentar mayor actividad sobre pectina que sobre ácido poligalacturónico. En este sentido, PelI de *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik *et al.*, 1997) y PelB de *Erwinia carotovora* (Heikinheimo *et al.*, 1995) muestran su máxima actividad sobre pectina de grado de metilación intermedio, 45% y 68% respectivamente, y presentan sobre ácido poligalacturónico una actividad muy baja o indetectable. Sin embargo, el hecho de requerir  $\text{Ca}^{2+}$  para su actividad y la no preferencia por pectina altamente metilada (93% de metilación) hace que estos dos enzimas se clasifiquen entre las pectato liasas. PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 difiere de estos enzimas en que el grado de metilación no afecta notablemente a la actividad del enzima, presentando alta actividad tanto sobre ácido poligalacturónico como sobre las diferentes pectinas. Este hecho convierte a PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 en un enzima único entre las pectato y pectina liasas existentes.

Como se ha mencionado anteriormente, PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 muestra elevada homología con la pectato liasa Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-15 (Hatada *et al.*, 2000). Este enzima ha sido purificado y caracterizado previamente, mostrando un tamaño (26 kDa), pI (10,3) y condiciones óptimas de actividad (50-55°C y pH 10,5) (Kobayashi *et al.*, 1999b) similares a PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23, que muestra un peso molecular de 25 kDa,  $\text{pI} \geq 9$ , y temperatura y pH óptimos de 55°C y 10, respectivamente. Sin embargo, en cuanto a especificidad de sustrato, Pel-15 muestra diferencias significativas con PelA ya que presenta una clara preferencia por el ácido poligalacturónico y exhibe muy poca actividad sobre pectinas (15, 4,4 y 2,7% de la actividad máxima sobre pectina del 28, 67 y 93% de metilación, respectivamente). En contraste con la similitud de secuencia con Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-15, PelA no muestra homología significativa con la pectato liasa y pectina liasa de *Bacillus subtilis*, clonadas y caracterizadas previamente (Nasser *et al.*, 1990, 1993; Sakamoto *et al.*, 1996). Dichos enzimas pertenecen a la familia PL1 de polisacárido liasas y muestran

propiedades distintas a PelA. De esta forma, la pectato liasa de *Bacillus subtilis* tiene un peso molecular y pI (42 kDa y 9,6), y unas propiedades enzimáticas (temperatura y pH óptimo de 42°C y 8,4) (Nasser *et al.*, 1990) claramente distintas a PelA, no disponiéndose de datos acerca de su especificidad de sustrato. La comparación de secuencia de PelA con proteínas de *Bacillus* y otros gram positivos endosporulados aeróbicos, mostró 56% de homología con la pectato liasa de *Bacillus* sp. P-2850 (spTREMBL Q8L0R5), enzima que no ha sido caracterizado hasta la fecha, y 54% de homología con la proteína deducida del gen *yvpA*, identificada en el genoma de *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.*, 1997), cuya función es desconocida.

La elevada homología encontrada con la hipotética proteína codificada por *yvpA* indicaba que, con toda probabilidad, este gen se expresaba para dar lugar a una proteína con actividad pectato liasa. Con el fin de comprobar la existencia de la hipotética proteína, se procedió a su clonación por amplificación por PCR mediante cebadores que se diseñaron a partir de las secuencias flanqueantes del gen *yvpA*. El resultado de la amplificación fue positivo para todas las cepas de *Bacillus subtilis* utilizadas como molde, de entre las que se escogió *Bacillus subtilis* 168 para la clonación del enzima. El clon recombinante obtenido presentó actividad degradadora de pectina, demostrando por ello que *yvpA* codifica una pectinasa.

La caracterización enzimática reveló que YvpA de *Bacillus subtilis* 168 presenta actividad sobre ácido poligalacturónico y sobre pectinas de alto grado de metilación, muestra un absoluto requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  para degradar ambos tipos de sustratos, y no presenta actividad creciente conforme el grado de metilación de la pectina aumenta, hechos que indican claramente que el enzima clonado es una pectato liasa. Similarmente a PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23, YvpA es una pectato liasa con una inusual gran actividad sobre pectinas de elevado grado de metilación. La diferencia más importante con PelA radica en que YvpA presenta como sustrato preferido pectina del 22% de metilación y exhibe sobre dicho sustrato una actividad 3 veces superior a la mostrada sobre ácido poligalacturónico.

La comparación de secuencia con la de pectato liasas cristalizadas permitió también identificar en el caso de YvpA los residuos básicos Lys<sup>133</sup>, Lys<sup>155</sup> y Arg<sup>158</sup>, que

estarían directamente involucrados en la catálisis, y los residuos Asp<sup>89</sup>, Glu<sup>109</sup>, Asp<sup>110</sup>, Asp<sup>106</sup>, Val<sup>107</sup>, Lys<sup>129</sup> y Gly<sup>60</sup>, que actuarían como ligandos de calcio.

YvpA no muestra una homología significativa con la pectato liasa ni con la pectina liasa de *Bacillus subtilis* (Nasser *et al.*, 1993; Sakamoto *et al.*, 1996). Dado que en *Bacillus subtilis* no se han descrito hasta la fecha hidrolasas despolimerizadoras de pectina, YvpA es la tercera pectinasa que se identifica en esta especie, hecho que permitiría denominarla como PelC de *Bacillus subtilis*. Similarmente a PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23, YvpA sólo presenta homología significativa con dos pectinasas del género *Bacillus*, la pectato liasa de *Bacillus* sp. KSM-15 (Hatada *et al.*, 2000) y la pectato liasa de *Bacillus* sp. P-2850 (spTREMBL Q8L0R5), con los que muestra el 73 y 54% de identidad, respectivamente.

Las dos pectato liasas caracterizadas en el presente trabajo, PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*, constituyen 2 enzimas muy homólogos (54% de identidad) de la familia PL3 de polisacárido liasas. En cuanto a su tamaño aparente (25 kDa en los dos casos) es similar a muchas pectato liasas de la familia PL3, como la anteriormente mencionada Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-15, P11 de *Fusarium oxysporum* (Huertas-González *et al.*, 1999) y PelA, PelB, PelC y PelD de *Fusarium solani*, (Guo *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1995a, b; González-Candelas y Kolattukudy, 1992). Sin embargo, otros enzimas de esta familia, como PelB de *Erwinia carotovora* (Heikinheimo *et al.*, 1995) y PelI de *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik *et al.*, 1997), presentan tamaños superiores (35 y 34 kDa, respectivamente). Los pI de PelA e YvpA son  $\geq 9$  y 8,6, respectivamente, en el rango de valores de pI de las pectato liasas de esta familia que suele oscilar entre 8 (Pel-3 de *Erwinia carotovora*, Liu *et al.*, 1994) y 10,3 (Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-15, Kobayashi *et al.*, 1999b).

Los parámetros de temperatura y pH óptimos de actividad de PelA e YvpA (55°C, pH 10 y 65°C, pH 10, respectivamente) son similares a los mostrados por muchas pectato liasas, incluidas las de la familia PL3, que suelen presentar pH óptimo cercano a pH 9 (Brown *et al.*, 2001, Herron *et al.*, 2003). El elevado pH de actividad de las pectato liasas parece relacionado con la presencia en el centro activo de estos enzimas de un residuo de arginina desprotonado que actúa como abstrayente de protones en el mecanismo de rotura del enlace glucosídico por  $\beta$ -eliminación (Charnock *et al.*, 2002).

El alineamiento de las pectato liasas de la familia PL3 ha permitido identificar cuatro regiones o bloques de residuos conservados en los enzimas de esta familia (Shevchik *et al.*, 1997). Es de destacar que las dos pectato liasas caracterizadas en este trabajo, conjuntamente con las pectato liasa Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-15 y la pectato liasa de *Bacillus* sp. P-2850, muestran únicamente 3 de estas cuatro regiones conservadas. En la zona correspondiente a la cuarta región conservada de la familia PL3, que no se presenta en estas pectato liasas, el análisis de dominios proteicos con el programa Prodom de NCBI ha identificado el dominio ID: PD346936 (que abarca en el caso de PelA desde el residuo 171 al 222) que se halla únicamente en estas pectato liasas, es decir, en PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23, YvpA de *Bacillus subtilis*, Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-15 y la pectato liasa de *Bacillus* sp. P-2850. Estas 4 pectato liasas presentan una homología en su composición de aminoácidos superior al 50% de identidad y presentan un bajo contenido en residuos de cisteína (1-3), en contraste con el resto de enzimas de la familia PL3, tal como PelA, B, C y D de *Fusarium solani*, PelB y Pel-3 de *Erwinia carotovora* y PelI de *Erwinia chrysanthemi*, que muestran un elevado contenido en residuos de cisteína (entre 10 y 14). Estos resultados indican que PelA e YvpA, junto con Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-15 y la pectato liasa de *Bacillus* sp. P-2850 forman un subgrupo de homología dentro de la familia PL3 de pectato liasas. La presencia del dominio mencionado anteriormente, en lugar de la cuarta región conservada, puede determinar características enzimáticas propias, por identificar, al subgrupo de pectato liasas que contiene a los dos enzimas estudiados. PelA e YvpA presentan como característica más notable su elevada actividad tanto sobre ácido poligalacturónico como sobre pectinas altamente metiladas (89% de metilación), propiedad que las convierten en enzimas únicos entre las polisacárido liasas descritas hasta la fecha. Sin embargo, dentro de este rasgo común existen diferencias entre la especificidad de sustrato de las dos pectato liasas. La actividad de PelA está poco influida por el grado de metilación del sustrato, mientras que YvpA muestra una clara preferencia por pectina del 22% de metilación. La especificidad de sustrato de YvpA tiene cierto paralelismo con la especificidad de la pectato liasa PelI de *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik *et al.*, 1997), enzima de la familia PL3 anteriormente citado, que muestra su máxima actividad sobre pectina de 45% de metilación. Sin embargo PelI presenta muy baja actividad sobre ácido poligalacturónico, mientras que YvpA exhibe sobre este sustrato el 29% de la actividad máxima.

Las características inusuales de PelA e YvpA en cuanto a especificidad de sustrato no son compartidas por los otros dos enzimas del subgrupo de homología descrito. Mientras que de la pectato liasa de *Bacillus* sp. P-2850 no se han publicado datos de actividad, Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-15, contrariamente a PelA e YvpA, muestra una clara preferencia por ácido poligalacturónico y únicamente presenta sobre pectina de elevada metilación el 2,7% de la actividad máxima.

Con el fin de caracterizar mejor la actividad enzimática de los dos enzimas en estudio se analizaron los productos de degradación liberados a partir de ácido poligalacturónico, pectinas y ácido trigalacturónico. En cuanto a la acción sobre los sustratos poliméricos (ácido poligalacturónico y pectinas), PelA e YvpA mostraron patrones similares de productos de degradación. Los productos mayoritarios fueron en los dos casos ácido digalacturónico y ácido trigalacturónico insaturados, y oligómeros insaturados de longitud superior. La liberación a partir de los sustratos poliméricos de una mezcla de productos de degradación, muchos de ellos de longitud superior a dos monómeros, indica que los dos enzimas tienen un modo de acción endo, es decir, son endopectato liasas. El modo de actuación de PelA e YvpA es similar al de la pectato liasa A de *Clostridium cellulovorans* (Tamaru y Doi, 2001), PelB y PelD de *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik *et al.*, 1997), miembros de la familia PL1 de pectato liasas, PelL de *Erwinia chrysanthemi* (Lojkowska *et al.*, 1995), de la familia PL9, y PelI de *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik *et al.*, 1997), de la familia PL3, que presentan todas ellas modo de acción endo. Por el contrario, PelX y PelW de *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik *et al.*, 1999a, b), de las familias 9 y 2, respectivamente, presentan modo de acción exo, liberando ácido digalacturónico insaturado como único producto de degradación del ácido poligalacturónico. Con respecto a la actividad sobre ácido trigalacturónico los enzimas en estudio presentan diferentes resultados. Mientras que PelA no muestra actividad sobre este sustrato, YvpA degrada el ácido trigalacturónico a ácido galacturónico y ácido digalacturónico insaturado. La falta de degradación del ácido trigalacturónico por parte de PelA es similar al comportamiento de la endopectato liasa de *Clostridium cellulovorans*, mientras que la degradación de este sustrato por YvpA es semejante a lo descrito para las exopectato liasas PelW y PelX de *Erwinia chrysanthemi*. La falta de resultados publicados acerca del reconocimiento del ácido trigalacturónico como sustrato por otras endo y exo pectato liasas no permite extraer

conclusiones de la discrepancia de comportamiento entre PelA e YvpA sobre este oligómero.

Los estudios realizados indican que PelA e YvpA son enzimas nuevas, con características diferentes a las pectato liasas conocidas, que permiten identificar un subgrupo de enzimas dentro de las pectato liasas de la familia PL3, que formarían un nuevo tipo de pectato liasas. La elevada actividad sobre pectina de los dos enzimas estudiados en este trabajo los hace buenos candidatos para aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la degradación de pectina de sustratos naturales.

### **4.3. Producción de PelA en *Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* se utiliza frecuentemente en la industria para la producción de proteínas y enzimas. Dada su no patogenicidad, su elevada capacidad de secreción y rendimiento productivo, así como los conocimientos en tecnología de fermentación de que se dispone actualmente, *Bacillus subtilis* se considera un huésped atractivo para la secreción de proteínas tanto endógenas como heterólogas (Harwood y Archibald, 1990).

La caracterización de las pectato liasas PelA e YvpA reveló que los dos enzimas mostraban por una parte propiedades moleculares de gran interés y por otra tenían características compatibles con procesos industriales, dada su elevada actividad sobre pectinas y su relativa estabilidad. Por este motivo, y para posibilitar la realización de ensayos de aplicación industrial, se abordó la clonación de los enzimas en *Bacillus subtilis* con el objetivo de construir cepas recombinantes de elevada producción y secreción, necesarios para los ensayos industriales.

