



**CLONACIÓN, EXPRESIÓN  
Y EVOLUCIÓN DIRIGIDA  
DE  $\beta$ -GALACTOSIDASAS  
DE PROCARIOTAS**



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PULEVA BIOTECH



José María Corral García · Granada 2005



*Dedicada a Cristina,  
Borja, Raquel, José,  
María, José Carlos y  
Mariví*



“Lo que no nos mata  
nos hace más fuertes”

“That which does not  
kill us, makes us  
stronger”

**Friedrich Nietzsche**

## *Agradecimientos*

---

*A la directiva de Puleva Biotech S.A., Dr. Jesús Jiménez y Dr. Julio Boza, por concederme una beca para la realización de la tesis doctoral en su centro de investigación.*

*A la Fundación Universidad-Empresa por mediar en dicha beca.*

*A mis directores de tesis Dr. Javier Velasco Álvarez y Dr. Óscar Bañuelos Hortigüela, por dirigirme la tesis con tanta profesionalidad y por apoyarme incondicionalmente en los momentos más difíciles.*

*A mi tutor de tesis Francisco Perfectti Álvarez por confiar plenamente en mí.*

*Al Dr. José Luis Adrio Fondevila por apostar por mí desde el principio.*

*A mis queridos compañeros biotecnólogos: Carmen Ronchel, Layla Fernández, Malena Valdivieso, Antonio Cárcelos, Carmen Membrilla e Inés Sánchez por ser no sólo unos compañeros espléndidos sino también unos inolvidables amigos.*

*A Manolo Merino, Ana De Martín, Alberto Garach, Laura Diego y Antonio Arias, por compartir con nosotros el mejor momento del día y alegrarme día a día con su simpatía y amistad.*

*A Juan Antonio Malo y David Cara por darme freak-vidilla.*

*A Ignacio por compartir conmigo tus conocimientos, espero que tu creatividad científica encuentre el hueco que merece.*

*Al resto de compañeros de la empresa por las continuas muestras de afecto que me habéis dedicado a lo largo de todos estos años. Muchas gracias a todos.*

*A la peña de fútbol de Puleva por permitirme “jueves tras jueves” disfrutar de una hora extraordinaria.*

*A Juan Miguel Rodríguez y su grupo de investigación del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Complutense de Madrid.*

*A los componentes del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias, sobretodo al grupo de Juan Pedro Martínez Camacho: Pepi, Lola, Ángel, María, Inma,*

*Jose, Eli, Jesús, Vanesa y Sonia, porque la ciencia más atrayente nace de gente como vosotros. Juan Pedro, gracias por creer en mí.*

*A Mohammed Bakkali y Mohammed Abdelaziz por ilustrarme con su sabiduría.*

*A Almirall Prodesfarma S.L. y su directiva, especialmente al Dr. Pere Berga, por mostrarme una empresa rigurosa y eficiente que me ha hecho sentir como un gran fichaje.*

*A Nuria Godessart por ser la jefa que querría cualquier investigador. Muchas gracias por tu comprensión y tus consejos.*

*A los socios, Dimas, Raja, Miguel y Teo, por los buenos momentos que hemos vivido juntos. A muchos compañeros de carrera y amigos: Pedro, Paco, Paloma, Delfina, Bea, Antonio, Rodri, Ternico, y una interminable lista.*

*A la familia Callejón-Arenas, Julio, Viky, Miguel, Guille y Marta, por impedir que me sintiera solo tan lejos de mi familia, y por vuestras continuas muestras de cariño. Quisiera hacer una mención especial a Don José Arenas, de quien guardo un especial recuerdo, por sus sabios consejos.*

*A la familia Sánchez-Sánchez, Lina hija, Carmelo, José, Juan y Antonio, y sus respectivas familias, por adoptarme como un hermano más, os lo agradezco de corazón. Y como no, a Lina Sánchez Gómez, que se ha portado conmigo como una madre, muchas gracias por todo.*

*A mis inolvidables: Sturm, Raistlin, Flint, Goldmoon, Riverwind, Tas, Derek, Tika, Caramon, Laurana, Tanis, Gilthanas, Elistan, Ulratumba, Sphinx, Slang, Vacharn, el alquimista, Orión, Garra, Suteck, Cormac, y tantos otros que me han hecho pasar momentos tan divertidos.*

*A Steve Jackson, Ian Livingstone, Margaret Weiss, Tracy Hickman, J. R. Tolkien y Michael Ende. Y especialmente a Robert E. Howard y John Milius.*

*A Juan, Estanis, Miguel, Dele, Javi, Nando, David, Jordi, Aneas, Liranzo, Iván, Alberto, Roberto, Silvén, Salva, Pipe y Nacho, auténticos como pocos.*

*A los incondicionales José, Cristina, Fran, Fermín, María José, Fermín, Guille, y Jorge. Sois unos fenómenos.*

*A Dani, Laura, Juan y Mikí por vuestra inmortal muestra de amistad a pesar de la distancia.*

*A Francis y a Lofy, muchos de los grandes momentos de mi vida han venido de vuestra mano.*

*A todos los "senseys" y "togainys". Espero que maestros como vosotros no desaparezcan nunca.*

*A Bruno, Panti I, Panti II, Luni, Monchito, Ibin, Tintín, Capitán Haddock, Canela Blanca, Eva, Tortu y Pupi.*

*A la familia Soler-Sánchez, José Carlos, Mariví y Raquel, por vuestro cariño y apoyo. Gracias por haber estado siempre a mi lado.*

*A mi numerosa familia, por vuestro apoyo a lo largo de todos estos años. Espero que sigamos siempre tan unidos.*

*A mis padres, José y María, por su gran sacrificio, por su amor, por su entrega, por todo. Todo es gracias a vosotros.*

*A Borja, por haber soportado todas mis travesuras y aún así haber mostrado admiración. Gracias por haber confiado tanto tiempo en mí.*

*A Cristina por haber estado siempre a mi lado, tanto en los buenos momentos como en los malos. Has sido lo mejor de la tesis.*

*Gracias a todos.*

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Breve reseña histórica sobre el uso de las enzimas en la industria alimentaria	3
2. Importancia de las enzimas en la industria alimentaria actual	7
3. $\beta$ -galactosidasa	10
3.1. Generalidades	10
3.2. Importancia de la $\beta$ -galactosidasa en la nutrición	12
3.3. Propiedades	15
3.3.1. Sustratos y mecanismos de acción	15
3.3.2. Inhibidores	18
3.3.3. Cofactores	19
3.3.4. Estructura	19
3.3.5. Propiedades físico-químicas	22
3.4. $\beta$ -Galactosidasa mbgA de <i>Bacillus megaterium</i>	24
3.5. $\beta$ -Galactosidasa lacA de <i>Bacillus subtilis</i>	27
3.6. $\beta$ -Galactosidasa lacZ de <i>Lactobacillus d. bulgaricus</i>	29
4. Galacto-oligosacáridos	31
4.1. Definición	31
4.2. Propiedades fisiológicas	32
4.3. Propiedades tecnológicas	32
4.4. Producción	33
4.5. Mejoras en los procesos de producción	36
5. Mutación dirigida	36
6. Evolución dirigida	38
6.1. Generalidades de la evolución dirigida de enzimas	38
6.2. Generación de variabilidad	39
6.3. Selección de las variantes mejoradas	42
6.4. Obtención de enzimas termoestables mediante evolución dirigida	44
7. Objetivos del presente trabajo	47
<b>II-MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
1. Microorganismos	51
2. Vectores plasmídicos	52
3. Reactivos químicos de uso general	58
4. Oligonucleótidos	58
5. Medios de cultivo	60
5.1. Medios de cultivo para bacterias	60

5.2. Medios de cultivo para levaduras .....	61
6. <b>Mantenimiento y cultivo de microorganismos</b> .....	62
6.1. Crecimiento de cepas bacterianas .....	62
6.2. Crecimiento de levaduras.....	63
7. <b>Manipulación de ácidos nucleicos</b> .....	64
7.1. Aislamiento de ADN genómico de bacterias .....	64
7.1.1. Extracción con fenol-cloroformo .....	64
7.1.2. Extracción con kit comercial.....	66
7.2. Tratamiento con ARNasa.....	66
7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	67
7.4. Purificación de fragmentos de ADN .....	70
7.5. Ligación de moléculas de ADN .....	71
7.6. Desfosforilación de extremos 5' de fragmentos de ADN mediante la fosfatasa alcalina de camarón .....	72
7.7. Digestión de ADN con enzimas de restricción .....	72
7.8. Minipreparaciones e ADN plasmídico (minipreps) .....	73
7.9. Mutación dirigida .....	74
8. <b>Manipulación de células</b> .....	77
8.1. Transformación de <i>E. coli</i> .....	77
8.1.1. Preparación de células electrocompetentes .....	77
8.1.2. Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación .....	78
8.2. Transformación de <i>Pichia pastoris</i> .....	79
8.2.1. Preparación de células electrocompetentes .....	79
8.2.2. Transformación de <i>P. pastoris</i> por electroporación ...	80
9. <b>Expresión heteróloga</b> .....	81
9.1. Expresión en <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	81
9.2. Expresión en <i>P. pastoris</i> X-33.....	83
10. <b>Purificación de enzimas mediante cromatografía</b> .....	85
10.1. Cromatografía de afinidad.....	85
10.2. Cromatografía de filtración en gel .....	86
11. <b>Electroforesis de macromoléculas</b> .....	87
11.1. Electroforesis de ADN.....	87
11.2. Electroforesis de proteínas.....	88
12. <b>Determinación de la concentración de proteína</b> .....	91
13. <b>Detección y cuantificación de la actividad</b> <b>β-galactosidasa</b> .....	91
13.1. Ensayo con X-Gal como sustrato.....	92
13.2. Ensayo con oNPG como sustrato.....	92
14. <b>Determinación y cuantificación de GOS</b> .....	94
<b>III. RESULTADOS Y ANÁLISIS</b> .....	95
1. <b>Expresión heteróloga de las β-galactosidasas</b> .....	97
1.1. Clonación de los genes <i>mbgA</i> , <i>lacA</i> y <i>lacZ</i> .....	97

1.1.1. Clonación del gen <i>mbgA</i> de <i>Bacillus megaterium</i> .....	97
1.1.2. Clonación del gen <i>lacA</i> de <i>Bacillus subtilis</i> .....	99
1.1.3. Clonación del gen <i>lacZ</i> de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>bulgaricus</i> .....	101
1.2. Secuenciación de los genes clonados.....	102
1.2.1. Secuenciación del gen <i>mbgA</i> .....	102
1.2.2. Secuenciación del gen <i>lacA</i> .....	105
1.2.3. Secuenciación del gen <i>lacZ</i> .....	106
1.3. Construcción de los plásmidos de expresión en <i>Pichia pastoris</i> .....	108
1.4. Expresión de los genes de las $\beta$ -galactosidasas en <i>Pichia</i> <i>pastoris</i> .....	113
1.5. Obtención de la cepa de expresión <i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>w</i>	121
1.6. Construcción de los plásmidos de expresión para <i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>w</i> .....	122
1.6.1. Construcción del plásmido para la expresión del gen <i>mbgA</i> de <i>Bacillus megaterium</i> en <i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>w</i> .....	123
1.6.2. Construcción del plásmido pBT143 para la expresión del gen <i>lacA</i> de <i>Bacillus subtilis</i> en <i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>w</i> .....	125
1.6.3. Construcción del plásmido pBT145 para la expresión del gen <i>lacZ</i> de <i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i> en <i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>w</i> .....	126
1.7. Expresión en <i>Escherichia coli</i> de los genes de las $\beta$ - galactosidasas.....	128
2. <b>Purificación parcial y determinación de la masa molecular de la <math>\beta</math>-galactosidasa <i>lacA</i> de <i>B. subtilis</i>.....</b>	131
3. <b>Síntesis de GOS</b> .....	137
4. <b>Inactivación de la proteína <i>lacA</i> de <i>B. subtilis</i></b> .....	141
4.1. Mutación dirigida: obtención del mutante tBT17/ <i>lacA</i> <sup>-</sup> ...	141
4.2. Expresión y caracterización de la $\beta$ -galactosidasa mutada expresada a partir del plásmido pBT143/ <i>lacA</i> <sup>-</sup> .....	142
5. <b>Obtención de variantes termoestables de la proteína <i>lacZ</i> de <i>L. d. bulgaricus</i> mediante evolución dirigida ..</b>	145
5.1. Generación de variantes del gen <i>lacZ</i> de <i>L. d. bulgaricus</i> por mutación aleatoria .....	146
5.2. Selección de variantes termoestables ("Screening") ....	150
5.3. Identificación de mutaciones en las variantes termoestables .....	157
5.4. Síntesis de galacto-oligosacáridos (GOS) con las $\beta$ - galactosidasas termoestables generadas.....	160

**IV-DISCUSIÓN** 163

1. <b>Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes de <math>\beta</math>-galactosidasas</b> .....	165
1.1. Clasificación de las $\beta$ -galactosidasas.....	165
1.1.1. MbgA de <i>Bacillus megaterium</i> .....	166
1.1.2. LacA de <i>Bacillus subtilis</i> .....	168
1.1.3. LacZ de <i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i> .....	170
2. <b>Expresión heteróloga de <math>\beta</math>-galactosidasas</b> .....	172
2.1. Expresión heteróloga de $\beta$ -galactosidasas en <i>P. pastoris</i>	172
2.2. Expresión heteróloga de $\beta$ -galactosidasas en <i>E. coli</i> ....	176
2.3. Purificación de $\beta$ -galactosidasas.....	176
2.4. Determinación de la masa molecular de la proteína lacA de <i>Bacillus subtilis</i> .....	178
3. <b>Mutación dirigida</b> .....	179
4. <b>Obtención, selección y análisis de las variantes termoestables de <math>\beta</math>-galactosidasa mediante evolución dirigida</b> .....	183
4.1. Generación de variantes de la $\beta$ -galactosidasa de <i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i> .....	183
4.2. Selección de las variantes termoestables de la $\beta$ -galactosidasa lacZ .....	185
4.3. Análisis de los cambios aminoacídicos producidos con respecto a la mejora en la termoestabilidad de las variantes de la $\beta$ -galactosidasa lacZ obtenidas .....	186
4.3.1. Variabilidad natural de la termoestabilidad de las enzimas naturales .....	186
4.3.2. Mecanismos que afectan a la termoestabilidad .....	188
4.3.2.1. Rigidez .....	189
4.3.2.2. Hidrofobicidad .....	195
4.3.2.3. Composición aminoacídica .....	198
4.3.2.4. Fuerzas de estabilización intrínsecas .....	201
4.3.2.5. Entropía de la proteína .....	202
4.4. Conclusiones sobre la mejora en la termoestabilidad ...	204
4.5. Síntesis de GOS.....	205
4.6. Cuestiones finales .....	206

**V-CONCLUSIONES** 209

**VI-BIBLIOGRAFÍA** 213



# ***I. Introducción***



## **1. Breve reseña histórica sobre el uso de las enzimas en la industria alimentaria**

Una enzima es una proteína que cataliza específicamente una o varias reacciones bioquímicas del metabolismo.

Fue Kühne, en 1867, el que propuso el nombre de "enzima" para el elemento responsable de los procesos de fermentación descritos hasta ese momento. En griego, "en" significa sobre y "zyma" es levadura.

En la Prehistoria, el ser humano ya utilizaba microorganismos, y por lo tanto, sus equipos enzimáticos, para la elaboración de alimentos fermentados. Los primeros ejemplos datados los tenemos en civilizaciones tan antiguas como la sumeria (fabricación de cerveza, 6 000 a. de C.), la egipcia (fabricación de pan, 4 000 a. de C.) y la de Extremo Oriente (manufactura de comida y bebidas alcohólicas, 3 000 a. de C.).

Una de las primeras referencias de la utilización de enzimas como tales en la elaboración de un alimento se encuentra en la "Ilíada" de Homero (s. VIII a. de C.). En esta obra se menciona que la leche que se había almacenado en una bolsa hecha con estómago de un ternero se convertía en una sustancia semisólida. Sin saberlo se estaba utilizando la actividad proteasa remanente en las paredes del estómago para coagular la leche. Si se sometía a presión esta sustancia, se obtenía un material más seco (llamado queso) que mostraba propiedades preferidas a las de la leche: podía ser fácilmente transportado y ganaba aromas con el paso del tiempo.

La savia de higuera, con alto contenido en proteasas, se

utilizaba con los mismos propósitos. Pero en ninguno de estos casos se conocía la verdadera identidad del elemento responsable de estas reacciones. De hecho, se creía que la fermentación, y por tanto, las reacciones enzimáticas asociadas a ella, era un proceso espontáneo hasta que, en 1857, el químico francés Louis Pasteur comprobó que la fermentación sólo ocurría en presencia de células vivas.

Años más tarde, el químico alemán Eduard Buchner descubrió en 1897 que un extracto de levadura libre de células "puede producir fermentación". La incógnita fue entonces resuelta: la levadura produce las enzimas y éstas llevan a cabo la fermentación.

Todos los intentos de aislar los principios activos de las reacciones enzimáticas fracasaron hasta que Payen y Persoz, en 1833, consiguieron aislar el elemento responsable de la hidrólisis del almidón, materia prima para la elaboración de la cerveza, al que llamaron diastasa (actualmente amilasa). La descripción que dieron para esta primera preparación enzimática industrial fue la siguiente: es un sólido blanco, amorfo, insoluble en alcohol pero soluble en agua. Para la producción de esta diastasa maceraron cebada germinada en agua fría, luego la presionaron y la filtraron. El filtrado se calentó a 70°C, se filtró de nuevo y se precipitó con alcohol. El precipitado se recogió en un filtro y posteriormente, tras repetidas resuspensiones y precipitados con alcohol, fue separado del resto de sustancias nitrogenadas residuales.

La primera compañía dedicada a la producción de enzimas para el sector alimentario fue fundada en 1874 por Christian Hansen en Copenhague. "Christian Hansen's Laboratory" fue el

primer vendedor industrial de una preparación enzimática estandarizada, el cuajo, para la fabricación de queso. El cuajo, una mezcla de quimosina y pepsina, era y es aún obtenido mediante extracción con sales del cuarto estómago de terneros lactantes. Desde este acto pionero fueron apareciendo, de forma lenta pero progresiva, distintos procesos industriales para obtener preparaciones de enzimas cuyas aplicaciones fueron siendo patentadas por distintas compañías.

La producción industrial de enzimas comenzó como un negocio que generaba beneficios modestos, pero que poco a poco ha convertido a sencillas empresas en grandes compañías. Por ejemplo, hacia 1890, el científico japonés Jokichi Takamine comenzó a aislar amilasas bacterianas en lo que posteriormente pasó a llamarse Miles Laboratories (hoy parte de Genencor International). En 1894 obtuvo una patente (probablemente la primera en este campo) para la producción de una preparación enzimática diastásica de origen fúngico, a la que llamó "Takadiastase".

En 1895, Boidin descubrió un nuevo proceso ("amyloprocess") para la manufactura de alcohol. Consistía en calentar cereales, inocular hongos para la formación de enzimas sacarificantes, y posteriormente, transformar los azúcares liberados en alcohol por medio de fermentación con levaduras. Junto con Efferont, el cual trabajaba con enzimas para la producción de alcohol desde 1900, Boidin fundó la "Société Rapidase" (hoy parte de DSM) en 1920.

Una de las claves del éxito de las compañías dedicadas a la producción de enzimas fue que sus productos estaban implicados

en procesos de fabricación de alimentos de consumo muy extendido, como el pan o la cerveza. La fabricación de pan requiere la fermentación de los azúcares presentes en la masa de harina por medio de levaduras. Sin embargo, el componente fundamental de la harina es el almidón, polímero de glucosa que *Saccharomyces cerevisiae* no puede metabolizar debido a que carece de las enzimas necesarias. Lintner, en 1890, observó que la diastasa (amilasa) de trigo presente en la harina era importante en la fabricación de masa de pan. Esta enzima catalizaba la hidrólisis de almidón a glucosa, azúcar sí metabolizable por *S. cerevisiae*. Este descubrimiento condujo a que la adición a la masa de extracto de malta, producto rico en diastasa, se convirtiera en un procedimiento estándar en la fabricación de pan (los panaderos americanos en 1922 usaron 30 millones de libras de extracto de malta valorado en 2,5 millones de dólares).

Al igual que la fabricación de pan, la producción de cerveza es un proceso fermentativo realizado por una levadura que carece de capacidad amilolítica. En la fabricación tradicional de cerveza, el almidón del grano de cebada se digiere por acción de la actividad  $\alpha$ -amilasa sintetizada por el propio grano al germinar (malta), pero la adición de amilasas es una práctica generalizada en la mayoría de las industrias cerveceras actuales. También es frecuente el empleo de  $\beta$ -glucanasas (celulasas) para digerir el material celulósico (como el  $\beta$ -glucano) que acompaña al almidón procedente de la cebada, y que produce una elevada viscosidad del mosto de cerveza, lo que causa problemas para su filtración (Polaina, 2004).

Uno de los avances técnicos más importantes en el uso

industrial de enzimas ha sido la posibilidad de inmovilizar estos biocatalizadores a soportes inertes. Mediante la inmovilización se puede obtener una mayor estabilidad enzimática, la posibilidad de reutilizar las enzimas y una mejora en el diseño de biorreactores de fácil manejo y control.