Como primera etapa se procedió a construir una serie de vectores lanzadera *Escherichia coli-Bacillus subtilis* que facilitasen la manipulación genética de las pectato liasas. Todos los vectores construidos derivaban de pUC19, para el mantenimiento en *Escherichia coli*, y contenían la región de multiclonaje de este plásmido. Para el mantenimiento en *Bacillus subtilis* se utilizó pUB110 (de alto número de copia) en el caso del vector pMS1. Con el fin de disminuir el tamaño y aumentar la estabilidad de los plásmidos construidos, el vector pUB110 fue delecionado en una región dispensable de 1,3 kb para dar lugar al plásmido pUB111, que se utilizó para la

construcción de los vectores lanzadera pMS-R, pMS-RA y pMS-RS. También se ensayó el vector pN5, derivado del plásmido pC194, construido previamente en el grupo de investigación. Para facilitar la expresión de los genes clonados, en ocasiones se utilizaron los promotores P-*spo2* (del fago SPO2, Williams *et al.*, 1981) y P-*amy* (de la  $\alpha$  amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, Palva *et al.*, 1981), y también en ocasiones el terminador de transcripción *rrnB* de *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1981).

Se procedió a continuación a clonar PelA en los distintos vectores por ser el enzima caracterizado en el presente trabajo con mayor actividad sobre un rango más amplio de pectinas. Debido a la baja frecuencia de transformación cuando se utiliza *Bacillus subtilis* como primer huésped, la clonación se realizó en primer lugar en *Escherichia coli* para después transferir los plásmidos recombinantes a *Bacillus subtilis*. De forma sorprendente, todas las cepas recombinantes de *Escherichia coli* obtenidas mostraron mayor actividad pectato liasa en los sobrenadantes de cultivo que en los extractos celulares. En concreto, el clon *Escherichia coli*/pMS-R-P22 mostró 8,31 U/ml liberadas al medio y 1,52 U/ml en los extractos celulares. El hecho de que en *E. coli* los niveles de actividad detectados en el medio fueran superiores a los detectados en el compartimento intracelular indicarían que PelA es tóxica a *E. coli* y su producción en cantidades elevadas causa lisis celular. Estos resultados concuerdan con los descritos por otros autores que muestran la toxicidad en *Escherichia coli* de pectinasas de *Bacillus subtilis* (Nasser *et al.*, 1990) o *Pseudomonas cellulosa* (McKie *et al.*, 2001), sugiriendo que las pectinasas no serían estables o serían letales para la bacteria entérica. También se ha advertido que altos niveles de expresión de varias glucosil hidrolasas de *Pseudomonas cellulosa* son letales en *Escherichia coli* debido a la ausencia de secreción de éstas (Braithwaite *et al.*, 1997; McKie *et al.*, 1997). La toxicidad de la pectinasa en *E. coli* explicaría la falta de obtención de recombinantes con las construcciones pMS-RA-P22 y pMS-RS-P22. Estas construcciones teóricamente causarían la máxima expresión del enzima al contener *pelA* bajo el control de los promotores fuertes P-*amy* o P-*spo2*, con los que se han descrito excelentes niveles de producción heteróloga (Van Leen *et al.*, 1991; Inoue *et al.*, 2002; Overbeeke *et al.*, 1990), y delante del terminador de transcripción *rrnB*, que garantizaría la obtención de transcritos del tamaño correcto.

Para expresar la pectinasa en *Bacillus subtilis* se eligió como huésped la cepa MW15, deficiente en las proteasas neutra y alcalina, las dos proteasas mayoritarias en

*Bacillus subtilis* (Wolf *et al.*, 1995). La máxima producción y secreción de actividad pectato liasa se obtuvo con la cepa recombinante *Bacillus subtilis* MW15/pMS-RA-P22 con la que se secretaron 11,37 U/ml de cultivo. Dichos niveles de secreción, siendo importantes, fueron sólo ligeramente superiores a los niveles de actividad de las cepas recombinantes de *E. coli* construidas. Es interesante destacar que la cepa *Bacillus subtilis* MW15/pMS-RA-P22 presentó un máximo de secreción a las 24 horas de cultivo, pero que los valores de actividad disminuyeron drásticamente tras dicho momento (48,5 y 10,1% del máximo al segundo día y tercer día, respectivamente). Teniendo en cuenta que el promotor P-*amy* del plásmido recombinante pMS-RA-P22 es activo durante la fase estacionaria (Fahnestock y Fisher, 1986) y teniendo en cuenta también que en la cepa original *Paenibacillus* sp. BP-23 la secreción de pectinasas se mantiene en niveles elevados al menos los tres primeros días de cultivo, la aparición de un pico agudo de producción y secreción a las 24 horas de cultivo parece indicar que la expresión elevada de PelA resulta tóxica a la cepa huésped *Bacillus subtilis* MW15. En concordancia con estos resultados, en los zimogramas de sobrenadantes de *Bacillus subtilis* MW15/pMS-RA-P22 aparece una banda gruesa de actividad, probablemente como resultado de la coalescencia de PelA madura y de un enzima con tamaño ligeramente superior, que corresponde con toda probabilidad a la pectato liasa con el péptido señal sin procesar, que aparecería en el medio por lisis celular. En este sentido se ha descrito que el procesamiento por peptidasas señal puede ser un factor limitante para la secreción en *Bacillus subtilis* (Bolhuis *et al.*, 1996; Tjalsma *et al.*, 2000). De hecho la sobreexpresión de algunas proteínas heterólogas en *Bacillus subtilis* puede originar cuerpos de inclusión (Jürgen *et al.*, 2001). La saturación de la maquinaria de secreción, conjuntamente con la toxicidad del enzima podría ser responsable de los niveles discretos de producción obtenidos. La falta de obtención de recombinantes con la construcción pMS-RS-P22 estaría en concordancia con la propuesta toxicidad del enzima.

Trabajos realizados previamente por el grupo de investigación en el que se ha realizado el presente trabajo, han mostrado la expresión eficiente de enzimas de *Paenibacillus* sp. BP-23 clonados en *Bacillus subtilis* MW15. En concreto, se han obtenido niveles altos de expresión de la xilanasas B mediante la utilización del plásmido lanzadera pRBSPO (Gallardo *et al.*, 2003). Los buenos resultados obtenidos con la

xilanasa indican que el mencionado vector posibilita la producción de determinadas proteínas en *Bacillus subtilis*. Sin embargo, la utilización de pRBSPO para la producción de la pectinasa PelA fue ensayada durante el desarrollo del presente trabajo con resultados negativos. Este hecho motivó la construcción de los nuevos plásmidos lanzadera cuyas características se han detallado. Los discretos resultados obtenidos al expresar PelA en *Bacillus subtilis* pueden estar relacionados con los problemas de toxicidad de la pectato liasa mencionados. Una alternativa para solucionar dichos problemas puede ser la utilización de promotores inducibles, como el de la levansucrasa SacB, con el que se han obtenido excelentes resultados (Wong, 1989; Petit-Glatron y Chambert, 1992) o la utilización de nuevas cepas huésped de *Bacillus subtilis*, deficientes en un número mayor de proteasas (Wu *et al.*, 1991, Wong, 1995). La obtención de niveles elevados de síntesis y secreción de enzimas heterólogos en *Bacillus subtilis* es una tarea compleja que requiere la evaluación y ensayo de un gran número de factores. Los resultados obtenidos en este trabajo suponen una aproximación a la tarea de sobreproducir pectato liasas, que han permitido la identificación de problemas específicos de la expresión de los enzimas en estudio y posibilitarán la construcción futura de nuevas cepas recombinantes de productividad y rendimiento aumentado.



## **CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

1. Se ha caracterizado la producción de enzimas degradadores de pectina por *Paenibacillus* sp. BP-23. La máxima producción y secreción de pectinasas tiene lugar en medios suplementados con pectina, ejerciendo este polisacárido un notable efecto inductor. Por el contrario, la producción de pectinasas en *Paenibacillus* sp. BP-23 está reprimida por glucosa.
2. El sistema degradador de pectina de *Paenibacillus* sp. BP-23 está constituido mayoritariamente por enzimas con actividad liasa. El requerimiento de calcio para la actividad enzimática, conjuntamente con la multiplicidad de bandas de pectinasa detectadas en los zimogramas, indica que *Paenibacillus* sp. BP-23 posee un sistema enzimático complejo para la degradación de la pectina que contiene varias pectato liasas.
3. La producción y secreción de pectinasas por la cepa *Bacillus* sp. BP-7 ha sido caracterizada. Los niveles absolutos de actividad obtenidos son notablemente inferiores a los mostrados por *Paenibacillus* sp. BP-23. La producción de pectinasas por *Bacillus* sp. BP-7 está inducida por pectina y no presenta represión por glucosa.
4. El sistema pectinolítico de *Bacillus* sp. BP-7 está constituido mayoritariamente por enzimas con actividad liasa. La ausencia de requerimiento de calcio para la actividad enzimática sobre pectina, conjuntamente con la diversidad de bandas detectadas en los zimogramas, indica que *Bacillus* sp. BP-7 posee un sistema multienzimático para la degradación de la pectina que incluye pectato liasas y pectina liasas.
5. Se ha clonado la pectato liasa PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23. La secuencia deducida de aminoácidos de *pelA* presenta homología con las polisacárido liasas de la familia PL3. El enzima muestra un tamaño aparente de 25 kDa y un punto isoeléctrico experimental igual o superior a 9.

6. La purificación y caracterización bioquímica de PelA muestra que el enzima es una pectato liasa con elevada actividad sobre pectinas, que presenta máxima actividad específica sobre ácido poligalacturónico y pectina de limón del 22% de metilación. PelA exhibe máxima actividad a 55°C y pH 10 en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  0,5 mM. El enzima muestra un modo de acción endo, liberando una mezcla de productos de reacción a partir de pectina y de ácido poligalacturónico.
7. Se ha identificado y clonado la pectato liasa YvpA de *Bacillus subtilis*, que muestra elevada homología con PelA y con las pectato liasas de la familia PL3. El enzima presenta un tamaño aparente de 25 kDa y un punto isoeléctrico experimental de 8,6.
8. La purificación y caracterización bioquímica de YvpA muestra que el enzima es una pectato liasa que presenta la máxima actividad específica sobre pectina de limón del 22% de metilación. YvpA exhibe máxima actividad a 65°C y pH 10 en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  2 mM. El enzima muestra un modo de acción endo, liberando una mezcla de productos de reacción a partir de sustratos poliméricos, y degrada el trigalacturonato a ácido galacturónico y ácido digalacturónico insaturado.
9. Los enzimas caracterizados en este trabajo, PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*, conjuntamente con Pel-15 de *Bacillus* sp. KSM-15 y la pectato liasa de *Bacillus* sp. P-2850 son enzimas de elevada similitud que constituyen un subgrupo de homología dentro de las pectato liasas de la familia PL3. Los cuatro enzimas presentan de forma exclusiva el dominio proteico PD346936 y muestran un contenido en residuos de cisteína anormalmente bajo en comparación con las pectato liasas de la familia PL3.
10. Se han realizado varias construcciones genéticas que han permitido la expresión y secreción de PelA en *Bacillus subtilis*. Los niveles de secreción obtenidos en la mayoría de las cepas recombinantes construidas no son elevados, probablemente como consecuencia de toxicidad del enzima. Los mejores resultados de secreción en *Bacillus subtilis* se han obtenido con el plásmido recombinante pMS-RA-P22 que contiene el gen *pelA* delante del terminador de transcripción *rrnB* de *Escherichia coli* y bajo el control del promotor de la  $\alpha$  amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*.

# **BIBLIOGRAFÍA**



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ACUNA-ARGUELLES, M. E., GUTIERREZ-ROJAS, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G. y FAVELA-TORESS, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**, 808-814.
- AKITA, M., SUZUKI, A., KOBAYASHI, T., ITO, S. y YAMANE, T. (2001). The first structure of pectate lyase belonging to polysaccharide lyase family 3. *Acta Crystallographica. Section D* **57**, 1786-1792.
- ALANA, A., ALKORTA, I., DOMÍNGUEZ, J. B., LLAMA, M. J. y SERRA, J. L. (1990). Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 3755-3759.
- ALKORTA, I., GARBISU, C., LLAMA, M. J. y SERRA, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Process Biochemistry* **33**, 21-28.
- AL-OBAIDI, Z. S., AZÍZ, G. M. y AL-BAKIR, A. Y. (1987). Screening of fungal strains for polygalacturonase production. *Journal of Agricultural and Water Resource of Research* **6**, 125-182.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. y LIPMAN, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.
- ASH, C., FARROW, J. A. E., WALLBANKS, S. y COLLINS, M. D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology* **13**, 202-206.
- BAJPAI, P. (1999). Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology Progress* **15**, 147-157.
- BARRAS, F., VAN GIJSEGEM, F. y CHATTERJEE, A. K. (1994). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology* **32**, 201-234.
- BATEMAN, A., COIN, L., DURBIN, R., FINN, R. D., HOLLICH, V., GRIFFITHS-JONES, S., KHANNA, A., MARSHALL, M., MOXON, S., SONNHAMMER, E. L. L., HOLME, D. J. S., YEATS, C. y EDDY, S. R. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **32**, D138-D141.
- BEG, Q. K., KAPOOR, M., MAHAJAN, L. y HOONDAL, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**, 326-338.