La glucosa isomerasa de *Streptomyces* sp. fue la primera enzima de carácter alimentario en ser inmovilizada con fines industriales (Takasaki et ál., 1969), lo que le permitió obtener la primera producción industrial de jarabe de maíz rico en fructosa (HFCS, "High-fructose corn syrup"). En Estados Unidos, la División Clinton de Standard Brands (ahora ADM) fue la primera compañía que usó esta enzima en 1971. Los desmesurados precios de la sacarosa durante 1973-1975 promovieron el interés por los HFCS, lo cual disparó el precio de la glucosa isomerasa y el interés de otras compañías por esta enzima. Novozymes, y posteriormente Gist-brocades (actualmente DSM) entraron en el mercado de la glucosa isomerasa, desarrollando productos enzimáticos más estables, baratos y fáciles de usar. Gracias a la optimización de los procesos de producción de glucosa isomerasa, la inmovilización y reacción con glucosa isomerasa inmovilizada, la productividad se incrementó de 500 kg HFCS/kg de enzima inmovilizada (1975) a 20000 kg/kg (1997) (Praaning, 2003). Actualmente, la glucosa isomerasa es la enzima inmovilizada más utilizada en el mundo.

## **2. Importancia de las enzimas en la industria alimentaria actual**

La aparición de nuevas tecnologías en el campo de la biología molecular y la microbiología durante el siglo XX, ha permitido, entre otros avances, la producción de enzimas mediante

expresión heteróloga. De este modo, el gen que codifica una enzima es expresado por un microorganismo de crecimiento rápido y manipulación segura. La expresión heteróloga permite solventar la frecuente baja productividad de los microorganismos originales y facilita la purificación de la proteína deseada. Esta tecnología ha supuesto un gran avance, no solo en la producción de enzimas naturales sino también la generación y producción de enzimas modificadas.

La importancia actual de los procesos enzimáticos aplicados a la industria alimentaria es tal, que permite la producción de compuestos, ampliamente utilizados, que no podrían obtenerse de ninguna otra forma. Un ejemplo de ello es la ciclodextrina, obtenida por medio de la enzima ciclodextrina-glicosiltransferasa a partir de almidón. La ciclodextrina permite estabilizar sabores y aromas, proteger ingredientes activos y eliminar o enmascarar sabores y olores desagradables. Además, favorece la formación de emulsiones y la retención de agua, permite la generación de composiciones estables, simplifica la dosificación y manipulación de polvos secos, y reduce los costos de embalaje y almacenamiento.

La utilización cada vez mayor de microorganismos y enzimas en la alimentación ha obligado a que los países, a través de diferentes organismos (EFSA "European Food Safety Authority" en la Unión Europea; FDA "Food and Drug Administration" en EE.UU; JECFA "Joint Expert comité on Food Additives" de la FAO/WHO) regulen estos productos industriales con objeto de garantizar la salud del consumidor.

En la Unión Europea se encuentra en fase de borrador un

régimen legislativo común para las enzimas alimentarias. En estos momentos todas las enzimas (excepto la lisozima y la invertasa) utilizadas en la industria alimentaria se encuentran fuera del espectro de la Directiva Europea sobre Aditivos Alimentarios ya que se consideran "ayudas para el procesamiento" y no aditivos propiamente dichos.

En los EE.UU para usar un microorganismo que produzca enzimas para consumo humano, se deben de cumplir una serie de requisitos legales, que se centran en que tal microorganismo debe figurar en la llamada lista "GRAS" (*Generally recognized as secure*) de la FDA, es decir, que haya demostrado una larga historia de seguridad. Existen unos 50 microorganismos GRAS aprobados para la industria alimentaria, algunos de ellos son: *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, y especies del género *Lactobacillus*.

En general los principios utilizados por la FDA y sobre los que previsiblemente se basará la futura regulación europea sobre microorganismos utilizados para la producción de alimentos, ingredientes alimentarios o enzimas son:

- Determinación taxonómica del microorganismo en cuestión.
- Familiaridad: conocimiento previo e historia de uso.
- Patogenicidad: existencia o no de cepas patógenas en el grupo taxonómico.
- Uso final: información sobre si el microorganismo será añadido al producto final o se utiliza únicamente para la producción de un metabolito o enzima.

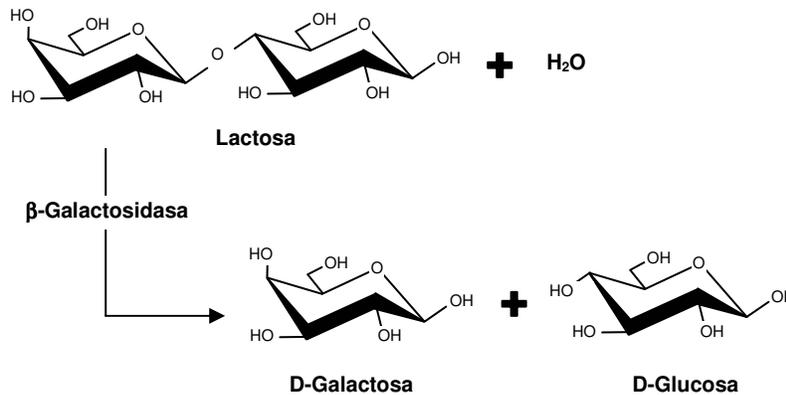
Por último y como curiosidad diremos que la producción

industrial de enzimas es un negocio que a comienzos del siglo XXI mueve en torno a 1600 millones de dólares al año, de los cuales el 70% se debe a productos del género *Bacillus* (Schallmey et ál., 2004).

### **3. $\beta$ -Galactosidasas**

#### **3.1. Generalidades**

Las enzimas  $\beta$ -galactosidasas ( $\beta$ -D-galactósido galactohidrolasas, EC 3.2.1.23) hidrolizan enlaces O-glicosídicos de residuos  $\beta$ -D-galactosa terminales y no reductores. Se conocen comúnmente como lactasas debido a que catalizan la hidrólisis de lactosa en sus azúcares constituyentes: galactosa y glucosa (Fig. 1.1). Sin embargo, esta denominación no es del todo correcta, ya que no todas las  $\beta$ -galactosidasas muestran actividad frente a la lactosa. Esto es lo que ocurre con las  $\beta$ -galactosidasas de las células vegetales y las de los órganos animales distintos al intestino, las cuales tienen poca o ninguna actividad sobre la lactosa, siendo su función biológica la hidrólisis de residuos galactosilados presentes en glicolípidos, glicoproteínas y mucopolisacáridos (Wallenfels et ál., 1972). Esta diversidad de funciones hace que sea una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza, por lo que se encuentra representada en casi todos los grupos taxonómicos.



**Figura 1.1.** Hidrólisis de la lactosa catalizada por la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

Las primeras descripciones de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (llamada entonces lactasa) se realizaron analizando dicha actividad en *E. coli* (Deere, 1938). Desde entonces, esta actividad enzimática ha sido objeto de numerosos estudios. El control genético que regula la biosíntesis de la enzima en este microorganismo fue analizado por recombinación (Pardee, 1959; Jacob, 1961) y transducción (Revel, 1961). Algunos de estos estudios han sido especialmente relevantes, como la descripción del operón del gen responsable de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en *E. coli* (operón *lac*). Gracias a este descubrimiento, Jacob y Monod obtuvieron el Premio Nobel de Medicina en 1965.

Numerosos autores han descrito la purificación de distintas  $\beta$ -galactosidasas. Una de las primeras fue la de *E. coli* (Lederberg 1950; Cohn et ál., 1951). Posteriormente, se han purificado otras  $\beta$ -galactosidasas de importancia para la industria, como son las de *Aspergillus niger* (Bahl y Agrawal, 1969), *Kluyveromyces fragilis* (Kulikova et ál., 1972), *A. oryzae* (Tanaka et ál., 1975) y *K. lactis* (Mbuj-Kalala et ál., 1988). Sin embargo, sólo se han cristalizado

tres enzimas: la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (Hu et ál., 1959; Wallenfels 1959), la de *Sulfolobus solfataricus* (Aguilar et ál., 1997) y la de *Thermus thermophilus* (Hidaka et ál., 2002).

Coutinho y Henrissat (1999) han editado una base de datos ("Carbohydrate-Active enZYmes, CAZY"; <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/acc.html>) en la que clasifican todas las glicosil hidrolasas (como las  $\beta$ -galactosidasas) de secuencia conocida estableciendo sus relaciones filogenéticas. Estos autores han podido registrar unas ciento setenta secuencias de  $\beta$ -galactosidasas, de las cuales, cinco corresponden a arqueobacterias, más de cien son de bacterias, una docena corresponden a hongos, unas treinta de plantas, tres de invertebrados y quince de vertebrados (incluido el ser humano). Esta matriz de datos está continuamente creciendo, y es lógico pensar que se irán incorporando otras  $\beta$ -galactosidasas que ya se conocen pero cuyos genes no han sido secuenciados.

### **3.2. Importancia de la $\beta$ -galactosidasa en la nutrición**

La leche humana es considerada actualmente como el alimento más completo para el niño en los primeros seis meses de vida y debe ser proporcionada hasta los dos años, según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), por ser una fuente de proteínas de calidad, de calcio, de vitamina A y de riboflavina (vitamina B2). Además de proveer todos los nutrientes necesarios para el lactante, la leche materna previene de una serie de enfermedades por su elevado contenido de anticuerpos. Tras el destete, la leche deja de ser el alimento más importante en el ser humano, pero sigue ocupando un lugar

preferencial en la dieta de los niños y adultos de determinadas zonas geográficas. En estos casos la leche materna humana es sustituida por leche de otras especies como la de vaca, búfalo o cabra.

El principal azúcar de la leche es la lactosa, la cual es digerida en el intestino humano por la enzima lactasa. La actividad lactasa en mamíferos decrece tras el destete, y eso lleva a un cierto grado de intolerancia a la lactosa en muchos grupos de poblaciones (principalmente adultos no caucásicos). Hay personas, independientemente de su etnia, que padecen intolerancia primaria a la lactosa que consiste en que desde su nacimiento son incapaces de producir suficientes cantidades de lactasa. También, puede presentarse una intolerancia temporal a la lactosa producida por factores diversos como intervenciones quirúrgicas, infecciones gastrointestinales, malnutrición o ingesta de ciertos alimentos. Este caso se conoce como intolerancia secundaria a la lactosa y no suele persistir más de un mes. Por un motivo u otro, el 70% de la población humana mundial adulta es intolerante a la lactosa (de Vrese et ál., 2001). Esto ha llevado a que se hayan establecido procedimientos industriales, para preparar productos libres de lactosa, a partir de leche o suero, con fines clínicos o meramente comerciales, por medio de la hidrólisis enzimática con lactasas de este disacárido. Además de permitir el consumo por personas intolerantes a la lactosa, la hidrólisis de la lactosa en leche y suero suministra nuevas propiedades funcionales a estos ingredientes que pueden ser explotados en una amplia variedad de productos (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Aplicaciones industriales de la hidrólisis de la lactosa (Mahoney, 2003).

<b>Producto/proceso</b>	<b>Ventajas</b>
Leche baja en lactosa	Supera el problema de la intolerancia a la lactosa
Leche condensada endulzada, helado	Reduce la cristalización de la lactosa en productos lácteos concentrados o congelados
Yogurt y queso	Acelera la maduración mediante la producción de azúcares más fáciles de fermentar
Sirope de azúcar de suero sin proteínas	El mayor dulzor de la glucosa y galactosa permite su uso en helados, productos horneados, confitería, y refrescos
Fermentación a etanol	Las levaduras responsables de la fermentación crecen más fácilmente con la glucosa producida

Las  $\beta$ -galactosidasas, generalmente lactasas, se obtienen de unas pocas fuentes microbianas, principalmente levaduras y hongos filamentosos (Tabla 1.2), considerados hospedadores seguros para enzimas de carácter alimentario. Las enzimas comerciales se clasifican generalmente como pH-ácidas (pH óptimo <5) para usarlas en sueros ácidos, o pH-neutras (pH óptimo 5,5-7,0) para usarlas en leche o en suero dulce.

**Tabla 1.2.** Fuentes comerciales de  $\beta$ -galactosidasa para la hidrólisis de lactosa en alimentos (Mahoney, 2003).

<b>Organismo</b>	<b>pH óptimo</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>
<b>Bacterias</b>		
<i>Bacillus</i> spp. relacionada con <i>B. stearothermophilus</i>	5,5-6,5	116
<b>Levaduras</b>		
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,5-7,5	201
<i>K. lactis</i>	6,5-7,0	117
<i>Candida pseudotropicalis</i>	6,2	-
<b>Hongos</b>		
<i>Aspergillus niger</i>	2,5-4,0	109-112
<i>A. oryzae</i>	4,5-5,0	90

### 3.3. Propiedades

#### 3.3.1. Sustratos y mecanismo de acción

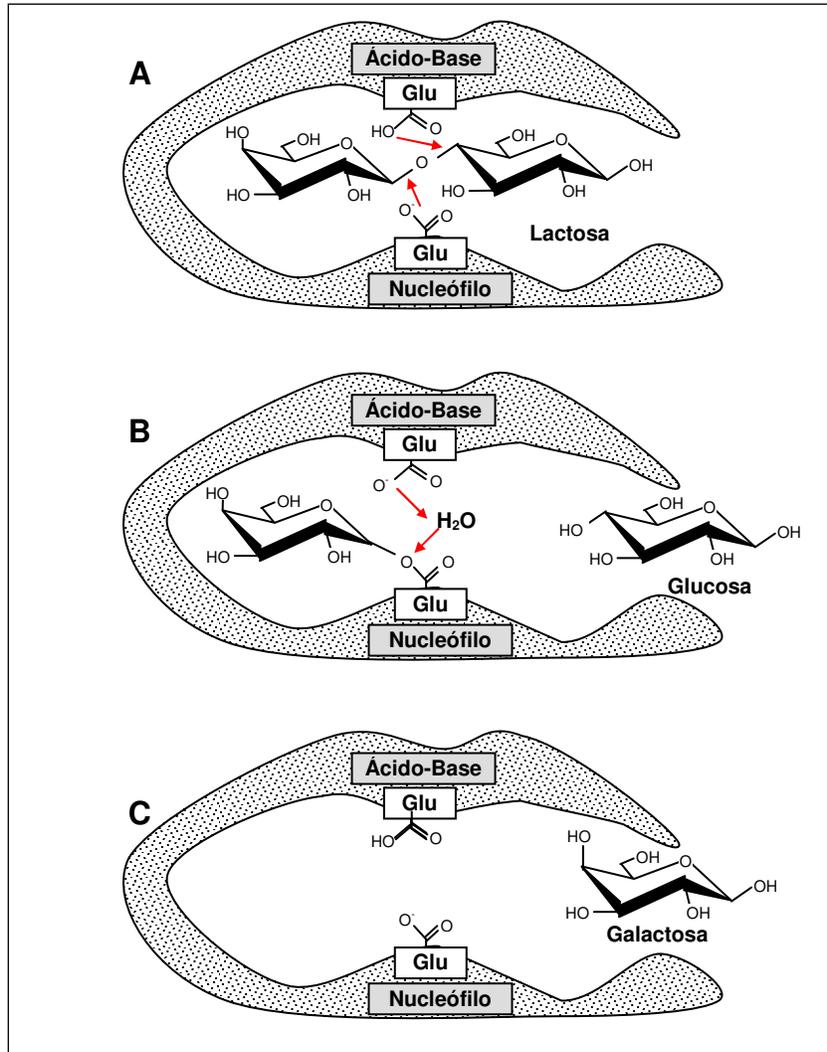
Por definición, las enzimas  $\beta$ -galactosidasas hidrolizan enlaces O-glicosídicos y exhiben una especificidad estricta por la parte glicídica del sustrato, concretamente los  $\beta$ -D-galactósidos. Sin embargo, como única excepción, esta enzima posee también actividad, aunque reducida, sobre aquellos sustratos en los que el grupo hidroximetilo del carbono 6 del azúcar es un grupo metilo o un átomo de hidrógeno. En consecuencia, la enzima presenta actividad sobre  $\alpha$ -L-arabinosas y  $\beta$ -D-fucósidos. Otros cambios como la metilación del hidroxilo en el carbono 2, 3, 4 o 6; la pérdida de la estructura de anillo piranósido; o la conversión a la forma  $\alpha$ -anomérica, lleva a una pérdida de actividad de las  $\beta$ -galactosidasas sobre estos sustratos. La sustitución del oxígeno

glicosídico por azufre causa la pérdida de actividad pero no la pérdida de la afinidad de unión (Wallenfels et ál., 1972).

El mecanismo de acción de las  $\beta$ -galactosidasas no se conoce completamente, pero la enzima de *E. coli* parece funcionar de un modo análogo a la lisozima. De esta forma, un aminoácido actúa como ácido, donando un protón al oxígeno glicosídico. La parte no galactósido del sustrato se libera, formándose un intermediario enzima-galactosa por medio de la estabilización, por un aminoácido cargado negativamente, de la carga positiva generada en el grupo carbónico de la galactosa. Por último, el intermediario enzima-galactosa se resuelve reaccionando con una molécula de  $H_2O$ , liberando galactosa y regenerándose el estado ácido del primer aminoácido y el estado oxidado del aminoácido nucleofílico (Sinnott, 1978) (Fig. 1.2).

Este mecanismo de acción, que parece ser común a todas las  $\beta$ -galactosidasas, tiene como consecuencia la conservación en los productos de la reacción de la configuración del carbono anomérico ( $\beta$  en este caso) que participa en el enlace O-glicosídico.

La extensa cantidad de trabajos realizados sobre la enzima lacZ de *E. coli*, incluida su cristalización, han permitido localizar los dos aminoácidos implicados directamente en el proceso catalítico descrito: Glu 461, que actúa como donador de protón, y Glu 537, que actúa como nucleófilo (Juers et ál., 2001).



**Figura 1.2.** Mecanismo de acción de las  $\beta$ -galactosidasas. En la catálisis realizada por estas enzimas intervienen principalmente dos aminoácidos que actúan uno como ácido/base y otro como nucleófilo. A) El aminoácido ácido/base actúa como ácido y dona un protón al oxígeno glicosídico de la molécula de lactosa, y por otro lado, el residuo de galactosa se une a la enzima a través del aminoácido que actúa como nucleófilo. B) El complejo enzima-galactosa reacciona con una molécula de agua de modo que el aminoácido ácido/base actúa ahora como base aceptando un protón del agua. C) La galactosa es liberada, y se regenera el centro activo a su estado inicial.

Una variación en la resolución del complejo enzima-galactosa explicaría la capacidad de síntesis de oligosacáridos que muestran algunas  $\beta$ -galactosidasas. En condiciones de altas concentraciones de sustrato y/o cuando el grado de conversión de sustrato es alta, el aceptor de la galactosa es otro azúcar (como lactosa, galactosa, o glucosa) en lugar de agua, produciéndose una reacción de transferencia que da lugar a la síntesis de oligosacáridos (Mahoney, 1998). Más adelante nos centraremos en la síntesis de este tipo de azúcares y en sus características.

Además de los  $\beta$ -galactósidos naturales, existen una serie de sustratos sintéticos, análogos estructuralmente a la lactosa, que se han utilizado asiduamente en experimentación con  $\beta$ -galactosidasas debido a la formación de un producto cromóforo tras su hidrólisis. Los más utilizados son el oNPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido), el pNPG (p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido) y el X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido). La comparación de la relación  $k_{cat}/K_m$  de varias  $\beta$ -galactosidasas muestra que el sustrato sintético oNPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido) es mejor sustrato que la lactosa en todos los casos estudiados.

### **3.3.2. Inhibidores**

Hay muchos análogos de sustrato/producto que inhiben la actividad  $\beta$ -galactosidasa. La galactosa es un inhibidor competitivo, mientras que la glucosa es a menudo inefectiva excepto a muy altas concentraciones, ejerciendo en estas condiciones una inhibición de tipo no competitivo (Wallenfels et ál., 1960).

Los tiogalactósidos como el p-aminofenil-β-D-tiogalactósido son débiles inhibidores competitivos (Mahoney et ál., 1977; Steers et ál., 1971). Los inhibidores más potentes son las 1-4 y 1-5 galactonolactonas, especialmente estas últimas, los cuales, se ha sugerido, podrían parecerse a la forma del estado de transición del sustrato (Conchi et ál., 1967).

Otro potente inhibidor de la actividad β-galactosidasa es el calcio (Mahoney et ál., 1980; Guy et ál., 1978), presente en altas concentraciones en leche y suero. Este es el motivo por el que las β-galactosidasas pueden muchas veces exhibir una actividad reducida en estas matrices alimentarias (Greenberg et ál., 1984; Mahoney et ál., 1980).

### **3.3.3. Cofactores**

Se han descrito varios ejemplos de requerimientos de cofactores para β-galactosidasas. En general, las enzimas pH-neutras requieren  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  para tener una actividad máxima, mientras que las pH-ácidas (de hongos) no requieren iones metálicos. Aunque no pueden considerarse como cofactores, la adición de algunos compuestos en las mezclas de reacción in vitro permite detectar mayores niveles de actividad en enzima pH-neutras, como es el caso de la adición de compuestos con grupos sulfhidrilo (2-mercaptoethanol o ditioneitol).

### **3.3.4. Estructura**

El gran número de β-galactosidasas descritas, y su amplia distribución en la naturaleza, hace que las características de estas enzimas varíen mucho dependiendo de su origen.

La  $\beta$ -galactosidasa codificada por el gen *lacZ* de *Escherichia coli* es la mejor conocida estructuralmente. A nivel de la secuencia primaria, cada subunidad de la enzima *lacZ* de *E. coli* está compuesta por 1 023 aminoácidos que determinan una masa molecular de 116 kDa. Valor similar a la masa molecular de la mayoría de las  $\beta$ -galactosidasas de bacterias y hongos descritas.

Sin embargo, como ejemplos de la variabilidad existente en la estructura de las  $\beta$ -galactosidasas de diferentes organismos, podemos encontrar desde enzimas formadas por subunidades de 511 aminoácidos y 56 kDa (*Pyrococcus woesei*) hasta enzimas formadas por 2 406 aminoácidos y 246 kDa (*Streptococcus pneumoniae*). Comparando la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* con las subunidades de las  $\beta$ -galactosidasas de procariotas, se observa una similitud en la masa molecular (117 kDa) y una alta similitud en la secuencia, indicando una estrecha relación estructural y evolutiva entre enzimas pertenecientes a organismos de diferentes reinos (Poch et ál., 1992). En mamíferos, se conocen las masas moleculares de algunas  $\beta$ -galactosidasas como la del ser humano (76 kDa), o la del ratón (73 kDa). Para más información sobre la estructura primaria y las masas moleculares de las  $\beta$ -galactosidasas conocidas recomendamos la consulta de la base de datos "CAZY" (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/acc.html>).

A pesar de que no se conoce la estructura tridimensional de la mayoría de las  $\beta$ -galactosidasas, si se conoce la estructura cuaternaria de muchas de ellas. Se han descrito  $\beta$ -galactosidasas monoméricas, heterodiméricas y homotetraméricas.

Así, la  $\beta$ -galactosidasa nativa de *E. coli* tiene una masa molecular de 464 kDa y está compuesta por cuatro subunidades

idénticas de 116 kDa cada una (Fowler et ál., 1978). En *E. coli* se ha comprobado que las subunidades y los dímeros de subunidades son inactivos mientras que el estado activo del tetrámero se debe a la contribución al centro catalítico de cada sitio activo mediante un lazo de cada monómero vecino (Jacobson, 1993). En cambio, las  $\beta$ -galactosidasas estudiadas en las arqueobacterias están compuestas por cuatro subunidades idénticas de 56 kDa cada una.

En algunas especies se ha visto que en un mismo individuo pueden existir varios tipos de  $\beta$ -galactosidasas con estructura cuaternaria distinta como ocurre, por ejemplo, en *Lactobacillus plantarum* en la que se han descrito dos  $\beta$ -galactosidasas: un monómero codificado por un solo gen y un heterodímero codificado por dos genes adyacentes (Kleerebezem et ál., 2003).

Se ha descrito también que algunas  $\beta$ -galactosidasas, como es el caso de las de origen fúngico, pueden sufrir modificaciones post-traduccionales en forma de diferentes grados de glicosilación; lo que genera la existencia de diferentes isoformas de esta enzima en estos organismos (Widmer et ál., 1979). En *E. coli*, la electroforesis y tinción histoquímica de extractos proteicos muestran diferentes bandas con actividad  $\beta$ -galactosidasa, lo que podría indicar la existencia de diferentes isoformas de esta enzima en esta bacteria (Appel et ál., 1965). Sin embargo, la purificación y la caracterización de estas proteínas de *E. coli* muestra que son polímeros que no presentan diferencias en su composición (Marchesi et ál., 1969).

#### **2.3.4. Propiedades físico-químicas**

La misma diversidad que se observa a nivel de estructura aparece a la hora de determinar parámetros como el pH óptimo y la temperatura óptima de actividad de las distintas  $\beta$ -galactosidasas estudiadas. El pH óptimo más ácido corresponde a las  $\beta$ -galactosidasas descritas en hongos filamentosos oscilando entre 2,5 y 5; mientras que, en levaduras y bacterias, el pH óptimo de actividad está entre 6,2 y 7,5. En cuanto a la temperatura óptima también podemos distinguir entre la determinada para enzimas de hongos filamentosos, cercana a los 60°C, y la de levaduras y bacterias que se aproxima a los 40°C. Como es lógico, en las enzimas de los organismos termófilos la temperatura óptima alcanza rangos superiores, como en *Thermus* sp. que es cercana a los 70°C (Akiyama et ál., 2001).

Algunas de las características de las  $\beta$ -galactosidasas más estudiadas se recogen en la Tabla 1.3.

**Tabla 1.3.** Propiedades enzimáticas de algunas  $\beta$ -galactosidasas (Mahoney, 2003).

	<i>E. coli</i>	<i>K. lactis</i>	<i>A. niger</i>
<b>Peso molecular (kDa)</b>	464	201	109-112
<b>pI</b>	4,61	5,1	4,64
<b>pH óptimo</b>	7,2-7,4	6,2-6,4	2,5-4,0
<b>pH estabilidad</b>	6-8	6,5-7,5	2-8
<b>Tª óptima (°C)</b>	~40	~37	~55-60
<b>Energía activación (kJ/mol)</b>	12,6	38,1	35,1
<b>K<sub>cat</sub> oNPG (s-1)</b>	1,38 x 10 <sup>6</sup>	3,41 x 10 <sup>3</sup>	2,19 x 10 <sup>5</sup>
<b>K<sub>cat</sub> lactosa (s-1)</b>	5,1 x 10 <sup>3</sup>	1,551 x 10 <sup>3</sup>	1,91 x 10 <sup>5</sup>
<b>K<sub>m</sub> oNPG (mM)</b>	0,161	2,72	2,22
<b>K<sub>m</sub> lactosa (mM)</b>	1,9	13,9	85-125
<b>k<sub>cat</sub> /K<sub>m</sub> pNPG (s-1 M-1)</b>	8,57 x 10 <sup>9</sup>	1,25 x 10 <sup>6</sup>	98,6 x 10 <sup>6</sup>
<b>k<sub>cat</sub> /K<sub>m</sub> lactosa (s-1 M-1)</b>	2,68 x 10 <sup>6</sup>	1,08 x 10 <sup>5</sup>	1,91 x 10 <sup>6</sup>
<b>K<sub>i</sub> galactosa (mM)</b>	21	27,7	4
<b>K<sub>i</sub> PAPTG (mM)</b>	5	6,05	desconocido
<b>Activadores</b>	Na <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	ninguno
<b>Inhibidores</b>			
<b>Galactono-1-4-lactona</b>	Sí	Sí	desconocido
<b>p-cloromercuribenzoato</b>	Sí	Sí	No

Dado que en la presente tesis se han llevado a cabo estudios con  $\beta$ -galactosidasas de distintos orígenes pasamos a detallar el conocimiento previo sobre las enzimas obtenidas a partir de los microorganismos más relevantes para nuestro trabajo.

### **3.4. $\beta$ -Galactosidasa *mbgA* de *Bacillus megaterium***

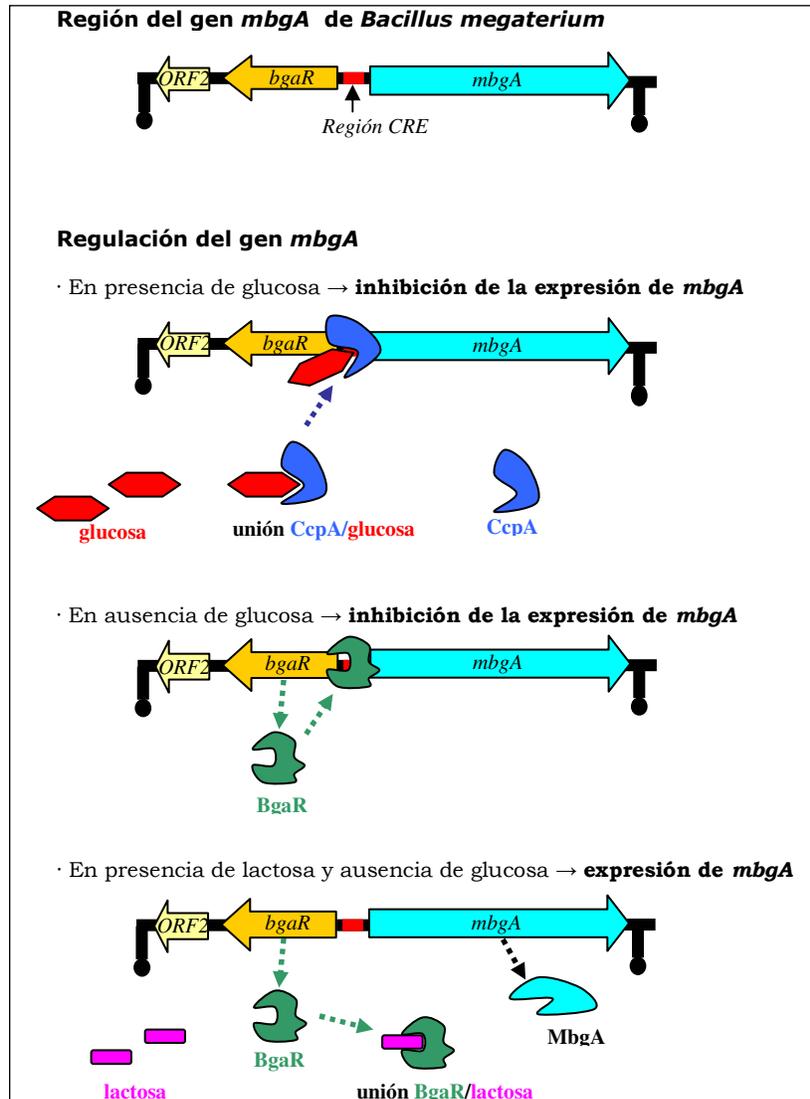
El primer trabajo descriptivo de la  $\beta$ -galactosidasa de *B. megaterium*, cepa KM, consistió en una purificación cromatográfica, y un estudio de sus propiedades enzimáticas y del efecto activador de diversos compuestos (Landman, 1957). Según los resultados obtenidos, la enzima mostraba un pH óptimo situado entre 7,3 y 8,0, perdía la actividad tras exponerla 5 minutos a 55°C, la presencia de Na<sup>+</sup> o Mn<sup>2+</sup> incrementaban su actividad, y que la L-arabinosa, el tiofenil- $\beta$ -D-galactósido, la galactosa y el fenil- $\beta$ -D-galactósido eran buenos activadores.

Posteriormente, se identificó el gen *mbgA* que codifica la  $\beta$ -galactosidasa de este microorganismo (Shaw et ál., 1998). El análisis de la secuencia reveló que el gen consta de 3 102 pb, que codifican una proteína de 1 034 aminoácidos con una masa molecular calculada de 118 088 Da. Inmediatamente "aguas abajo" del gen se encuentra una secuencia repetida invertida que podría funcionar como terminador de la transcripción mediante un mecanismo  $\rho$ -independiente.

Al contrario de lo que ocurre con los genes de este tipo en otras bacterias, el gen *mbgA* no forma parte de un operón. "Aguas arriba" de este gen se localiza una región adyacente que contiene al gen regulador *bgaR* y otro gen, sin función conocida, al que se identificó simplemente como ORF2 (Strey et ál., 1999) (Fig. 1.3).

Otro de los genes habitualmente presente en los operones de lactosa de otros microorganismos, el gen responsable del transporte de lactosa, todavía no ha sido identificado en *B. megaterium* (Shaw et ál., 1998).

El sistema de regulación del gen *mbgA* incluye la intervención en (*trans*) de proteínas de tipo CcpA que se unen, en presencia de glucosa, a una zona específica (CRE), situada entre los genes *bgaR* y *mbgA*. En ausencia de este metabolito, la zona CRE queda libre de modo que se pueden transcribir *bgaR* y *mbgA*. En estas condiciones el producto de *bgaR*, se une de forma específica a otra secuencia superpuesta a las CRE inhibiendo así la transcripción del gen *mbgA*. De este modo, en ausencia de glucosa, la expresión del gen *mbgA* es muy débil. Sin embargo, si en ausencia de glucosa, se añade exclusivamente lactosa, ésta impide la unión del regulador BgaR, activando así la transcripción del gen *mbgA*



**Figura 1.3.** Esquema de la región del genoma que contiene al gen *mbgA*, y representación esquemática de la regulación de la expresión de este gen.

### 3.5. $\beta$ -Galactosidasa lacA de *Bacillus subtilis*

El primer trabajo dedicado a la  $\beta$ -galactosidasa de *B. subtilis* fue realizado por Anema (1964), quien purificó parcialmente la enzima y estudió algunas de sus propiedades obteniendo resultados de actividad enzimática similares a los obtenidos en *E. coli* (Lederber, 1950).

Anema situó la temperatura óptima de reacción en 50°C, y comprobó que la incubación del enzima a 60°C, durante unos minutos, daba lugar a la inactivación del 100% de actividad. También situó el pH óptimo de la enzima de *B. subtilis* en torno a 6,5, a diferencia de la enzima de *E. coli* que muestra un pH óptimo cercano a 7,0 (Lederber, 1950).

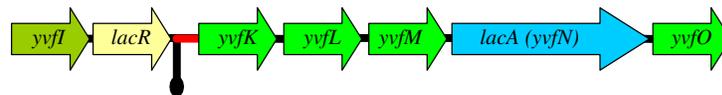
Estudios posteriores, con esta enzima purificada por cromatografía a partir de la cepa IBP-101 de *B. subtilis*, estimaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes y por gel filtración una masa molecular de 215 kDa y una masa molecular de 105 kDa por electroforesis en condiciones desnaturizantes (Vikha et ál., 1987).

Actualmente está publicada la secuencia genómica completa de *B. subtilis* 168 que comprende 4.100 genes codificadores de proteínas (Kunst et ál., 1997). Es la primera bacteria gram-positiva cuyo genoma ha sido secuenciado al completo.

El análisis de esta secuencia ha desvelado el mapa físico de la región denominada *lacRA* (Fig. 1.4), que incluye, entre otros elementos, el gen *lacA* (también llamado *yvfN*) que codifica una  $\beta$ -galactosidasa y el gen regulador *lacR*. Aparecen tres ORFs "aguas arriba" del *lacA* (*yvfK*, *yvfL* e *yvfM*) y otro ORF "aguas abajo"

(*yvfO*). Las secuencias de estos cuatro ORFs son similares a las regiones de unión y regiones transmembrana de enzimas incluidas en la familia de transportadores ABC, especialmente a las regiones de enzimas implicadas en el transporte de maltosa o maltodextrina, por lo que es lógico pensar que pueden estar implicados en el transporte de sustratos de la  $\beta$ -galactosidasa.

Estos cinco elementos están espaciados por un máximo de 22 pb, sin terminadores de transcripción evidentes, sugiriendo que comprenden un único operón policistrónico (Daniel, 1997). "Aguas arriba" de *yvfK* hay un espacio (139 pb) que parece contener el promotor del operón, y un terminador de transcripción. "Aguas arriba" de este terminador aparece el gen *lacR* que codifica para un producto similar a las proteínas reguladoras de unión a ADN (a cuya familia pertenece también el represor, LacI de *E. coli*) (Errington and Vogt, 1990). Inmediatamente "aguas arriba" del gen regulador, aparece el gen *yvfI* que codifica una proteína similar a un regulador transcripcional de la familia GntR. Se ha especulado que este gen podría estar también implicado en la regulación del operón que contiene al gen *lacA* pero esta hipótesis no se ha comprobado hasta el momento (Daniel, 1997).



**Figura 1.4.** Esquema de la región *lacRA* del genoma de *B. subtilis*.

La  $\beta$ -galactosidasa de *B. subtilis*, tiene una expresión constitutiva relativamente baja, reprimida por la glucosa (Dubnau et ál., 1987), aunque es inducida específicamente durante la

esporulación. Todavía no está claro qué sustratos son transportados e hidrolizados por este sistema. *B. subtilis* no utiliza lactosa como única fuente de carbono y energía, ni siquiera cuando el operón se sobreexpresa en mutantes *lacR* (Benson, 1993). Esto podría indicar que la función de esta enzima es el metabolismo de  $\beta$ -galactósidos diferentes a la lactosa.

Por último, se ha ensayado sin éxito, un amplio rango de azúcares para inducir la expresión del operón. Estos resultados han llevado a que se hipotetice que, posiblemente, el operón responda ante fuentes de carbono exóticas, como exudados de plantas, aunque no se ha realizado ningún ensayo que demuestre experimentalmente esta teoría (Daniel, 1997).

### **3.6. $\beta$ -Galactosidasa *lacZ* de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus***

*Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* es una bacteria láctica extensamente utilizada para la fermentación de la leche. Durante su crecimiento en este medio, la lactosa es utilizada como fuente de energía primaria. Para ello *L. d. bulgaricus* utiliza un sistema que combina una lactosa permeasa y una  $\beta$ -galactosidasa. De este modo, la lactosa es introducida al interior de la célula como azúcar libre y es hidrolizada por la  $\beta$ -galactosidasa (Leong-Morgenthaler et ál., 1991).

La  $\beta$ -galactosidasa de este microorganismo está codificada por el gen *lacZ*, el cual ha sido clonado, secuenciado y expresado junto a su promotor en *E. coli*. El gen muestra una identidad del 34% con el gen *lacZ* de *E. coli*, con zonas de alta similitud en las regiones implicadas en la actividad. La proteína obtenida a partir

de la secuencia de ADN correspondía a un monómero de 1.006 aminoácidos con un masa molecular de 113 915 Da (Schmidt et ál., 1989). Pertenece, al igual que las  $\beta$ -galactosidasas de *E. coli* y *B. megaterium* a la familia 2 de las glicósido hidrolasas.

El operón *lac* de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* está compuesto por el gen *lacS*; que codifica para la lactosa permeasa; el gen *lacZ*; que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa; y el gen *lacR*, que codifica para un represor, pero que debido a numerosas inserciones y deleciones está inactivo. Por este motivo, la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa en esta subespecie es constitutiva (Germond et ál., 2003).



**Figura 1.5.** Operón *lac* de *L. d. bulgaricus*.

## **4. Galacto-oligosacáridos**

### **4.1. Definición**

Los galacto-oligosacáridos (GOS) son carbohidratos formados por la unión de una molécula de lactosa a un número variable de moléculas de galactosa. Los GOS están incluidos dentro del grupo de los llamados oligosacáridos no digeribles ("non-digestible oligosaccharides" NDOs) debido a que son resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivas gastrointestinales de humanos por lo que alcanzan intactos el intestino por lo que se pueden considerar como componentes de la fibra alimentaria.

Sin embargo la característica que hace que tengan un mayor valor comercial y que se las incluya en el grupo de los llamados prebióticos, es que pueden ser fermentadas específicamente por bacterias del colon, especialmente bifidobacterias, estimulando su crecimiento y/o actividad, lo cual tiene consecuencias beneficiosas para la salud del hospedador (Minami et ál., 1983).

Los productos disponibles comercialmente son en realidad mezclas en forma de jarabes o en polvo conteniendo diferentes tipos de GOS (~60%) y restos de lactosa, glucosa y galactosa.

Otros NDOs que presentan propiedades prebióticas son los fructooligosacáridos (FOS) que se pueden obtener industrialmente mediante hidrólisis parcial de la inulina extraída de raíces de achicoria o mediante síntesis enzimática con fructosil transferasas a partir de sacarosa.

En 2001, el Comité Científico para los Alimentos de la Unión Europea consideró aceptable el uso de una mezcla de GOS y FOS en proporción 9:1 en fórmulas infantiles en una concentración de

hasta 0,8 g/dl.

#### **4.2. Propiedades fisiológicas**

En general se puede afirmar que las propiedades fisiológicas de los GOS son similares a las de los FOS aunque parecen ser efectivos a dosis menores y causan menos efectos secundarios (producción de gas).

Su principal efecto es el estímulo sobre el crecimiento de las bifidobacterias y lactobacilos. Como consecuencia de su proliferación se producen una serie de efectos beneficiosos para el hospedador: promoción del crecimiento de la microbiota saludable del colon, estimulación del sistema inmunológico, prevención de la diarrea, alivio de los síntomas de la intolerancia a la lactosa, retardo del desarrollo de cáncer de colon, incremento en la absorción de minerales y alivio del estreñimiento (Gibson y Angus, 2000).

#### **4.3. Propiedades tecnológicas**

Los GOS son considerados un ingrediente alimenticio especialmente atractivo para la industria porque forman parte de la leche materna y son altamente estables ya que permanecen inalterados tras ser tratados 10 minutos a 160°C a pH neutro, tras 10 minutos a 120°C a pH 3, o 10 minutos a 100°C a pH 2.

Además, destaca su mayor estabilidad frente a pH en comparación con los FOS permitiendo su incorporación a productos ácidos tales como bebidas refrescantes o zumos ácidos (Sako et ál., 1999).

#### **4.4. Producción**

La producción de GOS a escala industrial se realiza a partir de soluciones concentradas de lactosa (>40% p/v) obtenida a partir de suero. Para obtener estas altas concentraciones del sustrato se precisa trabajar a temperaturas altas debido a la baja solubilidad de la lactosa.

En estas condiciones la reacción se ve limitada por la inestabilidad de las enzimas a temperaturas de reacción superiores a 50-60°C y la inhibición de la reacción por la presencia de monosacáridos (glucosa y galactosa). Los rendimientos máximos de GOS utilizando soluciones concentradas de lactosa (40-90%) como sustrato se sitúan entre un 25-35%.

Durante la síntesis de GOS las moléculas de galactosa pueden ser transferidas, a través de su carbono anomérico, a cualquiera de los grupos hidroxilos libres del azúcar aceptor, ya sea lactosa u otro galacto-oligosacárido. Como consecuencia de esta unión se producen mezclas complejas de galacto-oligosacáridos en los que las distintas unidades sacarídicas pueden estar unidas por enlaces de tipo  $\beta(1\rightarrow 2, 3, 4 \text{ ó } 6)$ .

La enzima utilizada para la síntesis es la  $\beta$ -galactosidasa, que como hemos mencionado previamente, además de la actividad hidrolítica puede mostrar actividad de transgalactosilación. De hecho, la hidrólisis del enlace glicosídico es un caso especial de transglicosilación donde el aceptor es el agua. Las  $\beta$ -galactosidasas, como otras glicosidasas que actúan con retención de configuración, han sido ampliamente estudiadas para la síntesis enzimática regio- y estereoselectiva de oligosacáridos y glicoconjugados como estrategia alternativa a los métodos

químicos que requieren elaboradas etapas de protección, activación y desprotección (Planas y Fajjes, 2002).

La unión entre las unidades de galactosa, la eficiencia de la trasgalactosilación y los productos obtenidos dependen del origen de la enzima y de las condiciones utilizadas en la reacción (Boon et ál., 2000).