- BEKRI, M. A., DESAIR, J., KEIJERS, V., PROOST, P., VAN LEEUWEN, M. S., VANDERLEYDEN, J. y BROEK, A. V. (1999). *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. *Journal of Bacteriology* **181**, 2440-2447.
- BeMILLER, J. N. An introduction to pectins: Structure and properties. En FISHMAN, M. L. y JEN, J. J. (eds.). *Chemistry and Fuction of Pectins*. Washington (DC): American Chemical Society, 1986, pag. 2-12.
- BENTLEY, S. D., *et al.*, (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147.
- BHAT, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* **18**, 355-383.
- BIRNBOIM, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzimology* **100**, 243-255.
- BLANCO, A. y PASTOR, F. I. J. (1993). Characterization of cellulase-free xylanases from the newly isolated *Bacillus* sp. strain BP-23. *Canadian Journal of Microbiology* **39**, 1162-1166.
- BLANCO, A., VIDAL, T., COLOM, J. F. y PASTOR, F. I. J. (1995). Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 4468-4470.
- BLANCO, A. *Aislamiento y caracterización de Bacillus* sp. BP-23. *Purificación y clonaje de xilanasas*. Director: PASTOR, F. I. J. Barcelona: Universidad de Barcelona. Departamento de Microbiología. 1996. Tesis doctoral.
- BLANCO, A., DÍAZ, P., MARTINEZ, J., LÓPEZ, O., SOLER, C. y PASTOR, F. I. J. (1996). Cloning of a *Bacillus* sp. BP-23 gene encoding a xylanase with high activity against aryl xilosides. *FEMS Microbiology Letters* **137**, 285-290.
- BLANCO, A., DÍAZ, P., MARTINEZ, J., VIDAL, T., TORRES, A. L. y PASTOR, F. I. J. (1998). Cloning of a new endoglucanase gene from *Bacillus* sp. BP-23 and characterisation of the enzyme: Performance in paper manufacture from cereal straw. *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**, 48-54.
- BLANCO, A., DÍAZ, P., ZUECO, J., PARASCANDOLA, P. y PASTOR, F. I. J. (1999). A multidomain xylanase from a *Bacillus* sp. with a region homologous to thermostabilizing domains of thermophilic enzymes. *Microbiology* **145**, 2163-2170.
- BOLHUIS, A., SOROKIN, A., AZEVEDO, V., EHRLICH, S. D., BRAUN, P. G., DE JONG, A., VENEMA, G., BRON, S. y VAN DIJL, J. M. (1996). *Bacillus subtilis* can modulate its capacity and specificity for protein secretion through temporally controlled expression of the *sipS* gene for signal peptidase I. *Molecular Microbiology* **22**, 605-618.

- BOLIVAR, F., RODRÍGUEZ, R. L., GREEN, P. J., BETLACH, M. C., HEYNEKER, H. L., BOYER, H. W., CROSA, J. H. y FALKOW, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multi-purpose cloning system. *Gene* **2**, 95-113.
- BORIN, M. D. F., SAID, S. y FONSECA, M. J. V. (1996). Purification and biochemical characterization of an extracellular endopolygalacturonase from *Penicillium frequentans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 1616-1620.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- BRAITHWAITE, K. L., BARNA, T., SPURWAY, T. D., CHARNOCK, S. J., BLACK, G. W., HUGHES, N., LAKEY, J. H., VIRDEN, R., HAZLEWOOD, G. P., HENRISSAT, B. y GILBERT, H. J. (1997). Evidence that galactanase A and *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa* is a retaining family 53 glycosyl hydrolase in which E161 and E270 are the catalytic residues. *Biochemistry* **36**, 15489-15500.
- BRETT, C. y WALDRON, K. Cell wall structure and the skeletal functions of the wall. En BLACK, M y CHAPMAN, J. (eds.). *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. Londres: Unwin Hyman, 1990, pag. 4-57.
- BRON, S., MEIMA, R., MAARTEN VAN DIJL, J., WIPAT, A. y HARWOOD, C. R. Molecular Biology and Genetics of *Bacillus* spp. En DEMAIN, A. L. y DAVIES, J. E. (eds.). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington: American Society for Microbiology, 1999, pag. 392-416.
- BROSIUS, J., DULL, T. J., SLEETER, D. D. y NOLLER, H. F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **148**, 107-127.
- BROWN, I. E., MALLEN, M. H., CHARNOCK, S. J., DAVIES, G. J. y BLACK, G. W. (2001). Pectate lyase 10A from *Pseudomonas cellulosa* is a modular enzyme containing a family 2a carbohydrate-binding module. *Biochemical Journal* **355**, 155-165.
- BRÜHLMANN, F., KIM, K. S., ZIMMERMAN, W. y FIECHTER, A. (1994). Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2107-2112.
- BRÜHLMANN, F. (1995). Purification and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amycolata* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3580-3585.
- BRÜHLMANN, F. y KEEN, N. T. (1997). Cloning, sequence and expression of the *pel* gene from an *Amycolata* sp. *Gene* **202**, 45-51.

- BULLOCK, W. O., FERNÁNDEZ, J. M. y SHORT, J. M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-377.
- BURNS, J. K. The polygalacturonases and lyases. En WALTER, R. H. (ed.). *The Chemistry and Technology of Pectin*. San Diego (California): Academic Press, Inc., 1991, pag. 165-188.
- CAO, J., ZHENG, L. y CHEN, S. (1992). Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. *Enzyme and Microbial Technology* **14**, 1013-1016.
- CHANG, S. y COHEN, S. (1979). High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Molecular and General Genetics* **168**, 111-115.
- CHANNE, P. S. y SHEWALE, J. G. (1995). Pectinase production by *Sclerotium rolfsii*: Effect of culture conditions. *Folia Microbiologica* **40**, 111-117.
- CHARNOCK, S. J., BROWN, I. E., TURKENBURG, J. P., BLACK, G. W. y DAVIES, G. J. (2001). Characterization of a novel pectate lyase, Pel10A, from *Pseudomonas cellulosa*. *Acta Crystallographica. Section D* **57**, 1141-1143.
- CHARNOCK, S. J., BROWN, I. E., TURKENBURG, J. P., BLACK, G. W. y DAVIES, G. J. (2002). Convergent evolution sheds light on the anti- $\beta$ -elimination mechanism common to family 1 and 10 polysaccharide lyases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**, 12067-12072.
- CHEETHAM, P. S. J. Aplicación de los enzimas en la industria. En WISEMAN, A. (ed.). *Manual de Biotecnología de los Enzimas*. España: Acribia, S.A., 1985, pag. 269-368.
- CHERRY, J. R. y FIDANTSEF, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: An update. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 438-443.
- CHESSON, A. y CODNER, R. C. (1978). Maceration of vegetable by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology* **44**, 347-364.
- CLAUS, D. y BERKELEY, R. C. W. The Genus *Bacillus*. En SNEATH, P. H. A *et al.*, (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, vol. 2, pag. 1105-1139.
- COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y. y HSU, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the USA* **69**, 2110-2114.
- COLLMER, A. Pectic enzymes and bacterial invasion of plants. En KOSUGE, T. y NESTER, E. W. (eds.). *Plant-Microbe Interactions*. Nueva York: MacMillan, 1987, vol. 2, pag. 253-284.

- COLLMER, A. y KEEN, N. T. (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* **24**, 383-410.
- COLLMER, A., RIED, J. L. y MOUNT, M. S. (1988). Assay methods for pectic enzymes. *Methods in Enzimology* **161**, 329-335.
- CONSTENLA, D. y LOZANO, J. E. (2003). Kinetic model of pectin demethylation. *Latin American Applied Research* **33**, 91-96.
- CONTENTE, S. y DUBNAU, D. (1979). Characterization of plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: Kinetic properties and the effect of DNA conformation. *Molecular and General Genetics* **167**, 251-258.
- COUTINHO, P. M. y HENRISSAT, B. (1999). *Carbohydrate Active enzymes*. Disponible en: <<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>>.
- DAAS, P. J. H., ARISZ, P. W., SCHOLS, H. A., DE RUITER, G. A. y VORAGEN, A. G. J. (1998). Analysis of partially methyl-esterified galacturonic acid oligomers by high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **257**, 195-202.
- DAAS, P. J. H., MEYER-HANSEN, K., SCHOLS, H. A., DE RUITER, G. A. y VORAGEN, A. G. J. (1999). Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research* **318**, 135-145.
- DARTOIS, V., COPPÉE, J. Y., COLSON, C. y BAULARD, A. (1994). Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 1670-1673.
- DARVILL, A., McNEIL, M., ALBERSHEIM, P. y DELMER, D. P. The primary cell walls of flowering plants. En STUMPF, P. K. y CONN, E. E. (eds.). *The Biochemistry of Plants*. San Diego (Calif.): Academic Press, 1980, Vol 1, pag. 91-161.
- DAVE, B. A. y VAUGHN, R. H. (1971). Purification and properties of a polygalacturonic acid trans-eliminase produced by *Bacillus pumillus*. *Journal of Bacteriology* **108**, 166-174.
- DE VRIES, J. A., DEN UIJL, C. H., VORAGEN, A. G. J., ROMBOUTS, F. M. y PILNIK, W. (1983). Structural features of the neutral sugar side chains of apple pectic substances. *Carbohydrate Polymers* **3**, 193-205.
- DE VRIES, R. P. y VISSER, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**, 497-522.
- DOSANJH, N. S. y HOONDAL, G. S. (1996). Production of constitutive, thermostable, hyperactive exo-pectinase from *Bacillus* GK-8. *Biotechnology Letters* **18**, 1435-1438.

- DUBNAU, D. y DAVIDOFF-ABELSON, R. (1971). Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *Journal of Molecular Biology* **56**, 209-221.
- EHRLICH, S. D. (1977). Replication and expression of plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the USA* **74**, 1680-1682.
- EHRLICH, S. D. (1978). DNA cloning in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the USA* **75**, 1433-1436.
- FAHNESTOCK, S. R. y FISHER, K. E. (1986). Expression of the Staphylococcal Protein A Gene in *Bacillus subtilis* by gene fusions utilizing the promoter from a *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase gene. *Journal of Bacteriology* **165**, 796-804.
- FAVEY, S., BOURSON, C., BERTHEAU, Y., KOTOUJANSKY, A. y BOCCARA, M. (1992). Purification of the acidic pectate lyase and nucleotide sequence of the corresponding gene *pelA* of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Journal of General Microbiology* **138**, 499-508.
- FERRARI, E., JARNAGIN, A. S. y SCHMIDT, B. F. Commercial Production of Extracellular Enzymes. En SONENSHEIN, A. L., HOCH, J. A. y LOSICK, R. (eds.). *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria. Biochemistry, physiology and molecular genetics*. Washington, (D.C.): American Society for Microbiology, 1993, pag. 917-937.
- FÜRSTE, J. P., PANSEGRAU, W., FRANK, R., BLOECKER, H., SCHOLZ, P., BAGDASARIAN, M. y LANKA, E. (1986). Molecular cloning of the plasmid RP-4 primase region in a multi-host-range Tac-P expression vector. *Gene* **48**, 119-132.
- GALLARDO, O., DÍAZ, P. y PASTOR, F. I. J. (2003). Characterization of a *Paenibacillus* cell-associated xylanase with high activity on aryl-xylosidases: a new subclass of family 10 xylanases. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**, 226-233.
- GARCÍA, O., TORRES, A. L., COLOM, J. F., PASTOR, F. I. J., DÍAZ, P. y VIDAL, T. (2002). Effect of cellulase-assisted refining on the properties of dried and never-dried eucalyptus pulp. *Cellulose* **9**, 115-125.
- GERHARTZ, W. Industrial uses of enzymes. En GERHARTZ, W. (ed.). *Enzymes in Industry. Production and Applications*. Weinheim: VCH, 1990, pag. 77-149.
- GERLT, J. A., KOZARICH, J. W., KENYON, G. L. y GASSMAN, P. G. (1991). Electrophilic catalysis can explain the unexpected acidity of carbon acids in enzyme-catalysed reactions. *Journal of the American Chemical Society* **113**, 9667-9669.

- GERLT, J. A. y GASSMAN, P. G. (1992). Understanding enzyme-catalyzed proton abstraction from carbon acids details of stepwise mechanisms for beta-elimination reactions. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 5928-5934.
- GERLT, J. A. y GASSMAN, P. G. (1993). An explanation for rapid enzyme-catalyzed proton abstraction from carbon acids: Importance of late transition states in concerted mechanisms. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 11552-11568.
- GODESSART, N., MUÑOA, F. J., REGUÉ, M. y JUÁREZ, A. (1988). Chromosomal mutations that increase the production of a plasmid encoded hemolysin in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **134**, 2779-2788.
- GOMORI, G. (1955). Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods in Enzymology* **1**, 138-146.
- GONZÁLEZ-CANDELAS, L. y KOLATTUKUDY, P. E. (1992). Isolation and analysis of a novel inducible pectate lyase gene from the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating population VI). *Journal of Bacteriology* **174**, 6343-6349.
- GOODWIN, T. W. y MERCER, E. I. The plant cell wall. En GOODWIN, T. W. y MERCER, E. I. (eds.). *Introduction to Plant Biochemistry*. Oxford: Pergamon Press, 1990, pag. 55-91.
- GOTZ, F., ZABIELSKI, J., PHILIPSON, L. y LINDBERG, M. (1983). DNA homology between the arsenate resistance plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosus* and the penicillinase plasmid pI258 from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **9**, 126-137.
- GRYZAN, T. J. y DUBNAU, D. (1978). Construction and properties of chimeric plasmids in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the USA* **75**, 1428-1432.
- GUEVARA, M. A., GONZÁLEZ-JAEN, M. T. y ESTÉVEZ, P. (1997). Multiple forms of pectic lyases and polygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*: regulation of their synthesis by galacturonic acid. *Canadian Journal of Microbiology* **43**, 245-253.
- GUO, W., GONZÁLEZ-CANDELAS, L. y KOLATTUKUDY, P. E. (1995a). Cloning of a new pectate lyase gene *pelC* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **323**, 352-360.
- GUO, W., GONZÁLEZ-CANDELAS, L. y KOLATTUKUDY, P. E. (1995b). Cloning of a novel constitutively expressed pectate lyase gene *pelB* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Bacteriology* **177**, 7070-7077.