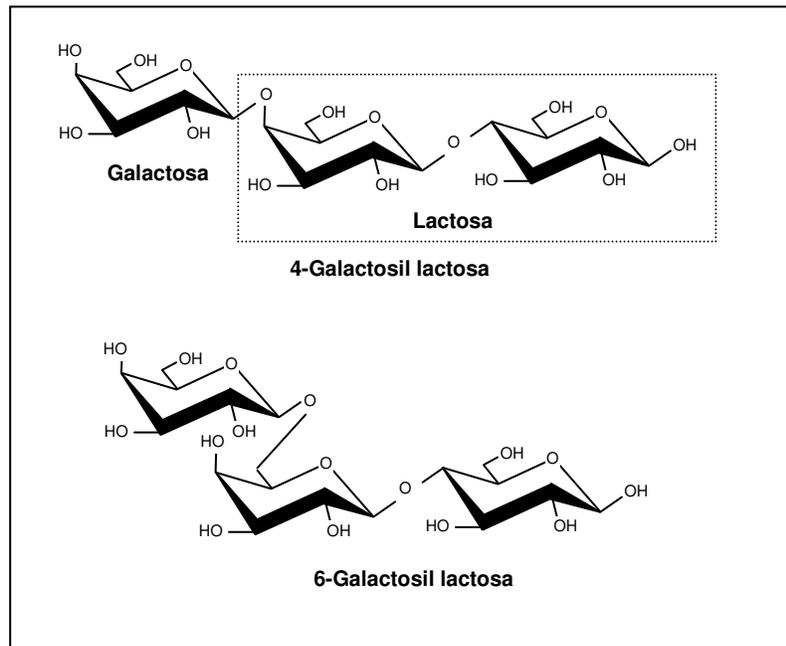
La  $\beta$ -galactosidasa más utilizada industrialmente para este proceso es la de *Bacillus circulans* ya que produce oligosacáridos en mayor cantidad, con mayor variedad y de mayor longitud que otras  $\beta$ -galactosidasas (Mozaffar et ál., 1984). Las enzimas de *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis* y *Aspergillus oryzae* producen principalmente trisacáridos y una pequeña cantidad de tetrasacáridos (Sako et ál., 1999). Los enlaces glicosídicos entre dos unidades de galactosa son principalmente  $\beta(1\rightarrow4)$  (4'-GOS) cuando la  $\beta$ -galactosidasa proviene de *B. circulans* (Boon et ál., 2000), y enlaces de tipo  $\beta(1\rightarrow6)$  (6'-GOS) cuando la enzima proviene de *A. oryzae* o *Streptococcus thermophilus* (Sako et ál., 1999) (Fig. 1.6).

Los principales productos de la reacción de síntesis son trisacáridos, llamados 4' o 6'-galactosil lactosa, y oligosacáridos de 4 o más unidades monosacarídicas. Además de tri- a hexasacáridos con 2-5 unidades de galactosa, se producen disacáridos de glucosa y galactosa unidas por enlaces  $\beta$  distintos al de la lactosa, y son conocidos como disacáridos transgalactosilados (TD). Este otro tipo de disacáridos formados (TD) también son considerados NDOs por poseer propiedades fisiológicas similares a los de GOS de mayor longitud (Sako et ál., 1999).

Actualmente, los GOS disponibles en el mercado son

mezclas de varios tipos de oligosacáridos (55%), lactosa (20%), glucosa (20%) y trazas de galactosa. Se venden tanto en estado líquido como en polvo. Las principales compañías productoras de GOS son Yakult Honsa (Tokio, Japón) (Oligomate™), Nissin Sugar Manufacturing Company (Tokio, Japón) (Cup-Oligo™) y Show Brand Milk Products (Tokio, Japón) (P7L y otros).

En Europa, Borculo Whey Products de Holanda, con el producto de Vivinal GOS es el único productor de estos compuestos.



**Figura 1.6.** Dos ejemplos de GOS con tres unidades monosacáridicas. En el primer caso la unión de la galactosa a la lactosa es de tipo  $\beta(1\rightarrow4)$  y en el segundo caso es de tipo  $\beta(1\rightarrow6)$ .

#### **4.5. Mejoras en los procesos de producción.**

Como alternativa a la síntesis mediada por glicosidasas (como la  $\beta$ -galactosidasa), se está trabajando en el desarrollo de enzimas glicosintasas. Estas enzimas son variaciones de glicosidasas, producidas por ingeniería de proteínas, hidrolíticamente inactivas pero que catalizan eficientemente reacciones de condensación. Se generan cambiando por mutación dirigida el nucleófilo catalítico por un residuo no catalítico (Ala, Gly o Ser), Esta nueva enzima es capaz de catalizar la transglicosilación de donadores glicosídicos fluorados con la configuración anomérica opuesta a la de los sustratos normales de la enzima salvaje. Los productos de esta transglicosilación no pueden ser hidrolizados por la glicosintasa, y la producción puede ser de hasta el 95-98% (Planas y Fajjes, 2002).

Las reacciones de síntesis de GOS se realizan a temperaturas superiores a 50°C lo que permite trabajar con concentraciones elevadas de lactosa, lo cual favorecerá el desplazamiento de la reacción enzimática de hidrólisis a la de síntesis. Esto ha hecho que uno de los objetivos industriales actuales sea la obtención de  $\beta$ -galactosidasas termoestables, ya sea a partir de fuentes naturales (organismos termofílicos) o mediante evolución dirigida.

#### **5. Mutación dirigida**

La mutación dirigida in vitro consiste en la realización de cambios localizados, en una secuencia de ADN, de uno o más nucleótidos de posiciones conocidas. En la Tabla 1.4 se exponen algunas de las aplicaciones que se le han dado a esta técnica con

sus respectivos ejemplos. La aplicación de la PCR a protocolos de mutación in vitro, introduciendo las modificaciones en la secuencia de los cebadores, ha simplificado la realización de este tipo de experimentos con respecto a métodos previos que requerían la utilización de ADN de hebra sencilla (Kunkel, 1985). La importancia científica de esta técnica hizo que su inventor, Michael Smith recibiera el Premio Nobel de Medicina en 1993.

<b>Aplicación</b>	<b>Ejemplo</b>	<b>Mutación</b>	<b>Autores</b>
<b>Determinación de la función de un amino-ácido</b>	$\beta$ -galactosidasa de <i>E. coli</i>	Glu461Gly Glu461Gln Glu461His Glu461Lys	Cupples et ál., 1990
<b>Incremento de la estabilidad de la enzima</b>	AchE de <i>Drosophila</i>	Residuos hidrofóbicos superficiales por Arg	Strub et ál., 2004
	Lisozima fago T4	Gly→Xaa Xaa→Pro	Matthews et ál., 1987
<b>Alteración de la actividad enzimática</b>	Transformación de glicosidasa en glicosintasa	Nucleófilo catalítico por Ala, Gly o Ser	Planas y Faijes, 2002

**Tabla 1.4.** Algunos ejemplos de aplicaciones de la mutación dirigida.

La primera glicosintasa obtenida mediante mutación dirigida se obtuvo a partir de una  $\beta$ -glucosidasa/galactosidasa de *Agrobacterium* sp. Esta glicosintasa era capaz de catalizar, con gran eficiencia, la unión de un  $\beta$ -glucosil fluoruro a un amplio rango de carbohidratos aceptores (Mackenzie et ál., 1998).

## **6. Evolución dirigida de enzimas**

### ***6.1. Generalidades de la evolución dirigida de enzimas***

La utilización de enzimas en procesos industriales de biotransformación se ve limitada en ocasiones por factores inherentes a la naturaleza de las enzimas como por ejemplo su falta de estabilidad ante condiciones extremas de temperatura o pH, su desnaturalización en presencia de solventes orgánicos o su escasa actividad frente a determinados sustratos.

El proceso de evolución natural genera variantes de los genes y por tanto de las enzimas codificadas por ellos. Sin embargo la generación de variantes está limitada por la frecuencia con la que ocurren mutaciones en la secuencia de ADN y la frecuencia con la cual éstas son fijadas en la población, por lo que pueden pasar años antes de que aparezcan nuevos fenotipos que cumplan los requerimientos deseados.

La evolución en el laboratorio (o evolución dirigida) ha surgido como una solución para este problema, ya que permite que la escala de tiempo en la que evolucionan secuencias de ADN concretas pueda ser comprimida enormemente a conveniencia del investigador, el cual toma el control de todos los pasos en el proceso. Lo más importante, en contraste con la evolución natural, es que el investigador determina el resultado funcional mediante el control de la presión selectiva. A diferencia de los procesos de mutación dirigida, en los que el investigador debe conocer, o por lo menos sospechar, la función del aminoácido que se va a modificar, en los ensayos de evolución dirigida no es necesario. Una vez que se ha obtenido la enzima evolucionada con la función deseada es

cuando se analizan los cambios aminoacídicos responsables de la nueva característica generada.

La evolución dirigida comprende dos fases: generación de diversidad molecular y búsqueda de las proteínas, generadas a partir de estas secuencias, que cumplan las funciones deseadas de acuerdo a un criterio específico. Este proceso de generación de variabilidad y selección se puede repetir tantas veces como sea necesario hasta alcanzar el nivel de actividad buscado.

### **6.2. Generación de variabilidad**

La generación de diversidad molecular en evolución dirigida se realiza mediante mutación aleatoria dado que, como se ha dicho anteriormente, las sustituciones aminoacídicas que afectan a la actividad de una proteína a menudo están alejadas del sitio activo y son, por lo tanto, difíciles de predecir a partir de la estructura de ésta (Daugherty et ál., 1997). Para realizar estudios sobre la relación estructura-función de una proteína, se generan cambios de un solo aminoácido (1-2 cambios nucleotídicos) por gen; mientras que para ensayos de evolución dirigida se emplean, típicamente, frecuencias de mutación de uno a cuatro cambios aminoacídicos (2-7 cambios nucleotídicos) por gen (Wan et ál., 1998). Sin embargo, algunas proteínas mejoradas en su actividad mediante evolución molecular han llegado a acumular 20 mutaciones puntuales por gen (Daugherty et ál., 2000).

La mutación al azar se puede realizar sobre el genoma del organismo portador del gen de interés, o mutando directamente el gen en cuestión. En el primer caso, el organismo portador del gen es expuesto a elementos mutagénicos químicos o físicos, como la

nitrosoguanidina o los rayos ultravioleta. El problema que presenta este procedimiento consiste en que las mutaciones producidas en el genoma del organismo portador del gen pueden camuflar las mutaciones producidas sobre el gen de interés.

Para mutar directamente un gen sin afectar al resto del genoma del hospedador se debe construir una colección de variantes génicas. Los métodos que permiten la generación de variantes génicas se han multiplicado en los últimos años (ver las revisiones Neylon, 2004 y Hibbert et ál, 2005) pero las técnicas más relevantes se pueden resumir en:

- **Modificación en las condiciones de reacción de polimerización de ADN.** Comúnmente se ha utilizado la Taq polimerasa incrementando su frecuencia de error usando tampones de PCR que contienen  $Mn^{2+}$  y concentraciones desequilibradas de dNTPs. Se ha demostrado que esta polimerasa responde fuertemente a cambios en la concentración relativa de  $MgCl_2$  y pH (Eckert et ál., 1990). Estas modificaciones pueden, sin embargo, hacer que la cantidad de producto de la PCR sea baja, y que haya una fuerte parcialidad en los tipos de mutaciones producidas. En soluciones que contengan  $MnCl_2$ , la polimerasa Taq introduce preferentemente mutaciones del tipo A→T, T→A, A→G, y T→C (60-68% del total de mutaciones producidas) y raramente incorpora las transversiones G→C y C→G (Shafikhani et ál., 1997).
- Usando de una **ADN polimerasa con alta frecuencia de producción de errores** ("error-prone"). Un ejemplo de ello es la enzima "Mutazyme™" incluida en el kit comercial

GeneMorph™ comercializado por Stratagene (La Jolla, CA, EE.UU). Esta enzima produce todas las transiciones y transversiones posibles con un mínimo de parcialidad, y puede ser aplicada a la mutagénesis de dianas de gran tamaño (1-10 kb).

Con este sistema es más sencillo modificar la frecuencia de mutación (mutaciones/kb) ya que este parámetro depende de la frecuencia de error de la ADN polimerasa y del número de duplicaciones de la diana. Cuantas más veces se replica una diana, más errores se acumulan. Del mismo modo, se obtiene mayor frecuencia de mutación partiendo de bajas concentraciones de ADN molde. Inversamente, si se utilizan altas concentraciones de ADN molde o se disminuyen los ciclos de la PCR, se obtiene una menor frecuencia de mutación.

La ADN polimerasa "Mutazyme™" de este sistema tiende a producir cambios del tipo G→A, C→T, G→T, y C→A (64% del total de mutaciones), y todas las transversiones están representadas. En cambio la ADN polimerasa Taq que tiene una preferencia tres veces mayor por mutar As y Ts que Gs y Cs (AT→GC/GC→AT ratio >1), mientras que la enzima "Mutazyme" es casi tres veces más propensa a mutar Gs y Cs (AT→GC/GC→AT ratio 0,2). Ambas enzimas prefieren incorporar transiciones frente a transversiones (Ts/Tv = 0,8-1,2).

- Uso de **cepas hospedadoras "mutagénicas"**, como por ejemplo la cepa *Escherichia coli* XL1-Red (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU) que es deficiente los tres sistemas

principales de reparación de mutaciones en *E. coli* (*mutS*, *mutD* y *mutT*) por lo que tiene una tasa de mutación 5.000 veces mayor a la de la cepa salvaje. En este sistema el gen a mutar se introduce en un plásmido con el que se transforma la cepa *E. coli* XL1-Red. Tras varios ciclos de propagación se recuperan los plásmidos mutantes que se pueden transformar posteriormente en una cepa de expresión.

- **Recombinación o “barajado” de fragmentos génicos** (“DNA shuffling”). En este método el gen a mutar se fragmenta parcialmente utilizando una ADNasa y posteriormente se recombinan los fragmentos en una reacción de amplificación con ADN polimerasa. Este proceso se puede realizar con un único gen o con genes con alta homología (“family shuffling”). Durante el proceso de recombinación se generan mutaciones que pueden ser aprovechadas para generar variabilidad.

Las variantes génicas, obtenidas por cualquiera de estos métodos, son clonadas generalmente en vectores y expresadas de forma heteróloga en microorganismos de fácil manejo que producirán las cantidades adecuadas de las variantes enzimáticas para la posterior fase de “screening”.

### **6.3. Selección de las variantes mejoradas.**

El último paso en los procedimientos que se engloban dentro de la técnica de evolución molecular es el más desafiante: obtención de variantes útiles mediante un sistema específico de selección (“screening”) para la función proteica que se desee

obtener entre la colección de variantes generada previamente.

Si la estrategia de selección de variantes útiles no está convenientemente establecida, las posibilidades de éxito se ven enormemente disminuidas por muy eficiente que sea el sistema de generación de variantes génicas. Las características deseables de un sistema son:

- alta **especificidad** hacia la función deseada.
- poseer un alto **rendimiento**, para incrementar la probabilidad de encontrar variantes útiles;
- alta **sensibilidad** para detectar los mínimos cambios en las actividades de las variantes en períodos iniciales de evolución;
- **reproducibilidad y robustez**, lo que significa que la señal producida por las variantes activas no sea dependiente de elementos ambientales difícilmente controlables;

Los "screenings" realizados sobre medio sólido con sustratos colorimétricos son inherentemente más sencillos que los ensayos realizados en medio líquido. Sin embargo, no siempre es posible obtener un método de selección en medio sólido con la suficiente especificidad y sensibilidad. Por ello es más frecuente la utilización de ensayos en medio líquido utilizando métodos miniaturizados utilizando placas con 96, 384 o 1.536 pocillos o sistemas de selección por citometría de flujo.

Dados los altos rendimientos que se precisan para incrementar las probabilidades de éxito se utilizan robots tanto para la transferencia de las colonias que expresan las variantes

génicas desde el medio de cultivo sólido a un medio líquido como para el procesamiento de los reactivos utilizados en las reacciones enzimáticas.

Con todo, hay un límite práctico en el número de variantes estudiadas, que generalmente ronda las decenas de miles en ensayos líquidos, y los cientos de miles en ensayos en medio sólido (Arnold and Georgiou, 2003).

#### **6.4. Obtención de enzimas termoestables mediante evolución dirigida**

La **estabilidad enzimática** define la capacidad de una proteína de mantener su estructura tridimensional nativa activa en el ámbito de fluctuaciones térmicas, presencia de agentes químicos desnaturizantes u otros factores.

Las estructuras nativas de las proteínas se mantienen debido al conjunto de numerosas interacciones entre sus aminoácidos, y entre sus aminoácidos y el medio. Este conjunto de interacciones incluye los enlaces covalentes, las uniones de Van der Waals, los puentes de hidrógeno y salinos, así como las interacciones proteína-solvente derivadas de la ocultación o exposición de los grupos polares o apolares.

Generalmente, a temperaturas cercanas a los 100° C, las proteínas y péptidos sufren reacciones irreversibles de desnaturalización. La máxima temperatura a la que la vida es posible se desconoce, pero probablemente no sea superior a 113°C, máxima temperatura a la que se ha aislado el microorganismo termofílico *Pyrolobus fumarii*. Por encima de 110°C, las moléculas como los aminoácidos se vuelven altamente

inestables y las interacciones hidrofóbicas se debilitan significativamente (Jaenicke, 1998).

La termoestabilidad de una enzima está determinada por la estabilidad de su estructura tridimensional (estabilidad termodinámica) y la estabilidad de su actividad catalítica (estabilidad cinética). La estabilidad termodinámica se define como el producto de la energía libre de estabilización ( $\Delta G_{\text{estab}}$ , diferencia entre la energía libre de la cadena polipeptídica plegada con respecto a la cadena polipeptídica sin plegar) y por la temperatura de fusión ( $T_m$ , temperatura a la que el 50% de la proteína está desnaturalizada). Para las enzimas que sufren una desnaturalización irreversible (como en las tres tratadas en el presente trabajo), sólo se puede determinar la  $T_m$ . La estabilidad cinética de una enzima depende de la temperatura umbral de desnaturalización y se define a menudo como la vida media ( $t_{1/2}$ ) a una determinada temperatura (Vieille and Zeikus, 2001).

La termoestabilidad enzimática es una propiedad de gran importancia en biocatálisis. Mientras que las enzimas son capaces de catalizar reacciones con una gran especificidad y selectividad, están a menudo limitadas por una estabilidad insuficiente durante los procesos de producción industrial. Tal como ocurre en organismos termófilos (Wintrode y Arnold, 2001; Jaenicke y Bohm, 1998) y como se ha demostrado en experimentos de evolución molecular (Miyazaki et ál., 2000; Song y Rhee, 2000; Zhao y Arnold, 1999), muchas veces es posible mejorar la termoestabilidad de una enzima sin sacrificar actividad. Así, la termoestabilidad enzimática se convierte en una diana susceptible de ser optimizada mediante bioingeniería (Cirino y Georgescu,

2003).

Algunos ejemplos de enzimas cuya termoestabilidad ha sido mejorada mediante evolución dirigida son: la lipasa de *Bacillus subtilis* (Acharya et ál., 2004), las fructosa bifosfato aldolasas de *Escherichia coli* y de *Edwardsiella ictaluri* (Hao y Berry, 2004), la  $\beta$ -glucosidasa de *Paenibacillus polymyxa* (Arrizubieta y Polaina, 2000), la amilasa maltogénica de *Thermus* (Kim et ál., 2003) y la subtilisina S41 de *Bacillus sphaericus* (Miyazaki et ál., 2000). En algunos casos, como ocurrió con la  $\beta$ -glucosidasa de *Paenibacillus polymyxa* o con la subtilisina S41 de *Bacillus sphaericus*, no sólo se consiguió mejorar la termoestabilidad de la enzima sino que también se consiguió incrementar la temperatura óptima de actividad (Miyazaki et ál., 2000).

Un método efectivo para diseñar un "screening" adecuado para la selección de enzimas con mayor termoestabilidad es medir la actividad residual a temperatura ambiente que presenta dicha enzima tras una incubación a altas temperaturas. Una mayor actividad residual está en correlación con un incremento en la estabilidad. Esto fue demostrado con mutantes de subtilisina S41 que incrementaron su vida media a 60°C debido a una mayor estabilidad estructural (Miyazaki et ál., 2000).

## **7. Objetivos del presente trabajo**

El presente trabajo ha sido financiado por la empresa Puleva Biotech S.A., empresa de investigación y desarrollo dentro del sector industrial alimentario. El principal objetivo de esta empresa es la investigación, desarrollo y producción de ingredientes saludables que aporten un valor añadido a los alimentos.

El presente trabajo se ha circunscrito en un proyecto cuyo objetivo es la síntesis enzimática de galacto-oligosacáridos (GOS) utilizando  $\beta$ -galactosidasas de origen microbiano.