- GUO, W., GONZÁLEZ-CANDELAS, L. y KOLATTUKUDY, P. E. (1996). Identification of a novel *pelD* gene expressed uniquely in planta by *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of its protein product as an endo-pectate lyase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **332**, 305-312.
- GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V. K. y CHAUHAN, B. (2003). Microbial alpha-amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochemistry* **38**, 1599-1616.
- HANAHAN, D. (1983). Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-580.
- HARWOOD, C. R. y ARCHIBALD, A. R. Growth, Maintenance and General Techniques. En HARWOOD, C. R. y CUTTING, S. M. (eds.). *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, 1990, pag. 1-21.
- HATADA, Y., HIGAKI, N., SAITO, K., OGAWA, A., SAWADA, K., OZAWA, T., HAKAMADA, Y., KOBAYASHI, T. e ITO, S. (1999). Cloning and sequencing of a high-alkaline pectate lyase gene from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **63**, 998-1005.
- HATADA, Y., SAITO, K., KOIKE, K., YOSHIMATSU, T., OZAWA, T., KOBAYASHI, T. e ITO, S. (2000). Deduced amino-acid sequence and possible catalytic residues of a novel pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *European Journal of Biochemistry* **267**, 2268-2275.
- HATADA, Y., KOBAYASHI, T. e ITO, I. (2001). Enzymatic properties of the highly thermophilic and alkaline pectate lyase Pel-4B from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain P-4-N and the entire nucleotide and amino acid sequences. *Extremophiles* **5**, 127-133.
- HEFFRON, S., HENRISSAT, B., YODER, M. D., LIETZKE, S. y JURNAK, F. (1995). Structure-based multiple alignment of extracellular pectate lyase sequences. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**, 331-334.
- HEIKINHEIMO, R., FLEGO, D., PIRHONEN, M., KARLSSON, M. B., ERIKSSON, A., MÄE, A., KÕIV, V. y PALVA, E. T. (1995). Characterization of a novel pectate lyase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**, 207-217.
- HENRIKSSON, G., AKIN, D. E., HANLIN, R. T., RODRIGUEZ, C., ARCHIBALD, D. D., RIGSBY, L. L. y ERIKSSON, K. E. E. (1997). Identification and retting efficiencies of fungi isolated from dew-retted flax in the United States and Europe. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3950-3956.
- HENRISSAT, B., HEFFRON, S. E., YODER, M. D., LIETZKE, S. E. y JURNAK, F. (1995). Functional implications of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily. *Plant Physiology* **107**, 963-976.

- HEREDIA, A., JIMÉNEZ, A. y GUILLÉN, R. (1995). Composition of plant cell wall. *Zeitschrift für lebensmittel-untersuchung und-forschung* **200**, 24-31.
- HERRON, S. R., BENEN, J. A. E., SCAVETTA, R. D., VISSER, J. y JURNAK, F. (2000). Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 8762-8769.
- HERRON, S. R., SCAVETTA, R. D., GARRETT, M., LEGNER, M. y JURNAK, F. (2003). Characterization and implications of Ca<sup>2+</sup> binding to pectate lyase C. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 12271-12277.
- HIGGINS, D., THOMPSON, J., GIBSON, T., THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. y GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- HINTON, J. C. D., SIDEBOTHAM, J. M., GILL, D. R. y SALMOND, G. P. C. (1989). Extracellular and periplasmic isoenzymes of pectate lyase from *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* belong to different gene families. *Molecular Microbiology* **3**, 1785-1795.
- HOCH, J. A. (1991). Genetic analysis in *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology* **204**, 305-320.
- HOFF, J. E. y CASTRO, M. D. (1969). Chemical composition of potato cell wall. *Agricultural and Food Chemistry* **17**, 1328-1331.
- HOONDAL, G. S., TIWARI, R. P., TEWARI, R., DAHIYA, N. y BEG, Q. K. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**, 409-418.
- HORIKOSHI, K. Enzymes of alkalophiles. En FOGARTY, W. M. y KELLY, C. T. (eds.). *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Londres: Elsevier Applied Science, 1990, pag. 275-294.
- HORIKOSHI, K. (1999). Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 735-750.
- HORINOUCI, S. y WEISBLUM, B. (1982). Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *Journal of Bacteriology* **150**, 815-825.
- HUANG, W., MATTE, A., LI, Y., KIM, Y. S., LINHARDT, R. J., SU, H. y CYGLER, M. (1999). Crystal structure of chondroitinase B from *Flavobacterium heparinum* and its complex with a disaccharide product at 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **294**, 1257-1269.

- HUERTAS-GONZÁLEZ, M. D., RUIZ-ROLDÁN, M. C., GARCÍA MACEIRA, F. I., RONCERO, M. I. y Di PIETRO, A. (1999). Cloning and characterization of *pII* encoding an in planta-secreted pectate lyase of *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* **35**, 36-40.
- HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N., NASSER, W. y ROBERT-BAUDOY, J. (1994). Molecular characterization of the *Erwinia chrysanthemi kdgK* gene involved in pectin degradation. *Journal of Bacteriology* **176**, 2386-2392.
- HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N., CONDEMINE, G., NASSER, W. y REVERCHON, S. (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review of Microbiology* **50**, 213-257.
- HURLBERT, J. C. y PRESTON III, J. F. (2002). Differences in the solution structures of the parallel beta-helical pectate lyases as determined by limited proteolysis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1599**, 9-20.
- INOUE, Y., YASUTAKE, N., OSHIMA, Y., YAMAMOTO, Y., TOMITA, T., MIYOSHI, S. y YATAKE, T. (2002). Cloning of the maltose phosphorylase gene from *Bacillus* sp. strain RK-1 and efficient production of the cloned gene and the trehalose phosphorylase gene from *Bacillus stearothermophilus* SK-1 in *Bacillus subtilis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **66**, 2594-2599.
- JARVIS, M. C., FORSYTH, W. y DUNCAN, H. J. (1988). A survey of the pectic content of nonlignified monocot cell walls. *Plant Physiology* **88**, 309-314.
- JENKINS, J., SHEVCHIK, V. E., HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. y PICKERSGILL, R. W. (2004). The crystal structure of pectate lyase Pel9A from *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of biological chemistry* **279**, 9139-9145.
- JÜRGEN, B., HANSCHKE, R., SARVAS, M., HECKER, M. y SCHWEDER, T. (2001). Proteome and transcriptome based analysis of *Bacillus subtilis* cells overproducing an insoluble heterologous protein. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**, 326-332.
- JURNAK, F., KITA, N., GARRETT, M., HEFFRON, S. E., SCAVETTA, R., BOYD, C. y NEEK, K. Functional implications of the three-dimensional structures of pectate lyases. En VISSER, J. y VORAGEN, A. G. J. (eds.). *Progress in Biotechnology; Pectins and pectinasas*. Nueva York: Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1996, pag. 295-308.
- KAPOOR, M., BEG, Q. K., BHUSHAN, B., DADHICH, K. S. y HOONDAL, G. S. (2000). Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. *Process Biochemistry* **36**, 467-473.
- KAPOOR, M., BEG, Q. K., BHUSHAN, B., SINGH, K., DADHICH, K. S. y HOONDAL, G. S. (2001). Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibers. *Process Biochemistry* **36**, 803-807.

- KARBASSI, A. y VAUGHN, R. H. (1980). Purification and properties of polygalacturonic acid trans-eliminase EC-4.2.2.1. from *Bacillus stearothermophilus*. *Canadian Journal of Microbiology* **26**, 377-384.
- KASHYAP, D. R., VOHRA, P. K., CHOPRA, S. y TEWARI, R. (2001). Applications of pectinases in the comercial sector: A review. *Bioresource Technology* **77**, 215-227.
- KASHYAP, D. R., CHANDRA, S., KAUL, A. y TEWARI, R. (2000). Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**, 277-282.
- KAWAMURA, F. y DOI, R. H. (1984). Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *Journal of Bacteriology* **160**, 442-444.
- KEEN, N. T. y TAMAKI, S. (1986). Structure of two pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and their high-level expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **168**, 595-606.
- KERTESZ, Z. I., BAKER, G. I., JOSEPH, G. H., MOTTERN, H. H. y OLEN, A. G. (1944). *Chemical Engineering* **22**, 105.
- KILARA, A. (1982). Enzymes and their uses in the processed apple industry. A Review. *Process Biochemistry* **17**, 35-41.
- KLUSKENS, L. D., VAN ALEBEEK, G. J. W. M., VORAGEN, A. G. J., DE VOS, W. M. y VAN DER OOST, J. (2003). Molecular and biochemical characterization of the thermoactive family 1 pectate lyase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemical Journal* **370**, 651-659.
- KOBAYASHI, Y., KOMAE, K., TANABE, H. y MATSUO, R. (1988). Approach to maceration mechanism in enzymatic pulping of bast fibers by alkalophilic pectinolytic enzymes produced by *Erwinia* species. *Biotechnology Advances* **6**, 29-38.
- KOBAYASHI, T., HATADA, Y., HIGAKI, N., LUSTERIO, D. D., OZAWA, T., KOIKE, K., KAWAI, S. e ITO, S. (1999a). Enzymatic properties and deduced amino acid sequence of a high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. *Biochimica et Biophysica Acta* **1427**, 145-154.
- KOBAYASHI, T., KOIKE, K., YOSHIMATSU, T., HIGAKI, N., SUZUMATSU, A., OZAWA, T., HATADA, Y. e ITO, S. (1999b). Purification and properties of a low-molecular-weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **63**, 65-72.
- KOBAYASHI, T., HATADA, Y., SUZUMATSU, A., SAEKI, K., HATAMADA, Y. e ITO, S. (2000). Highly alkaline pectate lyase Pel-4A from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain P-4-N: its catalytic properties and deduced amino acid sequence. *Extremophiles* **4**, 377-383.

- KOBAYASHI, T., SAWADA, K., SUMITOMO, N., HATADA, Y., HAGIHARA, H. e ITO, S. (2003). Bifunctional pectinolytic enzyme with separate pectate lyase and pectin methylesterase domains from an alkaliphilic *Bacillus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**, 269-277.
- KOZIANOWSKI, G., CANGANELLA, F., RAINEY, F. A., HIPPE, H. y ANTRANIKIAN, G. (1997). Purification and characterization of thermostable pectate-lyases from a newly isolated thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter italicus* sp. nov. *Extremophiles* **1**, 171-182.
- KRAVTCHENKO, T. P., VORAGEN, A. G. J. y PILNIK, W. (1992). Analytical comparison of three industrial pectin preparations. *Carbohydrate Polymers* **18**, 17-25.
- KUNST, F. *et al.*, (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-256.
- KYTE, J. y DOLITTLE, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* **157**, 105-132.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LAMPEN, J. O., PASTOR, F. I. J. y HUSSAIN, M. Processing of secreted proteins and the signal peptidases of Bacilli. En: LEIVE, L., BONVENTRE, P. F., MORELLO, J. A., SILVER, S. D. y WU, H. C. (eds.). *Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, 1986, pag. 279-282.
- LIN, X., WONG, S. L., MILLER, E. S. y SHIH, J. C. H. (1997). Expression of the *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase gene in *B. subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**, 134-138.
- LIU, Y., CHATTERJEE, A. y CHATTERJEE, A. K. (1994). Nucleotide sequence and expression of a novel pectate lyase gene (*pel-3*) and a closely linked endopolygalacturonase gene (*peh-1*) of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2545-2552.
- LOJKOWSKA, E., MASCLAUX, C., BOCCARA, M., ROBERT-BAUDOY, J. y HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. (1995). Characterization of the *pelL* gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology* **16**, 1183-1195.
- LÓPEZ, C., BLANCO, A. y PASTOR, F. I. J. (1998). Xylanase production by a new alkali-tolerant isolate of *Bacillus*. *Canadian Journal of Microbiology* **39**, 1162-1166.
- MAGRO, P., VARVARO, L., CHILOSI, G., AVANZO, C. y BALESTRA, G. M. (1994). Pectolytic enzymes produced by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *FEMS Microbiology Letters* **117**, 1-5.

- MANULIS, S., KOBAYASHI, D. Y. y KEEN, N. T. (1988). Molecular cloning and sequencing of a pectate lyase gene from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of Bacteriology* **170**, 1825-1830.
- MARCUS, L., BARASH, I., SNEH, B., KOLTIN, Y. y FINKLER, A. (1986). Purification and characterization of pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* KUHN. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **29**, 325-336.
- MARMUR, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* **3**, 208-108.
- MARTÍNEZ, E. y DE LA CRUZ, F. (1988). Transposon Tn21 encodes a RecA-independent site-specific integration system. *Molecular and General Genetics* **211**, 320-325.
- McGRATH, M. E., OSAWA, A. E., BARNES, M. G., CLARK, J. M., MORTARA, K. D. y SCHMIDT, B. F. (1997). Production of crystallizable human chymase from a *Bacillus subtilis* system. *FEBS Letters* **413**, 486-488.
- McKENZIE, T., HOSHINO, T., TANAKA, T. y SUEOKA, N. (1986). The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* **15**, 93-103.
- McKIE, V. A., BLACK, G. W., MILLWARD-SADLER, S. J., HAZELWOOD, G. P., LAURIE, J. I. y GILBERT, H. J. (1997). Arabinanase A from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* exhibits both an endo- and exo- mode of action. *Biochemical Journal* **323**, 547-555.
- McKIE, V. A., VINCKEN, J. P., VORAGEN, A. G. J., VAN DEN BROEK, L. A. M., STIMSON, E. y GILBERT, H. J. (2001). A new family of rhamnogalacturonan lyases contains an enzyme that binds to cellulose. *Biochemical Journal* **355**, 167-177.
- McNEILL, M., DARVILL, A. G., FRY, S. C. y ALBERSHEIM, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry* **53**, 625-663.
- MONTIEL, M. D., HERNÁNDEZ, M., RODRÍGUEZ, J. y ARIAS, M. E. (2002). Evaluation of an endo- $\beta$ -mannanase produced by *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 for the biobleaching of pine kraft pulps. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**, 67-72.
- MORAN, F. y STARR, M. P. (1969). Metabolic regulation of polygalacturonic acid trans eliminase in *Erwinia*. *European Journal of Biochemistry and Biophysics* **11**, 291-295.
- NAGARAJAN, V. Protein secretion. En SONENSHEIN, A. L., HOCH, J. A. y LOSICK, R. (eds.). *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993, pag. 713-726.