Los objetivos pretenden ser una aproximación inicial hacia la búsqueda de enzimas alternativas par la producción de GOS más que una aplicación industrial definitiva y se pueden resumir en los siguientes puntos que coinciden con el esquema general en el que está presentada ésta memoria:

- 1- Clonación y secuenciación de genes que codifiquen  $\beta$ -galactosidasas microbianas.**
- 2- Producción de  $\beta$ -galactosidasas microbianas mediante sistemas heterólogos de expresión.**
- 3- Síntesis de galacto-oligosacáridos (GOS) con las  $\beta$ -galactosidasas microbianas producidas.**
- 4- Obtención de una  $\beta$ -galactosintasa mediante mutación dirigida.**
- 5- Mejora de la termoestabilidad de una  $\beta$ -galactosidasa mediante evolución dirigida.**



## ***II. Materiales y métodos***



## 1. Microorganismos

***Bacillus megaterium*** de Bary, 1884 **AL, CECT 4313<sup>t</sup> (ATCC14581)**. Cepa utilizada para clonar el gen que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

***Bacillus subtilis*** (Ehreberg, 1835) **CECT 356 (ATCC6633)**. Cepa utilizada para clonar el gen que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

***Escherichia coli* BL21(DE3)**. Cepa comercial (Stratagene, La Jolla, EE.UU) diseñada para la expresión heteróloga de genes clonados en vectores que porten el promotor del fago T7. Muestra el fago  $\lambda$  DE3, en estado lisogénico, integrado en el genoma. Este fago posee la región de inmunidad del fago 21, el gen *lacI<sup>q</sup>* y el gen de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. En presencia de IPTG, el promotor *lacUV5* permite la expresión del gen de la ARN polimerasa del fago T7, y esta ARN polimerasa transcribe aquellos genes que se encuentran bajo el control de promotores T7. Genotipo: B F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>b</sub> (r<sub>b</sub><sup>-</sup> m<sub>b</sub><sup>-</sup>) dcm Tet<sup>r</sup> gal  $\lambda$ (DE3)*.

***Escherichia coli* BL21(DE)w** (Adrio y Navas-Parejo, comunicación personal). Mutante de la cepa anterior, obtenida en nuestro laboratorio, deficiente en la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

***Escherichia coli* DH5 $\alpha$**  (Hanahan, 1983). Cepa empleada para la amplificación de ADN plasmídico. Presenta una deleción en el gen *lacZ* del operón *lac* lo que permite la selección de clones por  $\alpha$ -complementación. Genotipo: F<sup>-</sup>  $\phi$ 80 *lacZ $\Delta$ M15 thi-1 deoR endA1 gyrA96 recA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) relA1 supE44 U169*.

***Escherichia coli* Top 10 F'** Cepa derivada de *E. coli* K-12 utilizada para amplificación de ADN. Al igual que la cepa anterior,

presenta una deleción en el gen *lacZ* del operón *lac* que permite la selección de clones por  $\alpha$ -complementación. Genotipo: F' {*proAB*, *lacI<sup>q</sup>*, *lacZ* $\Delta$ M15, Tn10 (Tet<sup>R</sup>)} *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr*- *hsdRMS*-*mcrBC*),  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*,  $\lambda^-$  *araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*.

***Escherichia coli* XL1-Red** (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) Cepa utilizada para la generación de mutaciones aleatorias. Esta estirpe es deficiente en tres de las primeras rutas de reparación del ADN. Genotipo: *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *lac*, *mutD5*, *mutS*, *mutT*, Tn10 (Tet<sup>r</sup>).

***Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*** (Orla-Jensen, 1919) Weiss et ál, 1984 VP, **CECT 4005<sup>T</sup> (ATCC11842)**. Cepa seleccionada para la clonación del gen que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

***Pichia pastoris* X-33** Cepa silvestre de este microorganismo utilizada como hospedador para la expresión de los genes clonados en los plásmidos pPiCZ.

## 2. Vectores plasmídicos

**pBSK (+) (2,964 kb)** (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) (Fig. 2.1). Plásmido derivado del pUC19 que presenta el origen de replicación en *E. coli* iColE1 y el origen de replicación f1 del fago M13, lo que permite su replicación en *E. coli* y la obtención de ADN monocatenario. Porta un gen de resistencia a ampicilina que permite su selección en el hospedador y un fragmento del gen *lacZ* de *E. coli* (subunidad  $\alpha$ ) útil para la transformación en cepas bacterianas que posean dicha subunidad mutada. La complementación de dicha mutación induce, en un medio con IPTG

(isopropiltiogalactósido, un inductor de la expresión del gen *lacZ*) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido, sustrato cromogénico), coloración azul de las colonias. En marco de lectura dentro del fragmento  $\alpha$ -complementado del gen *lacZ* se encuentra un policonector, con sitios de reconocimiento para varias enzimas de restricción de corte único. La transformación con un pBluescript en el que se haya introducido en este sitio de clonación un fragmento de ADN, que rompa el marco de lectura del fragmento  $\alpha$  del gen *lacZ*, ocasionará la aparición de colonias no coloreadas.

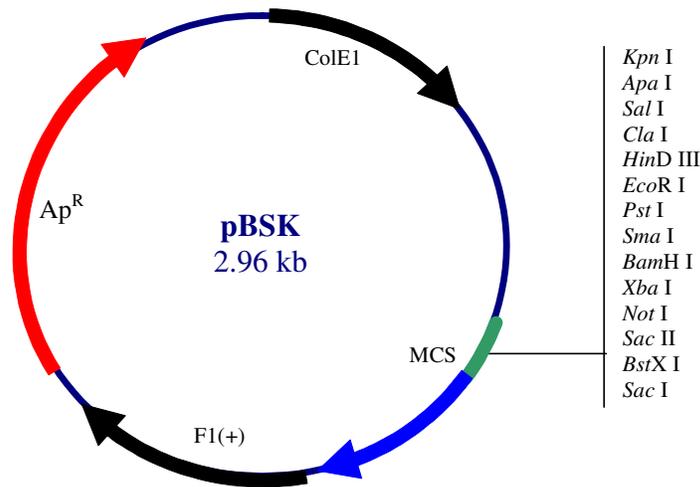
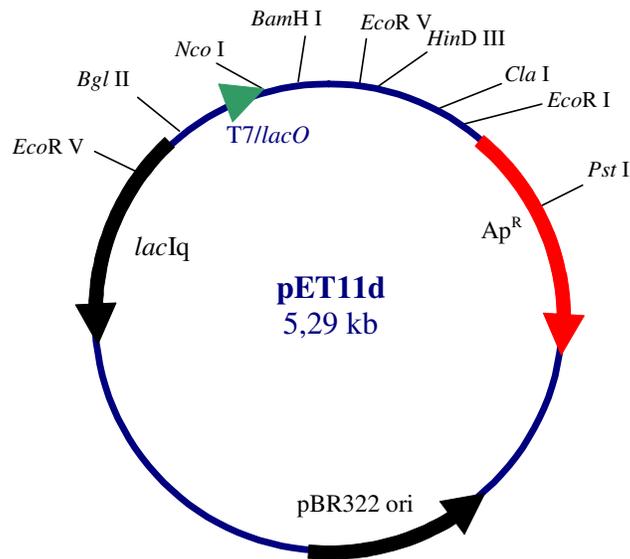


Figura 2.1. Plásmido de clonación pBSK(+).

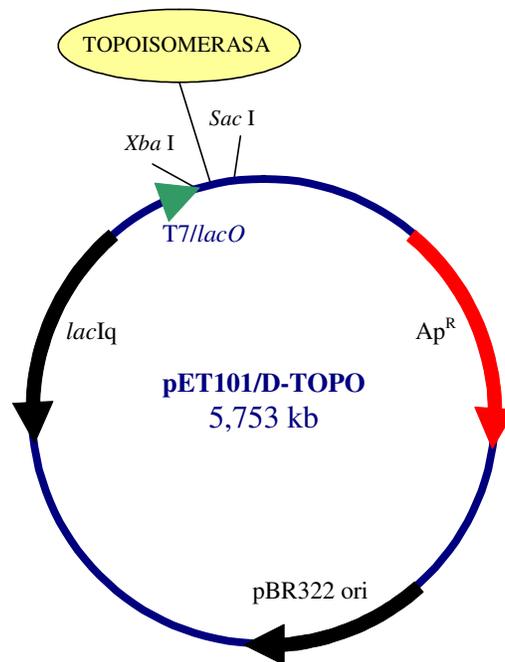
**pET11 (5,289 kb)** (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) Vector de expresión derivado del pBR322, que contiene el promotor del gen *10* del bacteriófago T7 el cual promueve altos niveles de transcripción (Fig. 2.2). También contiene el péptido líder 5' del

gen 10 que facilita una traducción eficiente. La secuencia de ADN codificante de la proteína de interés debe ser clonada directamente tras el codón de iniciación del gen 10 usando las dianas *Nde* I (para los plásmidos pETa, b y c) o *Nco* I (para el pETd). Alternativamente, el vector contiene la diana *Bam*H I que permite crear una proteína de fusión que contiene los trece aminoácidos del extremo amino del gen 10. El terminador del gen 10 también está incluido "aguas abajo" del lugar de clonación para permitir una terminación eficiente de la transcripción. Este plásmido incluye el operador *lac* y el gen *lacI<sup>q</sup>* para utilizar IPTG como inductor de la expresión (ver sección 13.1), y el gen de resistencia a ampicilina como marcador de transformación.



**Figura 2.2.** Plásmido de expresión pET11d (el plásmido pET11c es idéntico pero en lugar de tener el lugar de clonación *Nco* I tiene *Nde* I).

**pET101/D-TOPO® (5,753 kb)** (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) Este plásmido forma parte del "Champion™ pET Direccional TOPO® Expresión Kit" (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) (Fig. 2.3). Este plásmido consta de: promotor *T7lac* para una expresión inducible por IPTG; lugar de clonación direccional TOPO® mediado por una topoisomerasa; gen *lacIq* que codifica el represor lac que reduce la transcripción basal del promotor *T7lac* en el vector y del promotor *lacUV5* en el cromosoma del hospedador *E. coli* (en este caso es la cepa BL21(DE3)); gen de resistencia a ampicilina como marcador de transformación; y origen de replicación del pBR322 para un número bajo de copias.



**Figura 2.3.** Plásmido de clonación y expresión pET101/D-TOPO.

**pPICZαB (3,600 kb)** (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.). El plásmido pPICZαB (Fig. 2.4) es un vector de expresión inducible regulada por metanol. La adición de este alcohol al medio en el que se desarrollan las levaduras hospedadoras metilotróficas, induce la expresión de los genes controlados por el promotor  $P_{AOX1}$ . Contiene un gen de resistencia a zeocina para hacer una selección positiva en *E. coli* y *Pichia*. En este vector está incluida la secuencia señal alfa de *Saccharomyces cerevisiae* que permite la secreción de la proteína expresada. Contiene una cola de polihistidina que se une a cationes divalentes como el  $Ni^{2+}$  que facilitan la purificación de la proteína expresada.

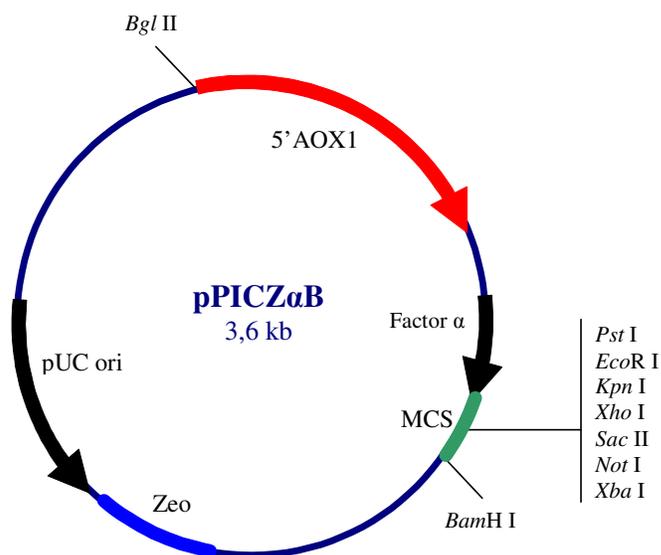
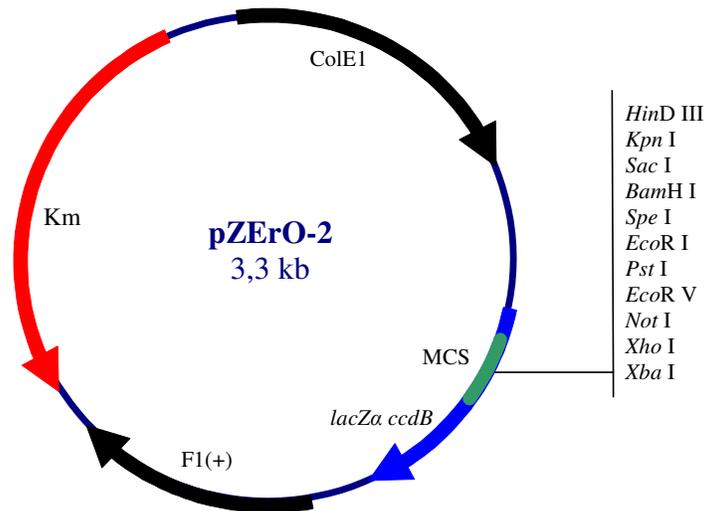


Figura 2.4. Plásmidos de expresión pPICZαB.

**pZErO-2 (3,300 kb)** (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.). Plásmido que se caracteriza por poseer, en marco de lectura con el sitio de clonación, el gen tóxico *ccdB* (Fig. 2.5). Este gen codifica una proteína que interfiere en la actividad de la enzima ADN girasa, lo que ocasiona la rotura de las hebras de ADN, el desencadenamiento de la respuesta S.O.S. y la muerte celular. Esta característica permite realizar una selección positiva de clones recombinantes al transformar en una cepa adecuada de *E. coli*, ya que solamente los clones en los cuales el marco de lectura del gen tóxico haya sido alterado, por inserción de un fragmento de ADN en el policonector, permitirán el crecimiento de las células hospedadoras.



**Figura 2.5.** Esquema del plásmido de clonación pZErO-2.

### **3. Reactivos químicos de uso general**

Los reactivos empleados para la realización de los experimentos presentados en esta memoria han sido adquiridos a las siguientes casas comerciales: Applichem GMBH (Darmstadt, Alemania), Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.), Panreac (Barcelona, España), Stratagene (La Jolla, CA, EE.UU.), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EE.UU.), Promega Co. (Madison, Wisconsin, EE.UU.), Qiagen (Crawley, Reino Unido) y Oxoid Ltd. (Basingstoke, Hampshire, Reino Unido).

### **4. Oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en reacciones en cadena de la polimerasa fueron sintetizados por la empresa MWG (Ebersberg, Alemania). Para las reacciones de PCR estándar se han utilizado como cebadores oligonucleótidos de 18-25 nucleótidos (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Cebadores utilizados para las reacciones de amplificación con ADN polimerasa.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tm (°C)	Función
pBT17- <i>Nco</i> I-D	ctcgagaaaagagaggctgccatggtgtc aaagcttgaaaaaacgcac	>75	Clonación del gen <i>lacA</i> de <i>B. subtilis</i> en pET11d
pBT17- <i>Bam</i> HI-R	gagatgagttttgggatccactaatgtg gtt	65,8	
pBT19- <i>Nco</i> I-D	Gaggctgaagctgccatggttaaaaaccg gc	70,9	Clonación del gen <i>mbgA</i> de <i>B. megaterium</i> en pET11d
pBT19- <i>Bam</i> HI-R	atgagttttggatccagaattatagaggtt tagcg	66,1	
pBT50- <i>Nde</i> I-D	Gaggctgaagctcatatgagcaataagtt a	64,0	Clonación del gen <i>lacZ</i> de <i>L. d. bulgaricus</i> en pET11c
pBT50- <i>Bam</i> HI-R	gagatgagttttggatccagattattttagt aaaaggggctg	69,4	
<i>lacZ</i> <i>coli</i> -D	agctcactcattaggcaccacaggc	67,9	Clonación del gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> en pZErO-2
<i>lacZ</i> <i>coli</i> -R	tggatttccttacgcgaaatacggg	63,0	
BGBM-D	aactgcagtgtaaaaaccggcaagaaa	62,2	Clonación del gen <i>mbgA</i> de <i>B. megaterium</i> en Pbs.
BGBM-R	gctctagattatagaggttttagcgtaa	60,7	
BGBSU-2	attcttcgagtaaagcttgaaa	54,7	Clonación del gen <i>lacA</i> de <i>B. subtilis</i> en pBSK
BGBSU-R	gctctagactaatgtgttttacgacaa	62,2	
BGLB-D	aactgcagtgagcaataagttagtaaaa	59,3	Clonación del gen <i>lacZ</i> de <i>L. d. bulgaricus</i> en Pbs.
BGLB-R	gctctagattatttagtaaaaggggc	60,7	
Sub-d_for	gcagcctttcttattaatggcgtgtacgcca agcgcg	73,9	Mutación dirigida en el gen <i>lacA</i> de <i>B. subtilis</i>
Sub-r_rev	cgcgcttgcggtacacgccattaataaga aaggctgc	73,9	
Der	Caccatgagcaataagttagtaaaagaa aaa	60,2	Clonación de variantes del gen <i>lacZ</i> de <i>L. d. bulgaricus</i> en pET/D-TOPO
Pum	gcagccttattcagattattttag	55,9	

## 5. Medios de cultivo

### 5.1. Medios de cultivo para bacterias

**Medio Luria-Bertani (LB)**(Miller, 1972). Medio de cultivo para *E. coli* compuesto por:

Componente	g/l
Extracto de levadura	5
Bacto-triptona	10
NaCl	10
Ajustar pH a 7,5	

Para conseguir medio sólido se añadieron 20 g/l de agar.

En aquellas ocasiones en los que el medio se complementó con el antibiótico Zeocina, el medio se preparó con una concentración de NaCl de 5 g/l.

**Nutrient Agar Broth.** Medio de cultivo para especies del género *Bacillus* compuesto por:

Componente	g/l
Extracto de carne	10
Peptona	10
NaCl	5

Para conseguir medio sólido se añadieron 20 g/l de agar.

**Caldo de Man, Rogosa, Sharpe (M.R.S.)** (de Man et ál, 1960). Medio de cultivo para especies del género *Lactobacillus*.

<b>Componente</b>	<b>g/l</b>
Peptona	10
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
Glucosa	20
Tween 80	1,06
Hidrógeno difosfato dipotasio	2
Acetato sódico trihidrato	5
Citrato triamónico	2
Sulfato magnésico heptahidrato	0,2
Sulfato manganeso tetrahidrato	0,05

En la mayor parte de los casos se utilizó un medio comercial preparado (MRS Lactobacillus Broth ,Oxoid) a una concentración de 52 g/l. Para conseguir medio sólido se añadieron 10 g/l de agar.

### **5.2. Medios de cultivo para levaduras**

**BMGY y BMMY** ("Buffered Glycerol-complex Medium" y "Buffered Methanol-complex Medium"). Medio de cultivo para levaduras compuesto por:

<b>Componente</b>	<b>g/l</b>
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Fosfato potásico, pH 6.0	13,609
Yeast Nitrogen Base (YNB)	13,4

Biotina	0,0004
Glicerol (para BMGY)	10
Metanol (para BMMY)	5

---

Las soluciones de "Yeast Nitrogen Base" (YNB), biotina y glicerol o metanol se prepararon concentradas (10x), se esterilizaron por filtración y se añadieron a una solución que contiene el extracto de levadura, la peptona y el fosfato potásico previamente esterilizada en el autoclave.

**YPD.** Medio de cultivo para levaduras compuesto por:

---

<b>Componente</b>	<b>g/l</b>
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Glucosa	20

---

**YPDS:** Medio YPD al que se le añade sorbitol hasta que éste quede a una concentración final de 1M (18,217 g/l).

## **6. Mantenimiento y cultivo de microorganismos**

### **6.1. Crecimiento de cepas bacterianas**

Las cepas de *Escherichia coli* se incubaron a 37°C durante 16-18 horas en medio LB. El cultivo en medio líquido se realizó en matraces sin indentaciones (de volumen variable, dependiendo del protocolo), incubando a 37°C y 250 rpm de agitación.

Cuando se cultivaron clones de *E. coli* resistentes a antibióticos los medios fueron complementados para presentar las siguientes concentraciones:

Ampicilina (Ap)	100 µg/ml
Kanamicina (Km)	50 µg/ml
Zeocina (Zeo)	100 µg/ml

Para la detección de transformantes útiles mediante el sistema de  $\alpha$ -complementación, se añadieron el compuesto inductor de la expresión (IPTG) y el sustrato cromogénico (X-gal) en las siguientes concentraciones al medio LB sólido:

IPTG	100 µg/ml
X-Gal	40 µg/ml

*Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* fueron incubados a 28°C durante 16-18 horas en Nutrient Agar Broth. El cultivo en medio líquido se realizó en matraces sin indentaciones (de volumen variable, dependiendo del protocolo), incubando a 28°C y 250 rpm de agitación.

*Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* se incubó a 37°C durante 16-18 horas en MRS Broth en condiciones de anaerobiosis. El cultivo en medio líquido se realizó en recipientes cerrados (botes Pirex o tubos Falcon) llenos de medio de cultivo incubando a 37°C sin agitación.

### **6.3. Crecimiento de levaduras**

La cepa *Pichia pastoris* X-33 se incubó a 28°C en medio YPD durante un tiempo variable dependiendo del protocolo. El cultivo en medio líquido se realizó en matraces sin indentaciones (de volumen variable, dependiendo del protocolo), incubando a 28°C y 250 rpm de agitación.

Cuando se cultivaron clones resistentes a zeocina se complementó el medio hasta una concentración de 100 µg/ml.

## 7. Manipulación de ácidos nucleicos

### 7.1. Aislamiento de ADN genómico de bacterias

Los genes de las  $\beta$ -galactosidasas de las especies tratadas en el presente trabajo fueron amplificadas en reacciones de PCR utilizando como molde ADN genómico del microorganismo correspondiente. Para *B. subtilis*, *B. megaterium* y *L. d. bulgaricus* se utilizó el protocolo de extracción con fenol-cloroformo; para *E. coli* se utilizó un kit comercial (Qiagen, Crawley, UK). En ambos casos se partió de una muestra de cultivo de 20-40 ml incubado durante 16 horas en las condiciones adecuadas (ver apartado 6.1).

#### 7.1.1. Extracción con fenol-cloroformo

##### **Materiales:**

##### Solución A:

Tris·HCl pH 8	25 mM
EDTA	25 mM
Sacarosa	0,585 M

Esta solución se puede autoclavar.