- NAGEL, C. W. y VAUGHN, R. H. (1961). The characteristic of a polygalacturonase produced by *Bacillus polymyxa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **93**, 344-352.
- NAIDU, G. S. N. y PANDA, T. (1998). Production of pectolytic enzymes. A review. *Bioprocess Engineering* **19**, 355-361.
- NAKANIWA, T., TADA, T., ISHII, K., TAKAO, M., SAKAI, T. y NISHIMURA, K. (2003). Crystallization and preliminary X-ray analysis of a thermostable pectate lyase PL 47 from *Bacillus* sp. TS 47. *Acta-Crystallographica*. Section **D59**, 341-342.
- NASSER, W., CHALET, F. y ROBERT-BAUDOY, J. (1990). Purification and characterization of extracellular pectate lyase from *Bacillus subtilis*. *Biochimie* **72**, 689-696.
- NASSER, W., AWADÉ, A. C., REVERCHON, S. y ROBERT-BAUDOY, J. (1993). Pectate lyase from *Bacillus subtilis*: molecular characterization of the gene, and properties of the cloned enzyme. *FEBS Letters* **335**, 319-326.
- NASUMO, S. y STARR, M. P. (1967). Polygalacturonic acid trans-eliminase of *Xanthomonas campestris*. *Biochemical Journal* **104**, 178-184.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S. y VON HEIJNE, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**, 1-6.
- NORTHCOTE, D. H. (1972). Chemistry of the plant cell wall. *Annual Review of Plant Physiology* **23**, 113-132.
- OGAWA, A., SAWADA, K., SAITO, K., HAKAMADA, Y., SUMITOMO, N., HATADA, Y., KOBAYASHI, T. e ITO, S. (2000). A new high-alkaline and high-molecular-weight pectate lyase from a *Bacillus* isolate: enzymatic properties and cloning of the gene for the enzyme. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **64**, 1133-1141.
- OMURA, S., *et al.*, (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**, 12215-12220.
- OVERBEEKE, N., TERMORSHUIZEN, G. H. M., GIUSEPPIN M. L. F., UNDERWOOD, D. R. y VERRIPS, C. T. (1990). Secretion of the alpha galactosidase from *Cyamopsis tetragonoloba* (Guar) by *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 1429-1434.
- PALVA, I., PETTERSON, R. F., KALKKINEN, N., LEHTOVAARA, P., SARVAS, M., SÖDERLUND, H., TAKKINEN, K. y KÄÄRIÄINEN, L. (1981). Nucleotide sequence of the promoter and NH<sub>2</sub>-terminal signal peptide region of the  $\alpha$ -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Gene* **15**, 43-51.

- PALVA, I., SARVAS, M., LEHTOVAARA, P., SIBAKOV, M. y KÄÄRIÄINEN, L. (1982). Secretion of *Escherichia coli* beta lactamase from *Bacillus subtilis* by the aid of alpha amylase signal sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **79**, 5582-5586.
- PAŘENICOVÁ, L., BENEN, J. A. E., KESTER, H. C. M. y VISSER, J. (1998). *PgaE* encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry* **251**, 72-80.
- PASTOR, F. I. J., LÓPEZ, J. L., DÍAZ, P. y BLANCO, A. Expresión de la celulasa A de *Bacillus* sp. BP-23 en cepas de *Bacillus* sin fondo celulolítico. *Congreso de la Sociedad Española de Microbiología*. Granada: 17-21 de Septiembre, 1999. Resúmenes Volumen II: C 10-45.
- PASTOR, F. I. J., PUJOL, X., BLANCO, A., VIDAL, T., TORRES, A. L. y DÍAZ, P. (2001). Molecular cloning and characterization of a multidomain endoglucanase from *Paenibacillus* sp. BP-23: Evaluation of its performance in pulp refining. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**, 61-68.
- PEARSON, W. R. (1990). Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology* **183**, 63-98.
- PÉREZ-MARTINEZ, G., KOK, J., VENEMA, G., VAN DIJL, J. M., SMITH, H. y BRON, S. (1992). Protein export elements from *Lactococcus lactis*. *Molecular and General Genetics* **234**, 401-411.
- PÉREZ, S., MAZEAU, K. y DU PENHOAT, C. H. (2000). The three dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 37-55.
- PETERSEN, T. N., KAUPPINEN, S. y LARSEN, S. (1997). The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel  $\beta$  helix. *Structure* **5**, 533-544.
- PETIT-GLATRON, M. F. y CHAMBERT, R. (1992). Peptide carrier potentiality of *Bacillus subtilis* levansucrase. *Journal of General Microbiology* **138**, 1089-1095.
- PICKERSGILL, R., JENKINS, J., HARRIS, G., NASSER, W. y ROBERT-BAUDOY, J. (1994). The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. *Nature Structural Biology* **1**, 717-723.
- PICKERSGILL, R., SMITH, D., WORBOYS, K. y JENKINS, J. (1998). Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 24660-24664.
- PILGRIM, G. W., WALTER, R. H. y OAKENFULL, D. G. Jams, jellies, and preserves. En WALTER, R. H. (ed.). *The Chemistry and Technology of Pectin*. San Diego, (California): Academic Press, Inc., 1991, pag. 23-50.
- PITT, D. (1988). Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. *Methods in Enzymology* **161**, 350-354.

- PRESTON, R. D. (1979). Polysaccharide conformation and cell wall function. *Annual Review of Plant Physiology* **30**, 55-78.
- PUJIC, P., DERVYN, R., SOROKIN, A. y EHRlich, S. D. (1998). The *kdgRKAT* operon of *Bacillus subtilis*: detection of the transcript and regulation by the *kdgR* and *ccpA* genes. *Microbiology* **144**, 3111-3118.
- REES, D. A., MORRIS, E. R., THOM, D. y MADDEN, J. K. Shapes and interactions of carbohydrate chains. En ASPINALL, G. O. (ed.). *Polysaccharydes*. Nueva York: Academic Press, 1982, pag 195-290.
- REID, I. y RICARD, M. (2000). Pectinase in papermaking: Solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 115-123.
- RIED, J. L. y COLLMER, A. (1985). Activity stain for rapid characterization of pectic enzymes in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 615-622.
- RIED, J. L. y COLLMER, A. (1986). Comparison of pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology* **52**, 305-310.
- RIJSSEL, M. W., GERWIG, G. J. y HANSEN, T. A. (1993). Isolation and characterization of an extracellular glycosylated protein complex from *Clostridium thermosaccharolyticum* with pectin methylesterase and polygalacturonate hydrolase activity. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 828-836.
- RIOU, C., FRAISSINET-TACHET, L., FREYSSINET, G. y FÈVRE, M. (1992). Secretion of pectic isoenzymes by *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters* **91**, 231-237.
- ROMBOUTS, F. M. y PILNIK, W. Pectic enzymes. Microbial enzymes and bioconversions. En ROSE, A. H. (ed.). *Economic Microbiology*. Londres: Academic Press, 1980, vol. 5, pag. 227-282.
- RUIZ, C., BLANCO, A., PASTOR, F. I. J. y DÍAZ, P. (2002). Analysis of *Bacillus megaterium* lypolitic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. *FEMS Microbiology Letters* **217**, 263-267.
- RUIZ, C., PASTOR, F. I. J. y DÍAZ, P. (2003). Isolation and characterization of *Bacillus* sp. BP-6 LipA, a ubiquitous lipase among mesophilic *Bacillus* species. *Letters in Applied Microbiology* **37**, 354-359.
- SAKAI, T., SAKAMOTO, T., HALLAERT, J. y VANDAMME, E. J. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: Production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology* **39**, 213-294.

- SAKAMOTO, T., HOURS, R. A. y SAKAI, T. (1994). Purification, characterization, and production of two pectic transeliminases with protopectinase activity from *Bacillus subtilis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **58**, 353-358.
- SAKAMOTO, T., KAWASAKI, H. y SAKAI, T. (1996). Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding phosphate-inducible pectin lyase of *Bacillus subtilis*. *FEBS Letters* **398**, 269-273.
- SALAZAR, L. y JAYASINGHE, U. Fundamentals of purification of plant viruses. En *Techniques in plant virology*. Perú: CIP training manual 5,0, Virus purification, Internal potato center, 1999, pag. 1-10.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. y MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª edición. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SÁNCHEZ, M. M., PASTOR, F. I. J. y DÍAZ, P. (2003). Exo-mode of action of cellobiohydrolase Cel48C from *Paenibacillus* sp. BP-23. A unique type of cellulase among Bacillales. *European Journal of Biochemistry* **270**, 2913-2919.
- SANGER, F., NICKLEN, S. y COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA* **74**, 5463-5467.
- SAWADA, K., OGAWA, A., OZAWA, T., SUMITOMO, N., HATADA, Y., KOBAYASHI, T. e ITO, S. (2000). Nucleotide and amino-acid sequences of a new-type pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *European Journal of Biochemistry* **264**, 1510-1515.
- SAWADA, K., SUZUMATSU, A., KOBAYASHI, T. e ITO, S. (2001). Molecular cloning and sequencing of the gene encoding an exopolygalacturonase of a *Bacillus* isolate and properties of its recombinant enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* **1568**, 162-170.
- SAWADA, K. y UEDA, M. (2001). Enzyme processing of textiles in reverse micellar solution. *Journal of Biotechnology* **89**, 263-269.
- SCAVETTA, R. D., HERRON, S. R., HOTCHKISS, A. T., KITA, N., KEEN, N. T., BENEN, J. A. E., KESTER, H. C. M., VISSER, J. y JURNAK, F. (1999). Structure of a plant cell wall fragment complexed to pectate lyase C. *The Plant Cell* **11**, 1081-1092.
- SCHALLMEY, M., SINGH, A. y WARD, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology* **50**, 1-17.
- SCHWEDE, T., KOPP, J., GUEX, N. y PEITSCH, M. C. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* **31**, 3381-3385.

- SERRA, J. L., ALKORTA, I., LLAMA, M. J. y ALAÑA, A. (1992). Aplicación industrial de los enzimas pécticos. Producción, purificación, inmovilización y algunas propiedades de la pectina liasa de *Penibacillum italicum*. *Alimentación. Equipos y tecnología* **11**, 127-134.
- SERVANT, F., BRU, C., CARRÈRE, S., COURCELLE, E., GOUZY, J., PEYRUC, D. y KAHN, D. (2002). ProDom: Automated clustering of homologous domains. *Briefings in Bioinformatics* **3**, 246-251.
- SHEVCHIK, V. E., ROBERT-BAUDOY, J. y HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. (1997). Pectate lyase PelI of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family. *Journal of Bacteriology* **179**, 7321-7330.
- SHEVCHIK, V. E., KESTER, H. C. M., BENEN, J. A. E., VISSER, J., ROBERT-BAUDOY, J. y HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. (1999a). Characterization of the exopolygalacturonate lyase PelX of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology* **181**, 1652-1663.
- SHEVCHIK, V. E., CONDEMINÉ, G., ROBERT-BAUDOY, J. y HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. (1999b). The exopolygalacturonate lyase PelW and the oligogalacturonate lyase Ogl, two cytoplasmic enzymes of pectin catabolism in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology* **181**, 3912-3919.
- SHOWALTER, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell* **5**, 9-23.
- SIMONEN, M. y PALVA, I. (1993). Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiological Reviews* **57**, 109-137.
- SINGH, S. A., PLATTNER, H. y DIEKMANN, H. (1999). Exopolygalacturonate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Enzyme and Microbial Technology* **25**, 420-425.
- SMITH, C. J. Carbohydrate chemistry. En LEA, P. J. y LEEGOOD, R. C. (eds.). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Inglaterra: John Wiley and Sons, Ltd., 1993, pag. 74-111.
- SPIRO, R. G. (1966). The Nelson-Somogyi copper reduction method. Analysis of sugars found in glycoprotein. *Methods in Enzymology* **8**, 3-26.
- STACKEBRANDT, E. y SWIDERSKI, J. From phylogeny to systematics: The dissection of the genus *Bacillus*. En BERKELEY, R., HEYNDRIKX, M., LOGAN, N. y DE VOS, P. (eds.). *Applications and systems of Bacillus and relatives*. Blackwell Science Ltd., 2002, pag. 8-22.
- STARR, M. P. y MORAN, F. (1962). Eliminative split of pectic substances by phytopathogenic soft-rot. *Science* **135**, 920-921.
- STRYER, L. (1988). Introducción a los enzimas. En STRYER, L. *Bioquímica*. Barcelona: Reverté, pag 183-206.

- STUDIER, F. W. y MOFFATT, B. A. (1986). Use of bacteriophage T-7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**, 113-130.
- SUYKERBUYK, M. E. G., KESTER, H. C. M., SCHAAP, P. J., STAM, H., MUSTERS, W. y VISSER, J. (1997). Cloning and characterization of two rhamnogalacturonan hydrolase genes from *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2507-2515.
- TAKAMI, H., NAKASONE, K., HIRAMA, C., TAKAKI, Y., MASUI, N., FUJI, F., NAKUMURA, Y. e INOUE, A. (1999). An improved physical and genetic map of the genome of alkaliphilic *Bacillus* sp. C-125. *Extremophiles* **3**, 21-28.
- TAKAO, M., NAKANIWA, T., YOSHIKAWA, K., TERASHITA, T. y SAKAI, T. (2000). Purification and characterization of thermostable pectate lyase with protopectinase activity from thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **64**, 2360-2367.
- TAKAO, M., NAKANIWA, T., YOSHIKAWA, K., TERASHITA, T. y SAKAI, T. (2001). Molecular cloning, DNA sequence, and expression of the gene encoding for thermostable pectate lyase of thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **65**, 322-329.
- TAMAKI, S. J., GOLD, S., ROBESON, M., MANULIS, S. y KEEN, N. T. (1988). Structure and organization of the *pel* genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16. *Journal of Bacteriology* **170**, 3468-3478.
- TAMARU, Y. y DOI, R. H. (2001). Pectate lyase A, an enzymatic subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**, 4125-4129.
- TANABE, H., YOSHIHARA, K., TAMURA, K., KOBAYASHI, Y., AKAMATSU, I., NIYOMWAN, N. y FOOTRAKUL, P. (1987). Pretreatment of pectic wastewater from orange canning process by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Journal of Fermentation Technology* **65**, 243-246.
- TANABE, H., KOBAYASHI, Y. y AKAMATSU, I. (1988). Pretreatment of pectic wastewater with pectate lyase from an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry* **52**, 1855-1856.
- TARDY, F., NASSER, W., ROBERT-BAUDOY, J. y HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. (1997). Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: Enzyme characteristics and potential inhibitors. *Journal of Bacteriology* **179**, 2503-2511.
- THAKUR, B. R., SINGH, R. K. y HANDA, A. K. (1997). Chemistry and uses of pectin: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **37**, 47-73.

- TJALSMA, H., BOLHUIS, A., JONGBLOED, J. D. H., BRON, S. y VAN DIJL, J. M. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 515-547.
- TOMME, P., WARREN, R. A. J. y GILKES, N. R. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in Microbial Physiology* **37**, 1-81.
- TURQUOIS, T., RINAUDO, M., TARAVEL, F. R. y HEYRAUD, A. (1999). Extracción de highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their gelling properties. *Food Hydrocolloids* **13**, 255-262.
- VAN BUREN, J. P. Function of pectin in plant tissue structure and firmness. En WALTER, R. H. (ed.). *The Chemistry and Technology of Pectins*. San Diego, (California): Academic Press, Inc., 1991, pag. 1-22.
- VAN DER MAAREL, M. J. E. C., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J. C. M., LEEMHUIS, H. y DIJKHUIZEN, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology* **94**, 137-155.
- VAN GIJSEGEM, F. (1989). Relationship between the *pel* genes of the *pelADE* cluster in *Erwinia chrysanthemi* strain B374. *Molecular Microbiology* **3**, 1415-1424.
- VAN LEEN, R. W., BAKHUIS, J. G., VAN BECKHOVEN, R. F. W. C., BURGER, H., DORSSERS, L. C. J., HOMMES, R. W. J., LEMSON, P. J., NOORDAM, B., PERSON, N. L. M. y WAGEMAKER, G. (1991). Production of human interleukin-3 using industrial microorganisms. *Biotechnology* **9**, 47-52.
- VAN SANTEN, Y., BENEN, J. A. E., SCHRÖTER, K. H., KALK, K. H., ARMAND, S., VISSER, J. y DIJKSTRA, B. W. (1999). 1.68-Ång crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 30474-30480.
- VARNER, J. E. y LIANG, S. L. (1989). Plant cell wall architecture. *Cell* **56**, 231-240.
- VIIKARI, L., TENKANEN, M. y SUURNÄKKI, A. Biotechnology in the pulp and paper industry. En REHM, H. J. (ed.). *Biotechnology*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001, Vol. 10, pag. 523-546.
- VITIKAINEN, M., PUMMI, T., AIRAKSINEN, U., WAHLSTRÖM, E., WU, H., SARVAS, M. y KONTINEN, V. P. (2001). Quantitation of the capacity of the secretion apparatus and requirement for PrsA in growth and secretion of  $\alpha$ -amylase in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **183**, 1881-1890.
- VON HEIGNE, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Research* **14**, 4683-4690.

- WILLIAMS, D. M., SCHONER, R. G., DUVALL, E. J., PREIS, L. H., y LOVETT, P. S. (1981). Expression of *E. coli trp* genes and the mouse dihydrofolate reductase gene cloned in *Bacillus subtilis*. *Gene* **16**, 199-206.
- WOLF, M., GECZI, A., SIMON, O. y BORRISS, R. (1995). Genes encoding xylan and  $\beta$ -glucan hydrolysing enzymes in *Bacillus subtilis*: Characterization, mapping and construction of strains deficient in lichenase, cellulase and xylanase. *Microbiology* **141**, 281-290.
- WONG, S. L. (1989). Development of an inducible and enhancible expression and secretion system in *Bacillus subtilis*. *Gene* **83**, 215-223.
- WONG, S. L. (1995). Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Current Opinion in Biotechnology* **6**, 517-522.
- WU, X. C., LEE, W., TRAN, L. y WONG, S. L. (1991). Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *Journal of Bacteriology* **173**, 4952-4958.
- WU, X. C., NG, S. C., NEAR, R. I. y WONG, S. I. (1993). Efficient production of a functional single chain antidigoxin antibody via an engineered *Bacillus subtilis* expression secretion system. *Biotechnology* **11**, 71-76.
- WU, S. C., YE, R., WU, X. C., NG, S. C. y WONG, S. L. (1998). Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones. *Journal of Bacteriology* **180**, 2830-2835.
- YAMAGATA, H., NAKAHAMA, K., SUZUKI, Y., KAKINUMA, A., TSUKAGOSHI, N. y UDAKA, S. (1989). Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **86**, 3589-3593.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J. y MESSING, J. (1985). Improved M-13 phage cloning vectors and host strains nucleotide sequence of the M-13 MP-18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-109.
- YE, R., KIM, J. H., KIM, B. G., SZARKA, S., SIHOTA, E. y WONG, S. L. (1999). High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering* **62**, 87-96.
- YODER, M. D., KEEN, N. T. y JURNAK, F. (1993). New domain motif: The structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science* **260**, 1503-1507.
- ZARRA, I. y REVILLA, G. La pared celular. Estructura y función. En AZCON-BIETO, J. (ed.). *Fisiología y bioquímica vegetal*. España: McGraw-Hill Interamericana de España, 1993, pag. 1-24.
- ZHAI, C., CAO, J. y WANG, Y. (2003). Cloning and expression of a pectate lyase gene from *Bacillus alcalophilus* NTT33. *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 173-178.

ZYPRIAN, E. y MATZURA, H. (1986). Characterization of signals promoting gene expression on the *Staphylococcus aureus* plasmid pUB110 and development of a gram-positive expression vector system. *DNA* **5**, 219-225.

# **PUBLICACIONES**



## 7. PUBLICACIONES

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo han dado lugar a la preparación de las publicaciones que se citan a continuación.

**SORIANO, M., BLANCO, A., DIAZ, P. y PASTOR, F. I. J.** (2000). An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization. *Microbiology* **146**, 89-95.

**SORIANO, M., DIAZ, P. y PASTOR, F. I. J.** Pectinolytic systems of two aerobic endospore-forming bacterial strains with high activity on pectin. Submitted to *Current Microbiology*.

**SORIANO, M., DIAZ, P. y PASTOR, F. I. J.** PelC from *Bacillus subtilis*, an endocleaving pectate lyase with activity on highly methylated pectins. Submitted to *Applied and Environmental Microbiology*.

# An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization

Margarita Soriano, Ana Blanco, Pilar Díaz and F. I. Javier Pastor

Author for correspondence: F. I. Javier Pastor. Tel: +34 3 4029012. Fax: +34 3 4110592.  
e-mail: fpastor@bio.ub.es

Department of  
Microbiology, Faculty of  
Biology, University of  
Barcelona, Avinguda  
Diagonal 645, 08028  
Barcelona, Spain

**The gene *peIA* encoding a pectate lyase from the strain *Bacillus* sp. BP-23 was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The nucleotide sequence of a 1214 bp DNA fragment containing *peIA* gene was determined, revealing an ORF of 666 nucleotides that encoded a protein of 23233 Da. The deduced amino acid sequence of the encoded enzyme showed homology to pectate lyases A, B, C and D from *Fusarium solani*, Pel-3 and PelB from *Erwinia carotovora* and Pell from *Erwinia chrysanthemi*. Homology was also found to the protein deduced from the *Bacillus subtilis* *yvpA* gene, the function of which is unknown. The heterologous expressed enzyme depolymerized polygalacturonate and pectins of methyl esterification degree from 22 to 89%, and exhibited similar activity on polygalacturonate and on 89% esterified citrus pectin. Optimum temperature and pH for enzymic activity were 50 °C and pH 10, respectively. Ca<sup>2+</sup> was required for activity on pectic substrates, while the enzyme was strongly inhibited by Ba<sup>2+</sup>.**

Keywords: pectate, pectin, lyase

## INTRODUCTION

Pectin is a heteropolysaccharide composed of 1,4- $\alpha$ -linked galacturonate chains with a high percentage of methyl esterification. Pectin degradation requires the combined action of several enzymes that can be classified into two main groups: methylesterases, which remove methoxyl groups from pectin, and depolymerases (hydrolases and lyases), which cleave the bonds between galacturonate units. Lyases cleave glycosidic bonds by  $\beta$ -elimination, giving rise to unsaturated products. Among these enzymes, pectin lyases show specificity for methyl esterified substrates (pectin) while pectate lyases are specific for unesterified polygalacturonate (pectate). Pectate lyases are widely distributed among microbial plant pathogens and have been the focus of several studies to ascertain their role as virulence factors (Barras *et al.*, 1994; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). They have also been found in saprophytic micro-organisms, including the genus *Bacillus* (Nasser *et al.*, 1990), and in some thermophilic bacteria (Kozianowski *et al.*, 1997). Multiple sequence alignment of pectate lyases has been used to classify these enzymes into several subfamilies

and to identify consensus sequences of some of them (Henrissat *et al.*, 1995; Hinton *et al.*, 1989), although recent sequencing and characterization of novel enzymes has resulted in the proposal of new groups of pectate lyases (Shevchik *et al.*, 1997; Kim & Beer 1998).

Pectin-degrading enzymes are widely used in the food industry for improving the yield and the clarification of fruit juices (Alkorta *et al.*, 1998). At present, pectinolytic enzymes are being introduced into the textile industry to release fibres from flax stems, as an alternative to conventional retting (Henriksson *et al.*, 1999). In these fields, finding new enzymes has special interest to improve the efficiency of the production systems.

The strain *Bacillus* sp. BP-23, previously isolated from a rice field (Blanco & Pastor, 1993), shows a multiple glycanase system, some enzymes of which have been cloned and characterized (Blanco *et al.*, 1995, 1998, 1999). In this article, we describe the cloning and characterization of pectate lyase A from *Bacillus* sp. BP-23, an enzyme with some unusual features among pectin and pectate lyases.

## METHODS

**Bacterial strains and plasmids.** *Bacillus* sp. strain BP-23 was isolated from soil from a rice field in the Ebro river delta (Blanco & Pastor, 1993) and has been deposited in the Spanish

The EMBL accession number for the nucleotide sequence determined in this work is AJ237980.

Type Culture Collection as strain CECT 4592. The strain was grown as described previously (Blanco & Pastor, 1993). *Escherichia coli* 5K (Godessart *et al.*, 1988) was used as the recipient strain for recombinant plasmids. *E. coli* 5K was cultivated at 37 °C in LB medium. Plasmid pBR322 (Boehringer Mannheim) was used as cloning vector.

**Nucleic acid manipulation.** Chromosomal DNA from *Bacillus* sp. BP-23 was prepared as described by Dubnau & Davidoff-Abelson (1971). Plasmid DNA was purified by the alkaline lysis procedure (Sambrook *et al.*, 1989). Restriction nucleases and ligase were purchased from Boehringer Mannheim and used according to the manufacturer's specifications. Chromosomal DNA was partially digested with *Sau3AI*; fragments of 4–7 kb were isolated from a 0.8% (w/v) agarose gel by electroelution and ligated to *Bam*HI-digested pBR322. The resulting molecules were introduced into *E. coli* 5K cells by transformation according to the method of Hanahan (1983) and Ap<sup>r</sup> Tc<sup>s</sup> colonies were selected. Southern hybridization analysis was performed as described by Sambrook *et al.* (1989).

The sequence of both strands of *pelA* was determined by automated fluorescence sequencing with an ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready reaction mix (Perkin Elmer) in a 377 Perkin Elmer DNA sequencer.

**Enzyme assays.** The screening of the gene library for recombinant bacteria producing pectinase was performed on LB agar plates supplemented with 0.4% (w/v) polygalacturonic acid (Sigma) as described by Keen *et al.* (1984). After growth, plates were flooded with 1 M CaCl<sub>2</sub> and pectinase-producing colonies were detected by the appearance of a halo around them.

Cells from cultures of *E. coli* 5K carrying the recombinant plasmid pP22 (see below) were disrupted by sonication and the lysates obtained were cleared by centrifugation, dialysed and tested for activity. Pectate lyase activity was assayed spectrophotometrically by measuring the formation of unsaturated products from polygalacturonic acid at 232 nm (Collmer *et al.*, 1988). The standard assay mixture contained 0.2% polygalacturonic acid (Sigma) in a final volume of 3 ml 50 mM glycine buffer pH 10.0 containing 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>. Assay mixtures were incubated for 2.5 min at 50 °C and the increase in absorbance at 232 nm was measured. To test activity on substrates with various degrees of methylation, polygalacturonic acid was replaced by 22, 64 and 89% esterified citrus pectin (Sigma). Apple pectin (68% esterification; Sigma) was also tested as a substrate. One unit of enzymic activity was defined as the amount of enzyme that produces 1 µmol unsaturated product min<sup>-1</sup> under the assay conditions described. For inhibition studies, 1 mM different ions were added to the assay mixture and activity was determined as indicated.

**Gel electrophoresis and zymograms.** SDS-PAGE was performed in 13% (w/v) gels, essentially as described by Laemmli (1970). Samples were heated for 10 min at 45 °C in sample buffer before being applied to gels. After electrophoresis, gels were soaked in 2.5% (w/v) Triton X-100 for 30 min, washed in 100 mM glycine buffer pH 10.0, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub> for 30 min and overlaid with an 1% agarose gel containing 0.1% polygalacturonic acid in the same buffer as above. After 30 min incubation at 45 °C, gels were stained with 0.05% (w/v) Ruthenium red (Sigma) for 10 min and washed with water until pectate lyase bands became visible.

IEF was performed in a Pharmacia PhastSystem unit. Gels with a pH range from 3.0 to 9.0 (Pharmacia) were used. For zymogram analysis, IEF gels were overlaid with poly-

galacturonic-acid-containing agarose gels and developed as described above.