##### Solución B:

SDS 10%	40 $\mu$ l
NaOH 2M	30 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	130 $\mu$ l

Se preparan las soluciones de SDS y de NaOH por separado y se mezclan en el momento de su uso.

##### Solución C:

MgCl <sub>2</sub>	0,1 M
-------------------	-------

**Procedimiento**

- 1) Se prepara un cultivo bacteriano de 20-40 ml crecido durante 16 horas.
- 2) Se recogen las células por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min.
- 3) Se elimina el sobrenadante
- 4) Se resuspende el precipitado en 6 ml de solución A.
- 5) Se añaden 100 µl de lisozima (a partir de un stock a 100 mg/ml, preparado al momento).
- 6) Se incuba en hielo durante 5 min.
- 7) Se añaden 3 ml de solución B y mezclar invirtiendo suavemente los tubos.
- 8) Se añaden 0,9 ml de la solución C.
- 9) Se añaden 10 ml de una solución de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifuga a 8.000 rpm durante 5 min. Se recoge el sobrenadante evitando arrastrar partículas de la interfase. Se añaden 10 ml de la misma solución al sobrenadante del punto anterior y se repite el proceso hasta que la interfase esté completamente limpia.
- 10) Se realizar una última extracción con 10 ml de cloroformo-isoamílico (24:1).
- 11) Se añade 1/10 del volumen de la muestra de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C.
- 12) Se mantiene a -20 °C durante al menos 2 horas.
- 13) Se centrifuga a 8.000 rpm a 4°C durante 20 ó 30 min.
- 14) Se elimina el sobrenadante.
- 15) Se añade 1 ml de etanol 70% para lavar el precipitado obtenido en la centrifugación.
- 16) Se centrifuga a 8.000 rpm 5 min.

- 17) Se elimina el sobrenadante y se deja secar a temperatura ambiente.
- 18) Se resuspende en 0,5 ml de Tris-HCl 5 mM (pH 8,5). Esta preparación se puede almacenar a corto plazo a 4°C y a largo plazo a -20°C.

#### **7.1.2. Extracción con kit comercial**

Se realiza la rotura de las células siguiendo las instrucciones técnicas del kit. Se centrifuga y el sobrenadante es vertido en una columna que posee una membrana de intercambio aniónico dispuesta en el interior; de este modo, el ADN genómico queda adherido a la membrana. A continuación, se realiza un lavado con un tampón etanólico para eliminar sales y componentes macromoleculares solubles. Finalmente, el ADN es recogido con un tampón (5 mM Tris-HCl pH 8,5) cuyas condiciones de baja fuerza iónica y alcalinidad hacen que el ADN se desprenda de la membrana.

#### **7.2. Tratamiento con ARNasa**

El proceso de purificación de ADN conlleva habitualmente la contaminación de la muestra con ARN. Para eliminar este contaminante las preparaciones de ADN se trataron con ARNasa. Se utilizó a una concentración final de 10 µg/ml, a partir de una solución concentrada (10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 15 mM), libre de ADNasa e incubando la reacción 90 min a 37°C.

Tras la incubación se realizó una purificación del ADN siguiendo el protocolo de extracción con fenol-cloroformo descrito en el apartado 7.1 a partir del punto 9.

### **7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La reacción en cadena de la polimerasa es un método de amplificación in vitro de ADN en el que se reproducen, en cierta medida, las condiciones de replicación del ADN en la célula. Los constituyentes principales de una PCR son:

- **Cebadores ("primers", "oligos"):** moléculas lineales de ADN monocatenario que determinan el punto de inicio de la síntesis de ADN en el molde, y a partir de los cuales la polimerasa sintetizará la cadena de ADN. Habitualmente se utilizaron oligonucleótidos de entre 18 y 25 pb. Cuando el fragmento a amplificar se quiere clonar posteriormente en algún vector con extremos defosforilados se utilizaron cebadores con extremos 5' fosforilados.
- **ADN polimerasa:** la característica principal de las ADN polimerasas utilizadas en PCR es ser termoestables, ya que la PCR implica la incubación a altas temperaturas. Estas enzimas proceden de microorganismos termófilos. Actualmente se utilizan enzimas modificadas por ingeniería genética con las que se pueden amplificar fragmentos de ADN de gran tamaño y con gran fiabilidad.
- **Molde:** molécula de ADN en la cual existen secuencias nucleotídicas complementarias a la secuencia de los cebadores. El fragmento de ADN comprendido entre los dos cebadores será el fragmento que se amplificará. Esta molécula es la que porta la información necesaria para que la polimerasa sintetice las nuevas hebras de ADN.

- **Nucleótidos tri-fosfato:** Sustratos de la polimerasa para la síntesis de nuevas hebras de ADN.

En el presente trabajo se han utilizado las siguientes ADN polimerasas:

- **Advantage-HF 2 Polymerase Mix<sup>®</sup>** (Clontech, Palo Alto, EE.UU.) Es una mezcla comercial que combina la ADN *Taq* TITANIUM, una enzima deficiente en actividad nucleasa con una delección en el extremo amino y con un anticuerpo TaqStart™ que permite realizar PCR con inicio automático por calor (Dellogg et ál., 1994), y una menor cantidad de una polimerasa a prueba de errores. Se estima que introduce 2,3 mutaciones por cada 100 kb tras 25 ciclos de reacción.
- **PfuTurbo<sup>®</sup> DNA Polymerase** (Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Es una versión mejorada de la *Pfu* DNA polimerasa para realizar PCR de alta fidelidad. Este producto es una combinación de una *Pfu* ADN polimerasa clonada y un factor de termoestabilidad que incrementa la cantidad de producto de PCR sin alterar la fidelidad de replicación del ADN. Con esta polimerasa se pueden amplificar dianas de ADN genómico de hasta 10 kb y dianas en vectores de hasta 19 kb de longitud. El grado de error es de 3,25 mutaciones por cada 100 kb tras 25 ciclos de reacción.
- **Mutazyme<sup>®</sup> DNA Polymerase** (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) Es una ADN polimerasa comercial con alta frecuencia de producción de errores durante la polimerización del ADN ("error-prone"). Esta enzima

produce todas las transiciones y transversiones posibles con un mínimo de parcialidad, y puede ser aplicada a la mutagénesis de dianas de gran tamaño (1-10 kb). Tiene grado de error muy superior a las dos enzimas anteriores. Los productos de la PCR producidos con esta enzima poseen los extremos romos. Esta polimerasa viene incluida en el kit de mutagénesis "GeneMorph® PCR" (Stratagene), el cual simplifica el proceso de construcción de librerías de mutantes para realizar evolución dirigida de proteínas y estudios de estructura-función.

El esquema general de una PCR consta de tres pasos:

- 1) **Desnaturalización:** 94-96°C, 30-60 s. En este punto se desnatura completamente el ADN molde, haciéndolo accesible para la unión de los cebadores a sus zonas complementarias.
- 2) **Hibridación:** 37-70°C, 30-60 s. La disminución de la temperatura favorece la unión de los cebadores a sus zonas complementarias en el ADN molde. La temperatura de renaturalización se establece generalmente 5°C por debajo de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los cebadores, calculada empíricamente por su composición nucleotídica.
- 3) **Extensión o elongación:** 68-72°C. El tiempo de elongación dependerá del tamaño del fragmento de ADN que se quiera amplificar. Las polimerasas que se han utilizado para la realización de este trabajo tenían una velocidad de síntesis de 0,5-2 kb/min.

El conjunto de estos tres pasos constituye un ciclo de PCR. Las reacciones completas pueden constar de entre 20 y 40 ciclos, duplicándose, teóricamente, la cantidad de ADN correspondiente al fragmento a amplificar en cada ciclo. Adicionalmente se suele realizar un paso inicial de desnaturalización, a 94-96°C durante 2-3 min, para asegurarse de que en el primer ciclo todo el ADN molde se encuentre completamente desnaturalizado.

Igualmente, después de finalizar el último ciclo de PCR se puede programar un paso de extensión, a 68-72°C durante 5-10 min, en el que se permite que la polimerasa termine de sintetizar todas las hebras que no hubiera completado.

#### ***7.4. Purificación de fragmentos de ADN.***

En el presente trabajo se han utilizado sistemas de purificación de ADN basados en la adsorción a sílica de los ácidos nucleicos. Mediante este método el ADN se une, en presencia de sales caotrópicas y otros componentes que disuelven la agarosa, a una membrana de sílica dispuesta en el interior de una columna. A continuación, se realiza un lavado con un tampón etanólico para eliminar sales y componentes macromoleculares solubles. Finalmente, el ADN es recogido con un tampón (5 mM Tris-HCl pH 8,5) cuyas condiciones de baja fuerza iónica y alcalinidad hacen que el ADN se desprenda de la membrana.

Siguiendo este procedimiento se han purificado: productos de PCR, digestiones con enzimas de restricción y fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Los sistemas de purificación basados en este método fueron adquiridos a Macherey-Nagel (Düren, Alemania).

### **7.5. Ligación de moléculas de ADN**

Para la ligación de extremos de moléculas lineales de ADN se utilizó la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), la cual cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato entre dobles cadenas de ADN.

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Se mezclan cantidades equimolares de los fragmentos de ADN que se quieren ligar (aproximadamente 25-50 ng) en un volumen final de 8,5  $\mu$ l.
2. Se añade 1  $\mu$ l de tampón de ligasa 10x (Tris-HCl 0,66 M; MgCl<sub>2</sub> 0,05 M; DTT 0,01 M; dATP 10 mM; pH 7.5) y se añade 0,5  $\mu$ l de ADN ligasa (1 U/ $\mu$ l).
3. La reacción se incuba durante 12 h a 13-14°C.
4. Finalmente, los productos de la reacción de ligación son utilizados para transformar una cepa apropiada de *E. coli*.

En el presente trabajo se ha utilizado adicionalmente un tipo especial de ligación mediada por la enzima topoisomerasa ligada al vector pET101/D-TOPO. En este sistema de clonación, los productos de PCR se clonan direccionalmente añadiendo cuatro bases al cebador directo (CACC). El brazo sobresaliente (GGTG) del vector pET101/D-TOPO anilla con el extremo 5' del producto de la PCR y lo estabiliza en la orientación correcta. El proceso se ha realizado siguiendo las instrucciones técnicas del kit comercial "Champion™ pET Direccional TOPO® Expresión Kits" (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.).

### **7.6. Desfosforilación de extremos 5' de fragmentos de ADN mediante la fosfatasa alcalina de camarón.**

La desfosforilación de extremos 5' de fragmentos de ADN se utilizó para evitar la autoligación de los extremos de una misma molécula lineal de ADN.

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Se mezclan 20  $\mu$ l de la preparación de ADN en agua con 2,5  $\mu$ l de tampón de fosfatasa 10x (Tris-HCl 50 mM pH 9; 10 mM  $MgCl_2$ ). Esta mezcla se calienta 10 min a 65°C para favorecer la disolución del ADN y la separación de sus extremos.
2. Después de dejar enfriar la mezcla durante 4-5 min, se añaden 2,5  $\mu$ l de fosfatasa alcalina de camarón (1 U/ $\mu$ l, Promega Corporation) y se incuba a 37°C durante 30 min.
3. Se calienta la mezcla de reacción a 65°C durante 15 min para inactivar la enzima y se purifica el ADN (ver "Purificación de fragmentos de ADN" punto 7.4).

### **7.7. Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Las enzimas de restricción fueron utilizadas siguiendo las recomendaciones del proveedor (Promega, Madison, EE.UU.). La composición del tampón de reacción, pH y concentración de sales apropiados para cada enzima se respetó en todo momento, utilizando en cada paso el tampón de reacción suministrado por la casa comercial.

### **7.8. Minipreparaciones de ADN plasmídico (minipreps)**

Se ha seguido el protocolo descrito por Holmes y Quigley (1981):

1. Se inoculan colonias aisladas de *E. coli* en tubos de 1,5 ml con 1 ml de medio LB, complementado con el antibiótico selectivo apropiado. Estos cultivos se incuban durante 8-12 h a 37°C con agitación (250 rpm).
2. Se recogen las células por centrifugación durante 10 min a 10.000 rpm a temperatura ambiente. Después de descartar el sobrenadante, se resuspende el precipitado en 300-350  $\mu$ l de STET (Sacarosa 8%, Tritón X-100 0,5%, Tris-HCl 10 mM, EDTA 50 mM, pH 8) mediante agitación fuerte.
3. Se añaden 10  $\mu$ l de una solución 10 mg/ml de lisozima alcalina en agua y se incuba 45 s con agitación fuerte.
4. Una vez lisadas las células, se incuban las reacciones en agua hirviendo durante 45 s. Este proceso provocará la coagulación de los restos celulares, ADN cromosómico y proteínas; que serán concentrados por centrifugación durante 15 min a 14.000 rpm. El precipitado formado por estos componentes celulares se retira del fondo de los tubos con un palillo libre de nucleasas.
5. El sobrenadante obtenido se mezcla con 40  $\mu$ l de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 400  $\mu$ l de 2-propanol, precipitando con este procedimiento el ADN plasmídico. Dicho ADN se recoge por centrifugación durante 10 min a 14.000 rpm, y una vez descartado el sobrenadante, se lava con etanol al 70% en agua.

6. El precipitado se seca al aire y se resuspende en 30-40  $\mu$ l de Tris-HCl (5 mM pH 8,5), almacenándose a 4°C o a temperatura ambiente.

Durante el transcurso de este trabajo se han utilizado también sistemas de purificación de plásmidos basados en la adsorción de los ácidos nucleicos a una matriz de silica (ver apartado 7.4.). Los sistemas de purificación basados en este método utilizados para el desarrollo del trabajo presentado en esta memoria fueron adquiridos a Macherey-Nagel (Düren, Alemania).

### **7.9. Mutación dirigida**

El sistema "Quick-change<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene, La Jolla, EE.UU) permite introducir modificaciones (mutaciones puntuales, deleciones o inserciones) en la secuencia nucleotídica de fragmentos de ADN presentes en plásmidos funcionales en *E. coli* (Fig. 2.6). La modificación en la secuencia se introduce mediante la amplificación del vector a partir de dos oligonucleótidos, complementarios entre sí, que actúan como cebadores para una reacción de PCR. Estos cebadores son a su vez homólogos a la zona del plásmido en la cual se va a introducir la mutación, y presentan dicha mutación en su secuencia. Una vez realizada la amplificación mediante PCR, el producto de esta reacción se digiere con la enzima de restricción *Dpn* I. Esta enzima posee múltiples sitios diana en el ADN (G<sup>m6</sup> ATC) y requiere que estas secuencias diana se encuentren metiladas o hemimetiladas. Esta propiedad hace que el ADN de nueva síntesis de la PCR esté protegido frente a la acción endonucleásica de *Dpn* I, mientras que el ADN molde (metilado al utilizarse plásmidos amplificados en *E.*

*coli*) es degradado por esta enzima. Una vez que se ha eliminado el ADN molde, sin mutar, se transforma una muestra de la reacción en *E. coli*. Las discontinuidades presentes en los plásmidos de nueva síntesis serán reparadas por la célula hospedadora, y se amplificará el producto de la mutación en forma de plásmidos sin mellas en su secuencia.

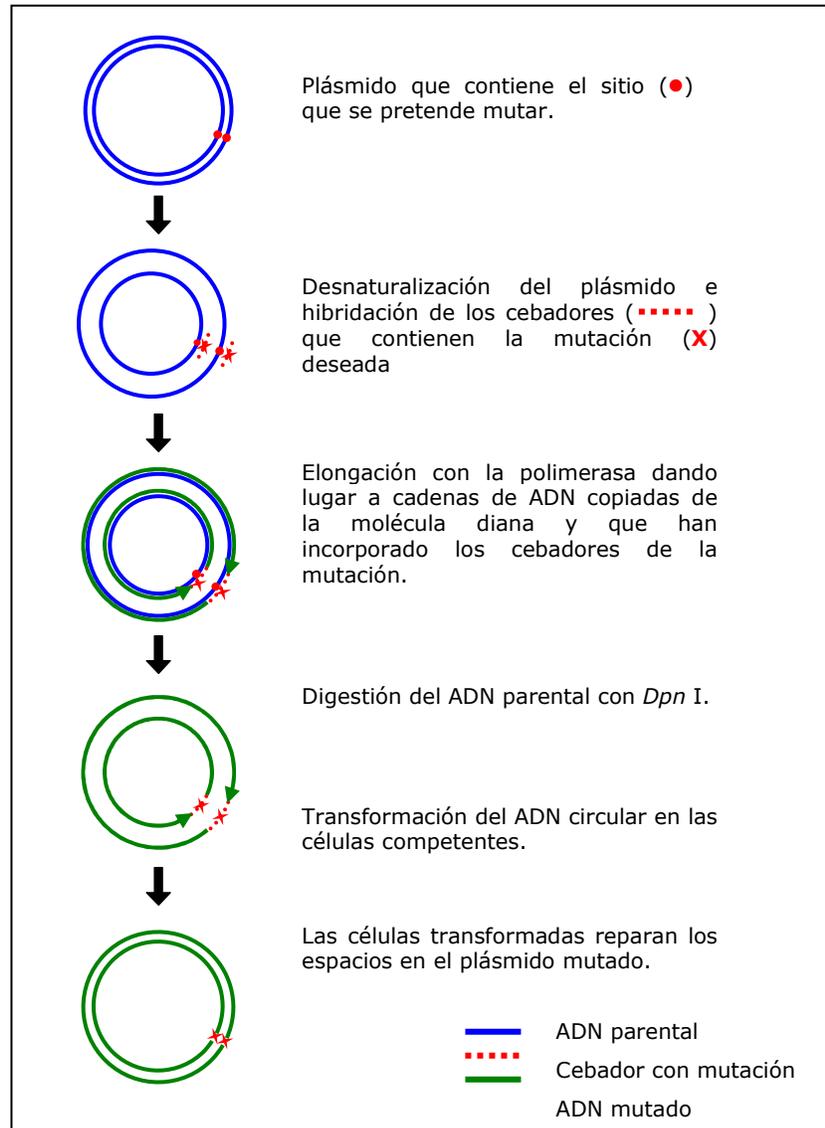


Figura 2.6. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida con el sistema “Quickchange”.

## **8. Manipulación de células.**

### **8.1. Transformación de *E. coli*.**

La transformación genética es un proceso por el que una célula receptora sufre un cambio en su dotación genética provocado por la captación de ADN exógeno.

Se dice de una célula que es competente cuando es capaz de tomar una molécula de ADN y ser transformada. Existen varios procedimientos para obtener células de *E. coli* en estado competente. Uno de los más sencillos es el que permite la transformación de estas bacterias mediante electroporación.

El proceso de electroporación requiere que las células estén en fase exponencial y en un medio libre de iones que puedan afectar al pulso eléctrico. El protocolo que se describe a continuación permite disponer de muestras de células electrocompetentes, es decir, células preparadas para un proceso de electroporación.

#### **8.1.1. Preparación de células electrocompetentes.**

1. A partir de una colonia aislada de *E. coli*, se inocula un matraz de 500 ml con 100 ml de medio LB (preparado con agua MiliQ). Se incuba durante 16 h a 37°C y 250 rpm.
2. Se inoculan 2 matraces de 500 ml con 100 ml de medio LB (preparado con agua MiliQ) con 1 ml del cultivo anterior. Se incuban a 37°C hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,5 (aproximadamente 2 h).
3. Se enfrían los cultivos en agua-hielo durante 30 minutos para ralentizar el crecimiento del cultivo.

4. Se recogen las células por centrifugación durante 10 min a 4.000 rpm a 4°C.
5. El precipitado se lava sucesivamente con 200, 100 y 4 ml de glicerol al 10% y finalmente se resuspende en 400 µl de esta solución.
6. La suspensión de células se reparte en fracciones de 40 µl en tubos de 1,5 ml fríos y se congelan rápidamente por inmersión en nieve carbónica/etanol o en N<sub>2</sub> líquido.
7. Las células se pueden utilizar inmediatamente o se pueden conservare a -80°C hasta su uso.

Mediante este procedimiento se obtienen células competentes con una eficiencia de 10<sup>7</sup>-10<sup>9</sup> transformantes por µg de ADN plasmídico.

#### **8.1.2. Transformación de *E. coli* por electroporación.**

1. Se añade 1 µl de ADN, con el que se quiere transformar, a 40 µl de células competentes previamente descongeladas en hielo.
2. Se transfiere la mezcla de células y ADN a una cubeta de electroporación de 0,2 cm previamente enfriada en hielo. La mezcla debe estar en contacto con las dos láminas metálicas de la cubeta y sin formar burbujas.
3. Se ajustan las condiciones de electroporación (10 µF, 2500 V y 600 Ω) y se realiza la electroporación. La duración del pulso debe ser de 4-5 milisegundos para obtener una buena eficiencia de transformación.

4. Se añade 1 ml de LB en la cubeta de transformación, se mezcla con una micropipeta, y se recoge el medio con células en un tubo de 1,5 ml.
5. Se incuba a 37°C en agitación a 250 rpm durante 1 h.
6. Se siembra la suspensión de células en placas de medio sólido con el correspondiente antibiótico.

### **8.2. Transformación de *Pichia pastoris* X-33.**

El proceso de electroporación descrito para bacterias es aplicable, con ligeras modificaciones, a determinadas levaduras, como *P. pastoris* X-33, siguiendo los siguientes protocolos.

#### **8.2.1. Preparación de células electrocompetentes.**

La preparación de células electrocompetentes se realiza siguiendo los siguientes pasos:

1. Incubar una colonia de la levadura en un matraz de 50 ml con 5 ml de medio YPD a 30°C y 250 rpm durante 16 horas.
2. Con 0,1-0,5 ml del cultivo anterior, inocular 500 ml de medio fresco en un matraz de 2 l. Crecer toda 16 hoas hasta que la  $DO_{600} = 1,3-1,5$ .
3. Centrifugar a 1500 g durante 5 min a 4°C. Resuspender las células precipitadas en 500 ml de agua estéril fría.
4. Centrifugar las células como en el paso 3, y resuspender las células precipitadas en 250 ml de agua estéril fría.
5. Centrifugar las células como en el paso 3, y resuspender las células precipitadas en 20 ml de sorbitol 1 M frío.