## RESULTS

### Cloning of pectate-lyase-A-encoding gene

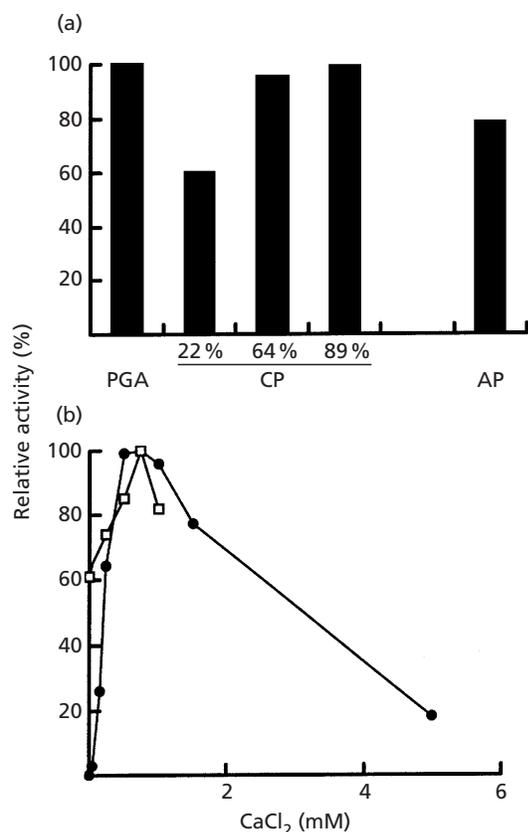
The strain *Bacillus* sp. BP-23, previously isolated from an enrichment culture on rice straw, secretes a complex system of carbohydrate-degrading enzymes including pectinases (Blanco & Pastor, 1993). The influence of carbon sources on pectate lyase production by the strain was evaluated. The highest activity was obtained in pectin-supplemented media (252 U ml<sup>-1</sup>). Other carbohydrates tested, such as polygalacturonate and rice straw, did not notably affect pectate lyase production, whilst activity was undetectable in glucose-supplemented media. A gene library from *Bacillus* sp. BP-23 was constructed in *E. coli* 5K and screened for pectinase activity on polygalacturonic-acid-containing agar plates. One clone out of 4000 tested showed pectin degradation around the bacterial growth and was selected. This strain carried the recombinant plasmid pP22, which contained a DNA insert of 1.2 kb. Hybridization analysis confirmed that the DNA insert in pP22 belonged to *Bacillus* sp. BP-23. A 0.7 kb *Pvu*II–*Sph*I fragment from pP22, used as a probe, hybridized to identically sized DNA bands from *Bacillus* sp. BP-23 and pP22 doubly digested with *Pvu*II/*Sph*I, whilst no hybridization was detected to *E. coli* 5K chromosomal DNA or pBR322.

### Substrate specificity

Cell extracts from *E. coli* 5K/pP22 showed high lyase activity on pectic substrates, whilst no hydrolytic activity was found. Xylans, carboxymethylcellulose or other carbohydrates tested were not degraded by the enzyme. Among pectic substrates, maximum activity was found on polygalacturonic acid, although the cloned enzyme also showed high activity on pectin. The influence of substrate methylation on enzymic activity was tested by evaluating the activity of the enzyme on pectins of increasing degree of methyl esterification. The enzyme exhibited on all the pectins tested more than 60% of the activity found on polygalacturonic acid (Fig. 1a). On highly methylated pectins (89% esterification) the activity found was more than 90% of that detected on polygalacturonic acid. The results show that the cloned enzyme exhibits very similar activity on pectins and polygalacturonic acid, showing high levels of lyase activity on pectic substrates irrespective of the degree of methyl esterification.

### Characterization of the cloned enzyme

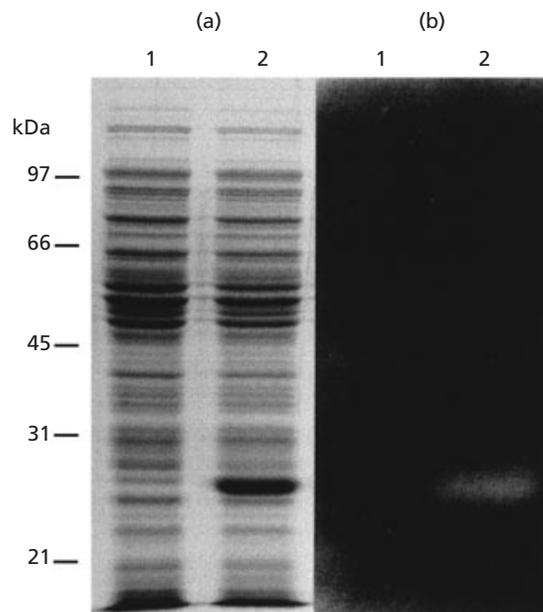
The effect of pH and temperature on the activity of the cloned enzyme on polygalacturonic acid was determined. The enzyme was most active in a narrow alkaline pH range, showing the highest activity at pH 10.0. Optimum temperature for pectate lyase activity was 50 °C, whilst more than 50% of maximum activity was



**Fig. 1.** Some enzymic properties of PelA. (a) Influence of the degree of pectin methylation on PelA activity. Activity of PelA on polygalacturonic acid (PGA), citrus pectins (CP) with degree of methyl esterification from 22 to 89% and apple pectin (AP) (68% esterification) was determined by the standard assay. Activity is expressed relative to that detected on non-methylated substrate. One hundred per cent pectate lyase activity was equivalent to 142 units (mg protein)<sup>-1</sup>. (b) Influence of Ca<sup>2+</sup> concentration on PelA activity. Activity on polygalacturonic acid (●) and citrus pectin (□) was determined at 50 °C and pH 10.0 in the presence of different concentrations of CaCl<sub>2</sub>. One hundred per cent PelA activity was equivalent to 140 and 132 units (mg protein)<sup>-1</sup> on polygalacturonic acid and on pectin, respectively.

found in the temperature range from 40 to 60 °C. Stability assays showed that the enzyme was stable for 1 h at 40 °C in the pH range from 4.0 to 8.0. At pH 10.0, the enzyme retained more than 50% of the initial activity after 4 h incubation at 40 °C, whilst at 50 °C only 1% of the initial activity was found after the same treatment. At pH 7.0, the enzyme remained stable for at least 24 h at 40 °C.

The influence of Ca<sup>2+</sup> ions on enzymic activity was tested by performing assays at different CaCl<sub>2</sub> concentrations (Fig. 1b). The results showed that the cloned enzyme has an absolute requirement for Ca<sup>2+</sup> ions for polygalacturonic acid degradation. Activity was undetectable without this ion. Maximum activity was found at 0.5–0.75 mM CaCl<sub>2</sub>, whilst activity decreased at higher concentrations and only 9% of maximum

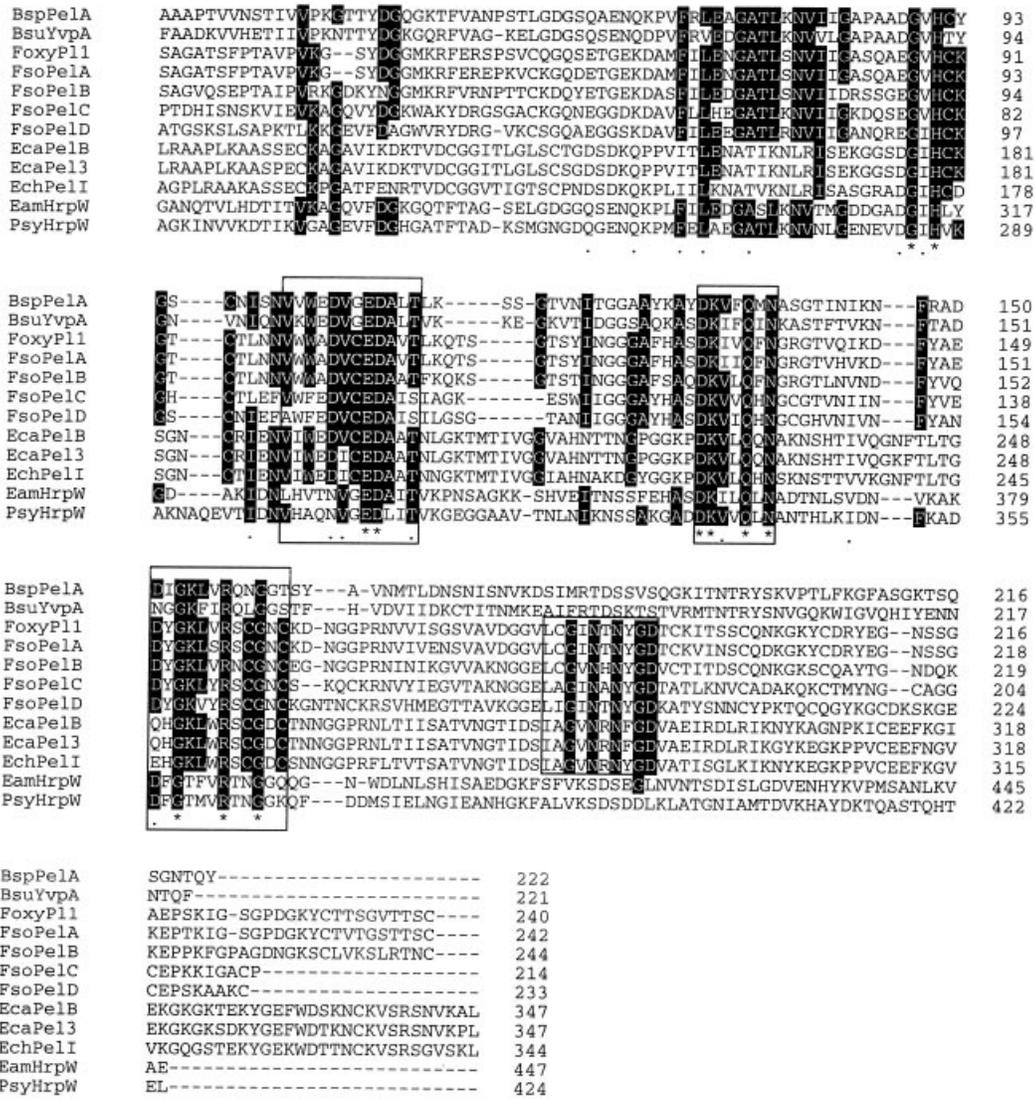


**Fig. 2.** Electrophoretic analysis of pectate lyase A. (a) Coomassie-blue-stained SDS-polyacrylamide gel. (b) Zymogram of an SDS-polyacrylamide gel. Lanes: 1, cell extracts from *E. coli* 5K/pBR322; 2, cell extracts from *E. coli* 5K/pP22. The positions of molecular mass marker proteins are indicated on the left.

activity was found at 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Conversely, the degradation of pectin was observed even without Ca<sup>2+</sup> addition, although the activity was enhanced in the presence of added Ca<sup>2+</sup> and reached a maximum at 0.75 mM CaCl<sub>2</sub> (Fig. 1b). The activity found without exogenous Ca<sup>2+</sup> could result from the presence of trace amounts of contaminant Ca<sup>2+</sup> ions in the pectins used as substrates. In fact, when 2 mM EDTA was added to the assay mixture, no activity was detected on pectins or polygalacturonic acid. These results indicate a requirement for Ca<sup>2+</sup> for enzymic activity on both substrates. According to this and to the substrate specificity results, we concluded that the cloned enzyme is a pectate lyase. We named it PelA.

The effect of metal ions other than Ca<sup>2+</sup> on pectate lyase activity was determined by performing enzymic assays on polygalacturonic acid in the presence of metal ions at 1 mM concentration, without added Ca<sup>2+</sup>. Activity was undetectable in all the assays, indicating that none of the ions tested could replace Ca<sup>2+</sup>. When the effect of metal ions was tested in the presence of 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, we found that the enzyme was strongly inhibited by Ba<sup>2+</sup> (9% residual activity). Sn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ag<sup>+</sup> also caused notable inhibition of the enzyme (36, 42 and 53% residual activity, respectively), whilst Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> caused only low levels of inhibition (71, 75, 77 and 88% residual activity, respectively).

SDS-PAGE analysis of cell extracts from *E. coli* 5K/pP22 showed a prominent 25 kDa protein band not found in extracts from *E. coli* 5K/pBR322 (Fig. 2). The band showed pectate lyase activity in zymographic analysis,



**Fig. 3.** Amino acid alignment of several pectate lyases belonging to class III. Alignment was performed with the CLUSTAL W program. Numbering of the amino acids starts at the N termini of the proteins. Gaps are indicated by dashes. Asterisks show identical amino acids and dots show conserved residues. Amino acids identical in at least eight of the sequences aligned are shaded. Blocks of conserved residues of class III pectate lyases are boxed. The sequences shown are: BspPelA, PelA from *Bacillus* sp. BP-23; BsuYvpA, YvpA from *B. subtilis*; FoxyP11, P11 from *F. oxysporum*; FsoPelA, PelA from *F. solani*; FsoPelB, PelB from *F. solani*; FsoPelC, PelC from *F. solani*; FsoPelD, PelD from *F. solani*; EcaPelB, PelB from *Erwinia carotovora*; EcaPel3, Pel-3 from *Erwinia carotovora*; EchPelI, Pell from *Erwinia chrysanthemi*; EamHrpW, HrpW from *Erwinia amylovora*; PsyHrpW, HrpW from *P. syringae*.

whilst no pectate lyase bands were detected in control samples. Analysis of *E. coli* 5K/pP22 extracts by IEF showed an intense pectate lyase band that migrated in the upper pH limit of the gel, indicating a pI of 9.0 or higher (data not shown).

**Sequencing of the encoding gene**

The nucleotide sequence of the 1214 bp DNA insert contained in pP22 was determined. It contains an ORF of 666 nucleotides that encodes a protein of 222 amino

acids. The deduced protein sequence shows an N-terminal region of 25 amino acids with the features of a typical *Bacillus* signal peptide (Nagarajan, 1993). It contains two positively charged residues at its N-terminal end, followed by a hydrophobic span of 18 amino acids. This hydrophobic core is followed by a  $\beta$ -turn-favouring residue (Pro) and an amino acid stretch with the sequence AAAA, together resembling the sequence recognized by bacterial signal peptidase (von Heijne, 1986), which would cleave the bond between the two last alanine residues. Eight nucleotides upstream

of the ATG start codon there is a AAGGGAGGA sequence, resembling that of a ribosome-binding site (Shine–Dalgarno sequence). A putative promoter sequence, similar to those recognized by the  $\sigma^A$  subunit of *Bacillus* RNA polymerase, showing a  $-35$  (TAGACA) and  $-10$  (TCAAAT) region was found upstream of the *pelA* structural gene. An inverted repeat of 20 bp, which could act as a transcriptional terminator, was found in the 3' region of the pectate lyase gene.