6. Centrifugar las células como en el paso 3, y resuspender las células precipitadas en 1 ml de sorbitol 1 M para que alcance un volumen final de aproximadamente 1,5 ml. Conservar las células en hielo y usarlas ese mismo día. No pueden ser almacenadas.

En esta cepa, el método de electroporación produce de  $10^3$ - $10^4$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN lineal ó  $10^2$ - $10^3$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico.

### **8.2.2. Transformación de *P. pastoris* por electroporación.**

La transformación se puede realizar tanto con plásmidos linearizado como sin linearizar sin embargo mientras que en el primer caso se utilizan del orden de 5-10  $\mu\text{g}$  de ADN en el segundo se requieren concentraciones diez veces mayores (50-100  $\mu\text{g}$  de ADN por reacción de transformación).

1. Mezclar 80  $\mu\text{l}$  de células electrocompetentes con el ADN (en 5-10  $\mu\text{l}$  de agua estéril) y transferir la mezcla a una cubeta de electroporación de 0,2 cm.
2. Incubar la cubeta con las células en hielo durante 5 min.
3. Ajustar las condiciones de electroporación (10  $\mu\text{F}$ , 2000 V y 600  $\Omega$ ) y realizar la electroporación.
4. Inmediatamente añadir a la mezcla de la cubeta 1 ml de sorbitol 1 M frío. Transferir el contenido de la cubeta a un tubo estéril de 15 ml.
5. Incubar a 30°C sin agitación durante 1-2 horas.
6. Extender 10, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{l}$  de la transformación por separado en placas de medio selectivo. En este caso el

medio utilizado fue YPDS, conteniendo 100 µg/ml de zeocina.

7. Incubar las placas sembradas durante 2-3 días a 30°C hasta que se observen colonias.

## **9. Expresión heteróloga.**

### **9. 1. Expresión en *E. coli* BL21(DE3)*w*.**

El sistema de expresión pET es uno de los más utilizados para la clonación y expresión *in vivo* de proteínas recombinantes en *E. coli*. Esto es debido a la alta selectividad y actividad de la ARN polimerasa T7, presente en el sistema pET, y a la alta eficiencia de traducción mediada por las señales de iniciación de traducción del gen *10*.

En este sistema, se debe clonar, en el correspondiente plásmido pET, la secuencia de ADN codificante de la proteína de interés "aguas abajo" del promotor T7 y de las secuencias líder del gen *10*. Una vez construido el plásmido de expresión se debe introducir en el hospedador adecuado.

En nuestro caso, la cepa elegida fue *E. coli* BL21(DE3)*w*. La cepa BL21(DE3) y sus derivadas contienen en su cromosoma un "cassette" de expresión de la ARN polimerasa T7 controlado por el promotor *lacUV5*. El cromosoma bacteriano contiene además el gen *lacI<sup>q</sup>*, el cual codifica un represor que se une al operador del promotor *lacUV5* impidiendo que se transcriba la ARN polimerasa T7. Esto permite que la expresión pueda ser controlada por la adición de IPTG al medio de cultivo, ya que, el IPTG se une a la proteína codificada por el gen *lacI<sup>q</sup>*, con lo que el operador del

promotor *lacUV5* es desreprimido y se produce la sobreexpresión de la ARN polimerasa T7.

El protocolo de expresión utilizado con fines analíticos fue el siguiente:

1. Se inocular una colonia previamente seleccionada en medio sólido en 1 ml de medio LB con ampicilina. Se incubar toda la noche a 37°C en agitación (220-250 rpm).
2. Se inocula 1 ml de LB con 50 µl del cultivo anterior. Se incubar durante 2 h a 37°C en agitación (220-250 rpm).
3. Se tomar una muestra de 100 del cultivo y se transfiere a un tubo limpio (muestra control sin inducir).
4. Al resto del cultivo (900 µl) se le añade IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Se incubar con agitación (220-250 rpm) durante 2 h a 37°C.
5. Una vez finalizado el período de inducción se recogen las células por centrifugación. Dado que la expresión es intracelular se debe proceder a la rotura de las células. Para ello, el precipitado se resuspende en tampón Z (fosfato sódico 0,1 M, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM), con EDTA (1mM) y 10% glicerol. Se añade una cantidad de perlas de vidrio ("Glass beads", Sigma) equivalente al volumen del precipitado, y se agita con un agitador de tubos durante 10 pulsos de 15" alternando con 15" de incubación en hielo.
6. Se centrifuga la muestra durante 15 min a 11.000 rpm y a 4°C para poder obtener el sobrenadante con la fracción de proteínas solubles.

### **9.2. Expresión en *P. pastoris* X-33.**

El sistema de expresión basado en *Pichia pastoris* permite expresar de forma heteróloga proteínas con la opción de secretarlas al medio extracelular con un fondo mínimo de proteínas propias de la cepa hospedadora.

La utilización de *P. pastoris* como sistema de expresión presenta ventajas adicionales como por ejemplo que la manipulación es tan sencilla como la de los microorganismos modelo *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*; y que es de 10 a 100 veces más eficiente en cuanto a la cantidad de proteína sintetizada que *S. cerevisiae*.

En el presente trabajo se ha utilizado el kit comercial "Easy Select™ *Pichia* Expression Kit" (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.).

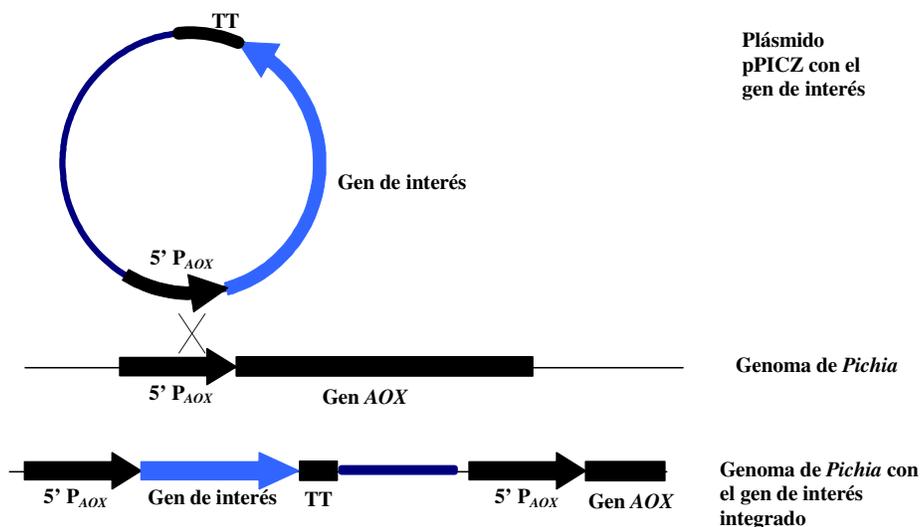
El sistema de expresión se basa en que esta cepa es metilotrófica, de modo que es capaz de metabolizar el metanol como única fuente de carbono en ausencia de fuentes de carbono represoras como la glucosa. Para ello, el metanol es oxidado a formaldehído mediante la enzima alcohol oxidasa usando oxígeno molecular. Como la alcohol oxidasa tiene poca afinidad por el oxígeno, *P. pastoris* X-33 compensa esta carencia produciendo ingentes cantidades de esta enzima, gracias a que el promotor de la alcohol oxidasa (AOX) es muy activo.

El sistema de expresión utilizado en este trabajo aprovecha esta característica y utiliza el promotor del gen *AOX1* para la transcripción del gen de la proteína que se desea expresar.

Para la introducción del gen de interés en el hospedador, se utilizan plásmidos integrativos que permiten, por medio de un

proceso de recombinación homóloga, dirigir el "casette" de expresión a un locus concreto: el locus *AOX1* (Fig. 2.7).

La elección del vector permite dirigir la proteína heteróloga al medio extracelular (plásmidos portando el péptido señal del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, pPICZ $\alpha$ ) o al citoplasma del hospedador (pPICZ).



**Figura 2.7.** Esquema del proceso de integración del plásmido pPICZ portador del gen de interés en el genoma del hospedador *P. pastoris*.

El protocolo general de expresión de esta cepa es el siguiente:

1. Se inocula una colonia de *P. pastoris* procedente de un experimento de transformación en 25 ml de medio BMGY, en un matraz de 250 ml. Se incuba a 28-30°C en agitación (250-300 rpm) hasta que el cultivo alcance una  $DO_{600} = 2-6$ .

En ese momento las células estarán en la fase logarítmica de crecimiento.

2. Se centrifugan las células a 1.500-3.000 g durante 5 min a temperatura ambiente. Se decanta el sobrenadante y se resuspende el precipitado de células en un volumen tal de medio BMMY que alcance una  $DO_{600} = 1,0$  (aprox. 100-200 ml).
3. Se incuba este cultivo en un matraz de 1 l a 28-30°C en agitación (250-300 rpm).
4. Cada 24 h se añade metanol hasta una concentración final de 0,5% para mantener las condiciones de inducción.
5. Se toman muestras de 1 ml de cultivo a las 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas de inducción. Estas muestras se usarán para analizar los niveles de expresión y para determinar el tiempo óptimo de inducción.

## **10. Purificación de enzimas mediante cromatografía.**

En el presente trabajo se ha realizado una purificación parcial de una  $\beta$ -galactosidasa utilizando procedimientos de cromatografía de afinidad y de filtración en gel.

### **10.1. Cromatografía de afinidad.**

La cromatografía de afinidad es un método de purificación de proteínas altamente específico. Muchas proteínas muestran interacciones fuertes con otras moléculas, como por ejemplo con análogos de sus sustratos o cofactores. Las moléculas apropiadas, unidas a una matriz inerte actúan como "anzuelos" para atrapar la

proteína deseada. Todas las demás proteínas simplemente pasarán a través de la columna. Las moléculas de proteína inmovilizadas pueden ser liberadas con un tampón que contenga la molécula que interacciona en forma libre o con algún otro reactivo que pueda romper la interacción.

En este trabajo, se ha utilizado una columna con 3 ml de agarosa-p-aminofenil- $\beta$ -D-tiogalactósido (Sigma Chemical, EE.UU.), a cuyos residuos galactósidos se une de forma específica la  $\beta$ -galactosidasa. La columna con la resina fue equilibrada con tampón Z. Una vez cargada la muestra proteica se realizaron lavados con tampón Z. La proteína adherida a la matriz fue liberada, tomándose fracciones de 0,5 ml; con tampón borato sódico 0,1 M pH 10.

### ***10.2. Cromatografía de filtración en gel.***

La cromatografía de filtración en gel se realiza empleando unas matrices formadas por unas esferas porosas. Este procedimiento de purificación permite separar las proteínas según su masa molecular. De modo que las proteínas mayores son liberadas en primer lugar, y posteriormente las menores. Con este sistema, es posible calcular la masa molecular de una proteína en relación a una recta patrón generada a partir de los resultados obtenidos (en la misma columna y en las mismas condiciones) con unas proteínas de masa molecular conocida.

En el presente trabajo se empleó el sistema de FPLC ("Fast Protein Liquid Chromatography") Äktaexplorer (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido) para realizar la cromatografía en filtración de gel. Se utilizó una columna de

agarosa entrecruzada Superose™ 12 HR 10/30 que se caracteriza por tener un límite de exclusión de  $2 \times 10^6$  Mr y un rango de separación óptima de 1.000 a  $3 \times 10^5$  Mr. La fase móvil utilizada tanto para equilibrar como para fluir las proteínas fue tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7, 0,15 M NaCl.

Para detectar las proteínas presentes en las muestras se utilizó un lector de absorbancia de 280 nm acoplado en línea. El flujo de la fase móvil fue de 0,3 ml/min, recogándose fracciones de 0,5 ml.

La columna fue calibrada utilizando los siguientes estándares de masa molecular (Amersham Biosciences UK Limited, Reino Unido): ribonucleasa A (15.800 Da), ovalbúmina (49.400 Da), aldolasa (191.000 Da) y catalasa (215.000 Da).

## **11. Electroforesis de macromoléculas**

### **11.1. Electroforesis de ADN**

Las condiciones de electroforesis para separar moléculas de ADN en geles de agarosa fueron las descritas por Sambrook et ál. (1989).

Se utilizó agarosa de baja electroendosmosis ("Molecular Biology Agarose", Bio-Rad, Hercules, EE.UU) a diferentes porcentajes (desde 0,5% hasta 1,2%), dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN a separar. Como tampón de electroforesis se utilizó TAE (Tris base 242 g, ácido acético glacial 57,1 ml, EDTA 0,5 M pH 8 100 ml, H<sub>2</sub>O hasta 1 litro). El gel se preparó calentando el tampón con la agarosa en microondas.

Las muestras de ADN se mezclaron con tampón de carga 6x (0,03% azul de bromofenol, 0,03% cianol xileno FF, 0,4% naranja G, 15% Ficoll® 400, 10mM Tris-HCl (pH 7,5) y 50 mM EDTA (pH 8,0), "Blue/Orange 6x Loading Dye" Promega, Co., Madison, EE.UU.), previamente a su carga en los geles.

Para desarrollar la electroforesis se aplicó una diferencia de potencial de 80-100 voltios durante un tiempo variable, dependiendo de la longitud, del porcentaje del gel y tamaño esperado de los fragmentos de ADN.

Una vez finalizada la electroforesis, se tiñeron los geles sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio durante 15-20 min. Los geles se observaron sobre un transiluminador de luz UV ("Bioimaging System"  $\lambda = 302$  nm, Syngene, Frederick, EE.UU.), y se fotografiaron con una vídeo impresora (Digital Graphic Printer UP-D890, Sony, Japón).

El tamaño de las bandas de ADN en los geles de agarosa se estimó por comparación con un patrón de fragmentos de distintos tamaños de ADN. El patrón que se utilizó en el presente trabajo fue el ADN del bacteriófago  $\lambda$  digerido con *HinD* III, que presenta las siguientes bandas electroforéticas: 23.130, 9.416, 6.557, 4.351, 2.322, 2.027, 564 y 125 pb.

### **11.2. Electroforesis de proteínas.**

El medio elegido para la mayoría de las separaciones electroforéticas de proteínas es el gel de poliacrilamida (PAGE: "PolyAcrylamide Gel Electrophoresis"). Estos geles constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: transparencia,

elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos.

El gel está constituido por monómeros de acrilamida y metilenebisacrilamida ("Bis") en proporción 29:1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.). La polimerización se inicia al añadir una amina terciaria (N, N, N', N'-tetrametiletilenediamina, "TEMED") y persulfato amónico.

El gel se prepara en dos fases, una superior o gel concentrante, y una inferior o gel separador. Las propiedades de la matriz y el pH de estas fases permiten que en un principio las muestras se concentren para que posteriormente se separen los distintos componentes en fracciones finamente definidas.

Entre las diversas técnicas de PAGE, probablemente la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). En esta técnica se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados cargados negativamente. En la técnica SDS-PAGE las proteínas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente según sus diferencias de masa molecular.

La determinación de la masa molecular de proteínas mediante SDS-PAGE es válida cuando se analizan cadenas proteicas individuales (subunidades), en donde se han reducido todos los enlaces disulfuro y por lo tanto, se ha distendido toda la cadena proteica para su interacción con el SDS. Para reducir los puentes disulfuro presentes en las proteínas se añade a la muestra 2-mercaptoetanol (u otro agente reductor como el ditioneitol); de modo que los enlaces disulfuro intra e intercatenarios son

disociados, la estructura cuaternaria se pierde y las subunidades se separan como cadenas peptídicas individuales.

En el presente trabajo se prepararon geles desnaturizantes de poliacrilamida (6-10%) conteniendo dodecil sulfato sódico (SDS). Los geles fueron desarrollados usando un equipo Mini Protean<sup>®</sup> 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.). Las muestras proteínicas fueron desnaturizadas por ebullición durante 5 min con tampón de carga SDS y 2,5% de 2-mercaptoetanol.

Una vez cargadas las muestras, los geles fueron sometidos a un voltaje constante de 200 v. Posteriormente, para visualizar las proteínas, el gel fue teñido sumergiéndolo en una solución de azul de Coomassie durante varias horas (azul de Coomassie 0,1 %, metanol 40 %, ácido acético 10 %). Por último, se eliminó el exceso de colorante sumergiendo el gel en solución decoloradora (20% metanol, 7% ácido acético).

La masa molecular de las proteínas presentes en las muestras fue determinada por comparación con el marcador molecular SDS-PAGE Unstained Standards Broad Range (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.), formado por la siguiente mezcla de proteínas: miosina (200 000 Da),  $\beta$ -galactosidasa (116 250 Da), fosforilasa b (97 400 Da), albúmina bovina sérica (66 200 Da), ovoalbúmina (45 000 Da), anhidrasa carbónica (31 000 Da), inhibidor de tripsina (21 500 Da), lisozima (14 400 Da) y aprotinina (6 500 Da).

## **12. Determinación de la concentración de proteína.**

La concentración de proteína fue determinada mediante el procedimiento de Bradford (Bradford, 1976) usando albúmina sérica bovina como patrón.

## **13. Detección y cuantificación de la actividad $\beta$ -galactosidasa**

Los métodos que se describen a continuación se utilizaron para determinar la actividad de las  $\beta$ -galactosidasas estudiadas en el presente trabajo.

Las tres enzimas objeto de interés presentan actividad frente a la lactosa (son lactasas), por lo que su actividad podría haber sido cuantificada valorando la desaparición de lactosa o la aparición de glucosa y/o galactosa. Sin embargo, la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa basada en la concentración de galactosa liberada o lactosa consumida puede llevar a obtener datos erróneos, debido a la actividad transglicosidasa que presentan algunas  $\beta$ -galactosidasas, y por la cual, moléculas de galactosa pueden ser transferidas a moléculas de lactosa para formar galacto-oligosacáridos. Este inconveniente puede solventarse realizando la determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa en ensayos con concentraciones de lactosa inferiores al 5% y en reacciones de corta duración. En estas condiciones la actividad transferasa de las  $\beta$ -galactosidasas es mínima, por lo que la concentración de galactosa puede utilizarse para la determinación de la actividad lactasa.

Otros métodos utilizados para determinar la actividad  $\beta$ -galactosidasa de una enzima no utilizan la lactosa como sustrato,

sino que en su lugar utilizan análogos estructurales de esta molécula con propiedades cromogénicas de modo que se puede determinar su hidrólisis por aparición de color. Algunos de los más utilizados son el oNPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido), el pNPG (p-nitrofenil-D-galactopiranosido), el X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) y el 4-metilumbeliferona- $\beta$ -D-galactósido. Los sustratos sintéticos como el o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (oNPG) y el p-nitrofenil-D-galactopiranosido (pNPG) son hidrolizados generalmente más rápido que la lactosa y permiten un análisis colorimétrico, ya que, el nitrofenol liberado absorbe en un rango 400-420 nm en una solución alcalina.

Para la detección de niveles muy bajos de actividad, se pueden utilizar métodos fluorométricos, que son más sensibles, utilizando como sustrato 4-metilumbeliferona- $\beta$ -D-galactósido (Woolen et ál., 1965).

### **13.1. Ensayo con X-Gal como sustrato**

La actividad  $\beta$ -galactosidasa se puede detectar en sustratos sólidos, como las placas de agar, utilizando el sustrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido), el cual al ser hidrolizado tiñe las colonias de color azul. Este método cualitativo se ha extendido debido a los sistemas de clonación en *E. coli* basados en la  $\alpha$ -complementación de cepas de esta bacteria con delección parcial del gen lacZ.

### **13.2. Ensayo con oNPG como sustrato:**

El o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (oNPG) es un glicósido que tiene un coeficiente de absorción molar despreciable dentro de las longitudes de onda visibles. Sin embargo, el producto de la

hidrólisis de este sustrato con  $\beta$ -galactosidasas, el *o*-nitrofenol (*o*NP), es susceptible de cambios tautoméricos que le dan un color amarillo en soluciones alcalinas, con un pico de absorción a 420 nm. El *o*NP es un ácido débil ( $pK_{a1}$  7,3), y en estado ácido, el tautómero benzenoide es prácticamente incoloro. Por este motivo, debe ser determinado en soluciones bien tamponadas en las cuales una proporción fija de *o*NP está disociada y, por lo tanto, coloreada; o en soluciones alcalinas (pH 10 o más), en las cuales la fracción sin disociar (incolora) es despreciable (Lederberg, 1950).

La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue determinada mediante ensayos en las siguientes condiciones:

**1. En placa de 96 pocillos:**

- a) Se añadieron 100  $\mu$ l de *o*NPG en tampón Z (pH 7) a una concentración de 4 mg/ml.
- b) Se añadieron 50  $\mu$ l de extracto o solución enzimática.
- c) Se incubó la reacción a 37°C durante 20 min.
- d) Se añadieron 50  $\mu$ l de  $Na_2CO_3$  1 M, para parar la reacción. Por último, se realizó una lectura de la absorbancia a 415 nm y a 550 nm (para determinar la proporción de absorbancia a 415 nm que era debida a restos celulares).
- e) Para cuantificar la actividad hidrolítica de la enzima, el resultado se contrastó con una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de *o*-nitrofenol.

**2. En tubos de ensayo de 1,5 ml:**

- a) Se añadieron 100  $\mu$ l de *o*NPG en tampón Z (pH 7) a una concentración de 4 mg/ml.
- b) Se añadieron 300  $\mu$ l de tampón Z (pH 7).

- c) Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de extracto o solución enzimática
- d) La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 20 min.
- e) Se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M, para parar la reacción.  
Por último, se realizó una lectura de la absorbancia a 415 nm y a 550 nm.