The deduced amino acid sequence of PelA was compared to enzyme sequences contained in the SWISS-PROT and EMBL databases. Homology was found to enzymes belonging to class III pectate lyases (Shevchik *et al.*, 1997; Kim & Beer 1998), whilst no homology was found to pectate lyases of other groups (Fig. 3). The highest homology was found to pectate lyases from phytopathogenic fungi. PelD from *Fusarium solani* (Guo *et al.*, 1996) showed the highest homology (43% identity), whilst P11 from *Fusarium oxysporum* (TREMBL G3764095) and PelC, PelB and PelA from *F. solani* (Guo *et al.*, 1995a, b; González-Candelas & Kolattukudy, 1992) showed 41, 40, 39 and 37% identity, respectively, to *Bacillus* sp. BP-23 PelA. The enzyme also showed homology to pectate lyases from phytopathogenic bacteria. In this regard, 33% identity was found to Pel-3 and PelB from *Erwinia carotovora* (Liu *et al.*, 1994; Heikinheimo *et al.*, 1995), and 31% identity to PelI from *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik *et al.*, 1997). Sequence comparison also showed that PelA is highly homologous (54% identity) to the protein deduced from the *yvpA* gene from *Bacillus subtilis*, the function of which is unknown (Kunst *et al.*, 1997).

The amino acid sequence of the cloned enzyme contains three blocks of conserved residues proposed as signatures of pectate lyases of class III (Shevchik *et al.*, 1997) (Fig. 3). However, a fourth conserved region present in the enzymes of this class is missing in *Bacillus* sp. BP-23 PelA. Analysis for the occurrence of protein domains with ProDom at NCBI (Altschul *et al.*, 1997) indicated a two-domain structure in PelA. An N-terminal pectate lyase domain (amino acids 33–160), shared with class III pectate lyases, comprises the three conserved regions of class III enzymes contained in PelA. The second domain, placed at the C-terminal region of PelA (amino acids 161–222) is only shared with the protein deduced from the *yvpA* gene from *B. subtilis*.

## DISCUSSION

We have identified and characterized a pectate lyase from the strain *Bacillus* sp. BP-23. Sequence comparison with proteins contained in databases revealed that the enzyme characterized, PelA, showed homology to enzymes belonging to class III pectate lyases, whilst no significant homology was found to pectate lyases of other groups, including pectate lyases from saprophytic micro-organisms such as Pel from *Amycolata* sp. (Brühlmann & Keen, 1997). It has recently been shown that Hrp proteins from *Erwinia amylovora* (Kim & Beer 1998) and *Pseudomonas syringae* (Charkowski *et al.*,

1998) contain domains homologous to pectate lyases from class III although they do not show pectate lyase activity. This indicates that class III proteins are probably distributed in a wide range of micro-organisms. Our results indicate that the cloned enzyme belongs to class III pectate lyases. PelA from *Bacillus* sp. BP-23 is to our knowledge the only pectate lyase in this class reported from a non-pathogenic micro-organism.

The pectate lyase characterized differs in many aspects from known pectate lyases. One of the most notable features of the cloned enzyme is its activity on both polygalacturonic acid and highly methylated pectin. Most pectate lyases, besides degrading polygalacturonic acid, retain activity on pectins of low degree of methylation but are not active on highly methylated pectins (Burns, 1991; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). In some instances, as for *Erwinia chrysanthemi* PelB and PelC, pectate lyases are most active on substrates with a low degree of methylation (7–22%) and do not show activity on highly esterified pectin (Tardy *et al.*, 1997). By contrast, *Bacillus* sp. BP-23 PelA, shows high activity on pectins of any degree of esterification. The activity on highly methylated pectins could indicate that the cloned enzyme is a pectin lyase. However, known pectin lyases show a decreasing activity as the methoxyl content of the substrate decreases and do not show noticeable activity on polygalacturonic acid. Additionally, pectin lyases usually do not require  $\text{Ca}^{2+}$  for activity, whilst the cloned enzyme does not show activity in the absence of this ion. From these results we conclude that *Bacillus* sp. BP-23 PelA is a pectate lyase showing a remarkable activity on highly methylated pectin.

Pectate lyases belonging to class III are usually more active on pectins than on polygalacturonate. Thus, PelI from *Erwinia chrysanthemi* and PelB from *Erwinia carotovora* show maximum activity on 45 and 68% esterified pectin, respectively (Shevchik *et al.*, 1998; Heikinheimo *et al.*, 1995), exhibiting low or undetectable activity on polygalacturonic acid. The cloned enzyme differs from these pectate lyases in showing a similar activity on polygalacturonic acid and pectins of any degree of methylation. Pectin methyl esterification seems not to affect greatly the activity of *Bacillus* sp. BP-23 PelA. This makes PelA a unique enzyme among known pectate and pectin lyases.

The pectate lyases grouped in class III show optimum activity at high  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations and have a higher cysteine content (10–14 residues) than pectate lyases of other groups. PelA from *Bacillus* sp. BP-23 also shows optimum activity at elevated  $\text{CaCl}_2$  concentrations (0.75 mM), but it contains only two cysteine residues. In a similar way, Hrp proteins, despite their homology to class III pectate lyases, have no cysteine residues.

A pectate and a pectin lyase from other members of the genus *Bacillus* have been cloned and characterized (Nasser *et al.*, 1990, 1993; Sakamoto *et al.*, 1994, 1996). The pectate lyase, from *B. subtilis*, shows molecular size, pI and enzymic properties different from those of

*Bacillus* sp. BP-23 PelA (Nasser *et al.*, 1990). Sequence comparison of *Bacillus* sp. BP-23 PelA with *Bacillus* pectin-degrading enzymes did not show significant homology. However, the sequence of the cloned enzyme shows high homology (54% identity) to the protein deduced from the *yvpA* gene from *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997). Recently, a pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus* has been characterized (Kobayashi *et al.*, 1999). The enzyme shows similar molecular mass and pI (20 kDa and 10.3, respectively) to PelA, although it exhibits little activity on pectins. The sequence of its N-terminal region (28 amino acids) and that of an internal peptide of 12 amino acids has been determined and shows 75% identity with the corresponding regions of *Bacillus* sp. BP-23 PelA. This high homology suggests that this enzyme also belongs to class III and is similar to *Bacillus* sp. BP-23 PelA, although showing different substrate specificity. The sequence of the whole pectate lyase will be necessary to analyse the degree of homology between the two enzymes.

The results shown indicate that *Bacillus* sp. BP-23 PelA is a novel enzyme with unusual features that make it distinct from other known pectate lyases, and suggest that the cloned enzyme, together with YvpA, belongs to a new type of pectate lyases from the genus *Bacillus*. The high activity of the enzyme on pectins makes it a good candidate for biotechnological applications requiring the removal of pectin from natural substrates. At present, the activity of the enzyme on textile raw materials is being tested to evaluate the potential application of PelA for retting.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Serveis Científico-Tècnics of the University of Barcelona for their support in nucleotide sequencing. We thank X. Fontana for technical aid. This work was partially supported by the Scientific and Technological Research Council (CICYT, Spain), grant no. QUI98-0413-CO2-02. The experiments described in this article have been performed complying with current Spanish law.

## REFERENCES

- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J. & Serra, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochem* **33**, 21–28.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., 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.
- Barras, F., van Gijsegem, F. & Chatterjee, A. K. (1994). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu Rev Phytopathol* **32**, 201–234.
- Blanco, A. & Pastor, F. I. J. (1993). Characterization of cellulase-free xylanases from the newly isolated *Bacillus* sp. strain BP-23. *Can J Microbiol* **39**, 1162–1166.
- Blanco, A., Vidal, T., Colom, J. F. & Pastor, F. I. J. (1995). Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4468–4470.
- Blanco, A., Díaz, P., Martínez, J., Vidal, T., Torres, A. L. & Pastor,

F. I. J. (1998). Cloning of a new endoglucanase gene from *Bacillus* sp. BP-23 and characterisation of the enzyme. Performance in paper manufacture from cereal straw. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 48–54.

Blanco, A., Díaz, P., Zueco, J., Parascandola, P. & Pastor, F. I. J. (1999). A multidomain xylanase from a *Bacillus* sp. with a region homologous to thermostabilizing domains of thermophilic enzymes. *Microbiology* **145**, 2163–2170.

Brühlmann, F. & Keen, N. T. (1997). Cloning, sequence and expression of the *pel* gene from an *Amycolata* sp. *Gene* **202**, 45–51.

Burns, J. K. (1991). The polygalacturonases and lyases. In *The Chemistry and Technology of Pectin*, pp. 165–188. Edited by R. H. Walter. San Diego: Academic Press.

Charkowski, A. O., Alfano, J. R., Preston, G., Yuan, J., He, S. Y. & Collmer, A. (1998). The *Pseudomonas syringae* pv. tomato HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. *J Bacteriol* **180**, 5211–5217.

Collmer, A., Ried, J. L. & Mount, M. S. (1988). Assay methods for pectic enzymes. *Methods Enzymol* **161**, 329–335.

Dubnau, D. & Davidoff-Abelson, R. (1971). Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. I. Formation and properties of the donor–recipient complex. *J Mol Biol* **56**, 209–221.

Godessart, N., Muñoa, F. J., Regue, M. & Juárez, A. (1988). Chromosomal mutations that increase the production of a plasmid-encoded haemolysin in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **134**, 2779–2787.

González-Candelas, L. & Kolattukudy, P. E. (1992). Isolation and analysis of a novel inducible pectate lyase gene from the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating population VI). *J Bacteriol* **174**, 6343–6349.

Guo, W., González-Candelas, L. & Kolattukudy, P. E. (1995a). Cloning of a new pectate lyase gene *pelC* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* **323**, 352–360.

Guo, W., González-Candelas, L. & Kolattukudy, P. E. (1995b). Cloning of a novel constitutively expressed pectate lyase gene *pelB* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*. *J Bacteriol* **177**, 7070–7077.

Guo, W., González-Candelas, L. & Kolattukudy, P. E. (1996). Identification of a novel *pelD* gene expressed uniquely in planta by *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of its protein product as an endo-pectate lyase. *Arch Biochem Biophys* **332**, 305–312.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580.

von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* **14**, 4683–4690.

Heikinheimo, R., Flego, D., Pirhonen, M., Karlsson, M. B., Eriksson, A., Mäe, A., Köiv, V. & Palva, E. T. (1995). Characterization of a novel pectate lyase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant–Microbe Interact* **8**, 207–217.

Henriksson, G., Akin, D. E., Slomczynski, D. & Eriksson, K.-E. L. (1999). Production of highly efficient enzymes for flax retting by *Rhizomucor pusillus*. *J Biotechnol* **68**, 115–123.

Henrissat, B., Heffron, S. E., Yoder, M. D., Lietzke, S. E. & Journak, F. (1995). Functional implications of structure-based sequence

- alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily. *Plant Physiol* **107**, 963–976.
- Hinton, J. C. D., Sidebotham, J. M., Gill, D. R. & Salmond, G. P. C. (1989).** Extracellular and periplasmic isoenzymes of pectate lyase from *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* belong to different gene families. *Mol Microbiol* **3**, 1785–1795.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W. & Reverchon, S. (1996).** Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu Rev Microbiol* **50**, 213–257.
- Keen, N. T., Dahlbeck, D., Staskawicz, B. & Belser, W. (1984).** Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **159**, 825–831.
- Kim, J. F. & Beer, S. V. (1998).** HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *J Bacteriol* **180**, 5203–5210.
- Kobayashi, T., Koike, K., Yoshimatsu, T., Higaki, N., Suzumatsu, A., Ozawa, T., Hatada, Y. & Ito, S. (1999).** Purification and properties of a low-molecular-weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 65–72.
- Kozianowski, G., Canganella, F., Rainey, F. A., Hippe, H. & Antranikian, G. (1997).** Purification and characterization of thermostable pectate-lyases from a newly isolated thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter italicus* sp. nov. *Extremophiles* **1**, 171–182.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I. & 148 other authors (1997).** The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249–256.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Liu, Y., Chatterjee, A. & Chatterjee, A. K. (1994).** Nucleotide sequence and expression of a novel pectate lyase gene (*pel-3*) and a closely linked endopolygalacturonase gene (*peb-1*) of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2545–2552.
- Nagarajan, V. (1993).** Protein secretion. In *Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*, pp. 713–726. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Nasser, W., Chalet, F. & Robert-Baudouy, J. (1990).** Purification and characterization of extracellular pectate lyase from *Bacillus subtilis*. *Biochimie* **72**, 689–695.
- Nasser, W., Awadé, A. C., Reverchon, S. & Robert-Baudouy, J. (1993).** Pectate lyase from *Bacillus subtilis*: molecular characterization of the gene, and properties of the cloned enzyme. *FEBS Lett* **335**, 319–326.
- Sakamoto, T., Hours, R. A. & Sakai, T. (1994).** Purification, characterization, and production of two pectic transeliminases with protopectinase activity from *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**, 353–358.
- Sakamoto, T., Kawasaki, H. & Sakai, T. (1996).** Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding phosphate-inducible pectin lyase of *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett* **398**, 269–273.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shevchik, V. E., Robert-Baudouy, J. & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997).** Pectate lyase PelI of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family. *J Bacteriol* **179**, 7321–7330.
- Shevchik, V. E., Boccara, M., Vedel, R. & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1998).** Processing of the pectate lyase PelI by extracellular proteases of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol Microbiol* **29**, 1459–1469.
- Tardy, F., Nasser, W., Robert-Baudouy, J. & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997).** Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *J Bacteriol* **179**, 2503–2511.

Received 13 July 1999; revised 1 October 1999; accepted 5 October 1999.

**Pectinolytic systems of two aerobic endosporelated bacterial strains with high activity on pectin**

Margarita Soriano, Pilar Diaz and F. I. Javier Pastor\*

Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona,  
Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

\*Author for correspondence: F. I. Javier Pastor. Tel: +34-93-4034626. Fax: +34-93-4034629. E-mail: fpastor@bio.ub.es

Keywords: Pectate, pectin, lyase

## **ARTÍCULO PENDIENTE DE APROBACIÓN**

**PelC from *Bacillus subtilis*, an endocleaving pectate lyase with activity on highly methylated pectins**

Margarita Soriano, Pilar Diaz and F. I. Javier Pastor\*

Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona,  
Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

\*Author for correspondence: F. I. Javier Pastor. Tel: +34-93-4034626. Fax: +34-93-4034629. E-mail: fpastor@bio.ub.es

Keywords: Pectate, pectin, lyase

## **ARTÍCULO PENDIENTE DE APROBACIÓN**