En el presente trabajo se ha considerado la unidad de actividad  $\beta$ -galactosidasa como la cantidad de enzima que libera un  $\mu\text{mol}$  de oNP por minuto a 37°C y pH 7.

#### **14. Determinación y cuantificación de galacto-oligosacáridos**

La composición de las muestras tomadas durante la síntesis de galacto-oligosacáridos se determinó mediante HPLC utilizando un equipo "HPLC 2695 Alliance" acoplado a un detector de índice de refracción.

Se utilizó como fase estacionaria una columna "MCI GEL (CK08E) 300 x 8,0 mm, y agua como fase móvil. Se inyectaron 10  $\mu\text{l}$  por muestra diluida veinticinco veces, la temperatura del detector fue de 50°C y la medida se realizó por áreas.

### ***III. Resultados y análisis***



## **1. Expresión heteróloga de las $\beta$ -galactosidasas**

El objetivo general del trabajo presentado en esta memoria era establecer un procedimiento para la síntesis enzimática de GOS por medio de  $\beta$ -galactosidasas microbianas.

El primer paso en nuestro plan de trabajo fue obtener enzimas activas para comprobar su capacidad de síntesis de GOS. Para llevar a cabo este paso, decidimos clonar genes con secuencias conocidas que codificaran  $\beta$ -galactosidasas, y utilizar estos genes para construir cepas microbianas que produjeran eficientemente las  $\beta$ -galactosidasas seleccionadas.

A continuación, describiremos los experimentos de clonación, secuenciación, expresión heteróloga en bacterias y levaduras de las  $\beta$ -galactosidasas y el análisis de la actividad de las enzimas producidas.

### **1.1. Clonación de los genes *mbgA*, *lacA* y *lacZ***

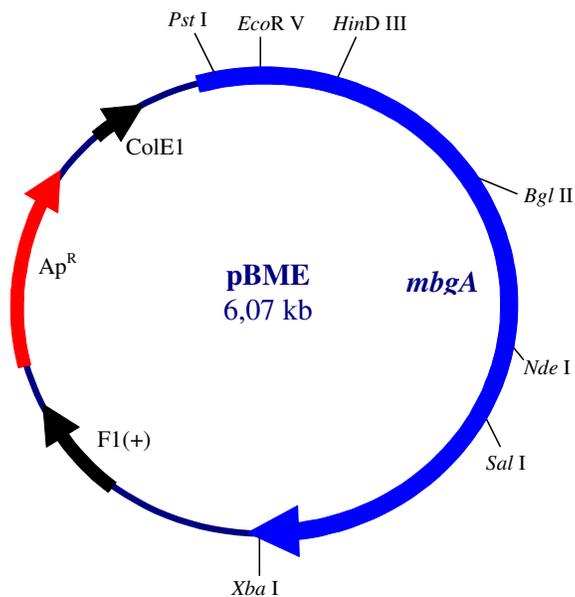
#### **1.1.1. Clonación del gen *mbgA* de *Bacillus megaterium***

Una de las  $\beta$ -galactosidasas que seleccionamos para nuestros estudios fue la enzima codificada por el gen *mbgA* de *Bacillus megaterium*, debido a su alta tasa de actividad en este microorganismo.

En primer lugar, realizamos un ensayo en medio sólido (Nutrient Agar Broth) en presencia de X-gal (ver apartado 13 de "Materiales y métodos") mediante el cual, comprobamos que la cepa CECT 4313<sup>t</sup> de *B. megaterium* poseía una  $\beta$ -galactosidasa

activa, que generó una intensa coloración azul de las colonias de este microorganismo.

Una vez comprobada la existencia de una  $\beta$ -galactosidasa activa, decidimos clonar el gen responsable de esta actividad. Para ello, se obtuvo ADN genómico de la cepa CECT 4313<sup>t</sup> (ver apartado 7.1 de "Materiales y métodos"), a partir de un cultivo crecido en Nutrient Broth, durante 16 h, a 28°C y en agitación (250 rpm). Este ADN genómico se utilizó como molde en una reacción de amplificación mediante PCR con la ADN polimerasa de alta fidelidad AFH2 (Clontech, EE.UU.). Los cebadores empleados (BGBM-D y BGBM-R) fueron diseñados a partir de la secuencia del gen *mbgA* depositada en la base de datos del EMBL (nº de acceso: AF047824).



**Figura 3.1.** Esquema del plásmido pBME.

El producto de la PCR fue un fragmento de ADN del tamaño esperado (3 105 pb). Este fragmento se clonó en el vector pBSK (+) generándose el plásmido pBME (Fig. 3.1).

### **1.1.2. Clonación del gen *lacA* de *Bacillus subtilis***

La segunda enzima que decidimos producir para ensayar su capacidad de síntesis de GOS fue la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus subtilis* codificada por el gen *lacA*. En este caso, nuestra decisión se sustentó en dos factores; este microorganismo es considerado seguro para la alimentación humana (status GRAS) y el producto del gen *lacA* pertenece a una familia de enzimas con estructura tridimensional conocida, en la que se han determinado los aminoácidos que conforman el centro activo. Esta información podría ser de gran utilidad en el diseño de mutaciones y en el análisis del efecto que dichas mutaciones podrían ejercer en la actividad enzimática.

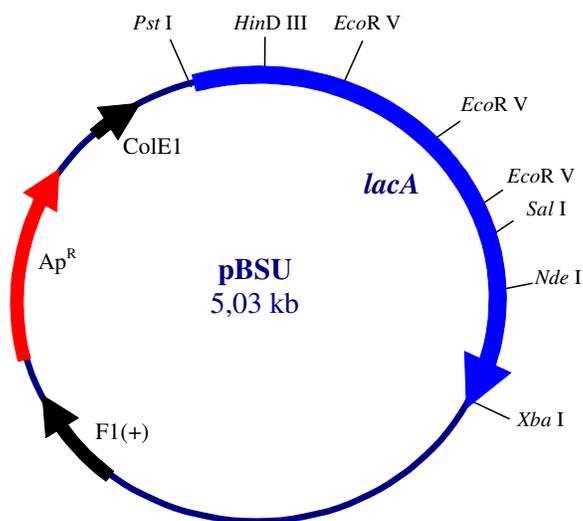
Como en el caso de la clonación del gen de *B. megaterium*, realizamos un estudio preliminar en medio sólido (Nutrient Agar Broth) en presencia de X-gal, mediante el cual comprobamos que la cepa CECT 356 de *B. subtilis* presentaba actividad  $\beta$ -galactosidasa reflejada en una ligera coloración azul de las colonias de este microorganismo.

Tal como se hizo con el gen *mbgA* de *B. megaterium*, para la clonación del gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *B. subtilis* (*lacA*), el primer paso fue la obtención de ADN genómico para ser utilizado como molde en posteriores reacciones de PCR. Se obtuvo ADN genómico (ver apartado 7.1 de "Materiales y métodos") de la cepa

CECT 356, a partir de un cultivo crecido en Nutrient Broth, durante 16 h, a 28°C y en agitación (250 rpm).

Este ADN genómico y los cebadores específicos BGBSU-2 y BGBSU-R, diseñados tomando como referencia la secuencia depositada en la base de datos del NCBI (nº de acceso: NC\_000964), se emplearon en una reacción de amplificación mediante PCR usando la ADN polimerasa *Pfu* (Stratagene, La Jolla, EE.UU.).

El resultado de la reacción de amplificación fue un fragmento de ADN del tamaño esperado (2 061 pb). Este fragmento se clonó en el vector pBSK (+) dando lugar al plásmido pBSU (Fig. 3.2)



**Figura 3.2.** Esquema del plásmido pBSU.

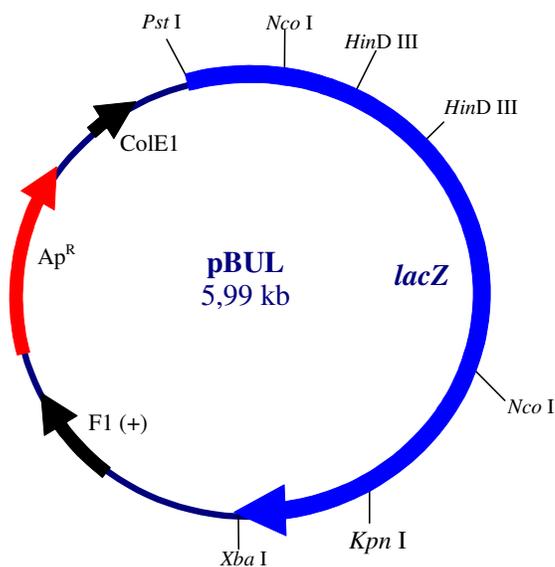
### **1.1.3. Clonación del gen *lacZ* de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus***

La tercera enzima que decidimos producir fue la  $\beta$ -galactosidasa de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, codificada por el gen *lacZ*. La elección de este microorganismo como fuente de una  $\beta$ -galactosidasa se debió principalmente a que esta bacteria ha sido utilizada tradicionalmente para la obtención de productos fermentados de leche, por lo que es clasificado como microorganismo seguro para alimentación (status GRAS).

La estrategia seguida para clonar el gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *L. d. bulgaricus* (*lacZ*) fue, de nuevo, su amplificación por PCR a partir de ADN genómico. Se obtuvo biomasa de la cepa CECT 4005<sup>T</sup>, a partir de un cultivo crecido en MRS Broth, durante 16 h, a 37°C en anaerobiosis; y esta biomasa se empleó para la purificación de ADN genómico (ver apartado 7.1 de "Materiales y métodos").

Una vez obtenido ADN genómico, se realizó una reacción de amplificación mediante PCR, utilizando la ADN polimerasa AHF2 (Clontech, Palo Alto, EE.UU) y cebadores específicos (BGLB-D y BGLB-R), diseñados a partir de la secuencia depositada en la base de datos del NCBI (nº de acceso: M55068).

De nuevo, el producto de la PCR consistió en un fragmento de ADN del tamaño esperado (3 027 pb), que fue clonado en el vector pBSK (+). El plásmido construido se denominó pBUL (Fig. 3.3).



**Figura 3.3.** Esquema del plásmido pBUL.

## 1.2. Secuenciación de los genes clonados

Con objeto de confirmar la identidad de los fragmentos de ADN clonados en los plásmidos pBME, pBSU y pBUL, decidimos secuenciar los insertos de dichos plásmidos. Este análisis nos permitiría también comprobar la inexistencia de mutaciones, insertadas por las ADN polimerasas en las reacciones de amplificación, en las secuencias de los fragmentos clonados.

### 1.2.1. Secuenciación del gen *mbgA*

Para la secuenciación del inserto del plásmido pBME se seleccionaron dos clones y se utilizaron los oligonucleótidos T7 y T3 del vector y tres oligonucleótidos internos.

Las secuencias obtenidas a partir de estos clones se analizaron informáticamente, comprobando que inserto del plásmido pBME estaba formado por una secuencia de 3 105 pb, con una alta identidad con los genes descritos de la  $\beta$ -galactosidasa de *B. megaterium*, 100% de nucleótidos idénticos con la secuencia AF047824 y 98% de nucleótidos idénticos con la secuencia AJ000733, ambas depositadas en la base de datos del EMBL. Por lo tanto, además de confirmar que la secuencia clonada en el plásmido pBME correspondía al gen *mbgA* de *Bacillus megaterium*, pudimos asumir que este gen debía ser funcional ya que no existía ninguna mutación en su secuencia con respecto a la secuencia con n° de acceso AF047824 de la base de datos del EMBL (Fig. 3.4).

```

MbgA (pBME) (=AF047824) .....MLKTGKKFHYTA
MbgA (AJ000733) .....MLKTGKKFHYTA

PANGYPEWNNNPEIFQLNRSKAHALLMPYQTVVEEALKNDRKSSVYYQSLNGSWYFHFAE
PANGYPEWNNNPEIFQLNRSKAHALLMPYQTVVEEALKNDRKSSVYYQSLNGSWYFHFAE

NADGRVKNFFAPEFSYKKWDSISVPSHWQLQGYDYPQYTNVTYPWVENENLEPPFAPTK
NADGRVKNFFAPEFSYEKWDSISVPSHWQLQGYDYPQYTNVTYPWVENEELEPPFAPTK

YNLSVSTSVLLHLNQNGKISPCTSASKGVESAFYVWINGEFVGYSEDSFTPAEFDITSY
YNPVGQYVRTFTPKSEWKDQPVYISFQGVESAFYVWINGEFVGYSEDSFTPAEFDITSY

LQEGENTIAVEVYRWSASWLEDQDFWRMSGIFRDVYLYSTPQVHIYDFSVRSSLDNNY
LQEGENTIAVEVYRWSASWLEDQDFWRMSGIFRDVYLYSTPQVHIYDFSVRSSLDNNY

EDGELSVSADILGCFEHDTQDLTFEVMLYDANGQEVLRRPLQTNLSVSDQRTVSLRTHI
EDGELSVSADILNYFEHDTQDLTFEVMLYDANAQEVLRAPLQTNLSVSDQRTVSLRTHI

KSPAKWSAESPPLYTLVLSLKNAAGSIIETESCKVGFRTFELLKNGLMTINGKRIVLRGV
KSPAKWSAESPPLYTLVLSLKNAAGSIIETESCKVGFRTFELLKNGLMTINGKRIVLRGV

NRHEFDSVKGRAGITREDMIHDILLMKQHNIKPVRTSHYPNDSVWYELCNEYGLYVIDE
NRHEFDSVKGRAGITREDMIHDILLMKQHNINAVRTSHYPNDSVWYELCNEYGLYVIDE

TNLETHGTWTYLQEGEQKAVPGSKPEWKENVLDRCRSMYERDKNHPSII IWSLGNESFG
    
```

TNLETHGTWTYLQEGEQKAVPGSKPEWKENVLDRCRSMYERDKNHPSII IWSLGNESFG
GENFQHMYYTFEKEKDSTRLVHYEGIFHHRDYDASDIESTMYVKPADVERYALMNPKKPY
GENFQHMYYTFEKEKDSTRLVHYEGIFHHRDYDASDIESTMYVKPADVERYALMNPKKPY
ILCEYSHAMGNSCGNLYKYWELFDQYPIIQGGFIWDWKDQALQATAEDGTSYLAYGGDF
ILCEYSHAMGNSCGNLYKYWELFDQYPIIQGGFIWDWKDQALQATAEDGTSYLAYGGDF
FGDTPNDGNFCGNLIFADGTASPKIAEVKCYQPVKWTAVD <b>AT</b> KGKFAVQNKHLFTNL
FGDTPNDGNFCGNLIFADGTASPKIAEVKCYQPVKWTAVD <b>PA</b> KGKFAVQNKHLFTNL
NAYDFVWTVEKNGELVEKHASLLNVAPDGTDELTLSPLYEQENE <b>A</b> DEFVLTLSRLSK
NAYDFVWTVEKNGELVEKHASLLNVAPDGTDELTLSPLYEQENE <b>T</b> DEFVLTLSRLSK
DTAWASAGYEVAYEQFVLPAAKAMP SVKAAHPALTV <b>N</b> QNEQTLTVTGTNF TAFDKRKG
DTAWASAGYEVAYEQFVLPAAKAMP SVKAAHPALTV <b>D</b> QNEQTLTVTGTNF TAFDKRKG
QFISYNYERTELLASGFRPNFWRAVTDNDLGNKLHERCQ TWRQASLEQHVKKV <b>I</b> VQPQV
QFISYNYERTELLASGFRPNFWRAVTDNDLGNKLHERCQ TWRQASLEQHVKKV <b>T</b> VQPQV
DFVII SVELALDNSLASCYVYTYTLYNDG <b>K</b> MKIEQSLAPSETMPEIPEIGMLFTMNAAFD
DFVII SVELALDNSLASCYVYTYTLYNDG <b>E</b> MKIEQSLAPSETMPEIPEIGMLFTMNAAFD
FDSLTYWYGRPHENYWRKTGAKLALHKGSVKEQVTPYLRPQECGKTDVRWATITNDQ
FDSLTYWYGRPHENYWRKTGAKLALHKGSVKEQVTPYLRPQECGKTDVRWATITNDQ
GRGFLIKGLPTVELNALPYSFPELEAYDHFYKLPASDSVTVRVNYKQMGVGGDDSWQAK
GRGFLIKGLPTVELNALPYSFPELEAYDHFYKLPASDSVTVRVNYKQMGVGGDDSWQAK
THP <b>D</b> YTTYANRSYTNFTLKPL
THP <b>N</b> YTTYANRSYTNFTLKPL

**Figura 3.4.** Comparación de la secuencia aminoacídica deducida a partir del gen *mbgA* clonado, que es idéntica a la depositada con el n° de acceso AF0477824 de EMBL, con la depositada con el n° de acceso AJ000733 de EMBL. Los aminoácidos que diferencian a ambas secuencias han sido destacados con sombreado.

Según la secuencia nucleotídica obtenida, el gen clonado en el plásmido pBME codificaría una proteína de 1 034 aminoácidos, con una masa molecular deducida de 118 232 Da.

### 1.2.2. Secuenciación del gen *lacA*

Para comprobar la identidad del fragmento de ADN clonado en el plásmido pBSU, se secuenció el inserto de dos clones de esta construcción utilizando los oligonucleótidos T7 y T3 del vector, y dos oligonucleótidos internos.

El análisis de las secuencias obtenidas a partir de estos dos clones reveló que el inserto del plásmido generado estaba compuesto por 2 061 pb y tenía una alta similitud con la secuencia del gen *lacA* depositada en la base de datos (94% de nucleótidos idénticos con la secuencia NC\_000964 del NCBI). De igual forma, el fragmento de ADN clonado también presentó una alta similitud con la secuencia de genes de  $\beta$ -galactosidasas de otros microorganismos del género *Bacillus*: el gen *lacA2* de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (80%) y el gen *lacA* de *Bacillus halodurans* C-125 (78%).

Según la secuencia obtenida, el gen clonado codificaría para una proteína de 686 aminoácidos, con una masa molecular deducida de 79 021 Da. A pesar de las diferencias existentes entre la secuencia aminoacídica codificada por el gen clonado en el presente trabajo y la depositada en la base de datos del NCBI, no encontramos codones de fin en la secuencia del inserto del plásmido pBSU y el tipo de sustituciones eran conservativas por lo que esperamos que fuera una proteína funcional (Fig. 3.5).

<b>LacA clonado</b> .....	M	SKLEKTHVT	GAKFML
<b>LacA (NC_000964)</b> .....	M	MSKLEKTHVT	KAKFML
HGGDYNPDQWLDLDRPDILADDI	T	LMKLSHTNTF	SVGIFAWSALEPEEGVYQFEWLDDI
HGGDYNPDQWLDLDRPDILADDI	K	LMKLSHTNTF	SVGIFAWSALEPEEGVYQFEWLDDI

```

FERIHSIGGRVILATPSGARPAWLSQTYPEVLRVNASRVKQLHGGRHNHCLTSQVYR
FERIHSIGGRVILATPSGARPAWLSQTYPEVLRVNASRVKQLHGGRHNHCLTSKVYR

EKTRHINRLLAERYGNHPALLMWHISNEYGGECHCDLQCQHAFFREWLKSKYDNSLKAAL
EKTRHINRLLAERYGHHPALLMWHISNEYGGDCHCDLQCQHAFFREWLKSKYDNSLKTAL

NHAWWTPFWSHTFNDWSQIESPSPIGENGLHGLNLDWRRFVTDQTISFYENEI IPLN
NHAWWTPFWSHTFNDWSQIESPSPIGENGLHGLNLDWRRFVTDQTISFYENEI IPLK

ELTPDIPITTNFMADTPDLIPYQGLDYSKFAKHVDVISWDAYPVWHNDWESTADLAM
ELTPDIPITTNFMADTPDLIPYQGLDYSKFAKHVDAISWDAYPVWHNDWESTADLAM

KVGFINDLYRSLKQQPFLMECTPSAVNWHNVNKAKRPGMNLSSMQMIAHGSDSVL
KVGFINDLYRSLKQQPFLMECTPSAVNWHNVNKAKRPGMNLSSMQMIAHGSDSVL

YFQYRKSRSSEKLGAVVDHDNSPKNRVQEVAKTGETLERLSEVVGTKRPAETAI
YFQYRKSRSSEKLGAVVDHDNSPKNRVQEVAKVGETLERLSEVVGTKRPAQTAI

LYDWENHWALEDAQGFAKATKRYAQTLLQQHRYTFWEHDIPVDVITKEQDFSPYKLLI
LYDWENHWALEDAQGFAKATKRYPQTLLQQHRYTFWEHDIPVDVITKEQDFSPYKLLI

VPMPLYLISEDTSRLKFTTANGGALVMTYISGIVNEHDLYTGGWHPDLQAIFGIEP
VPMPLYLISEDTVSRLKAFADGGTLVMTYISGVVNEHDLYTGGWHPDLQAIFGVEP

LETDTLYPKDRNAVSYRSQTYEMKDYATVIDVKTASAEAVYQEDFYARTPAVTSHQY
LETDTLYPKDRNAVSYRSQTYEMKDYATVIDVKTASVEAVYQEDFYARTPAVTSHEY

QQGKAYFIGARLKQDFHRDFYEGLI TDLSLSPVFPVRHGKGVSVQARQDQDNDYIFV
QQGKAYFIGARLEQDFQORDFYEGLI TDLSLSPVFPVRHGKGVSVQARQDQDNDYIFV

MNFTEEKQLVTFDHSVKDMMTGDILSGDLTLEKYEVRIVVNTH
MNFTEEKQLVTFDQSVKDI MTGDILSGDLTMEKYEVRIVVNTH
    
```

**Figura 3.5.** Comparación de la secuencia aminoacídica deducida a partir de la secuencia del gen *lacA* clonado en el plásmido pBSU con la depositada con el n° de acceso NC\_000964 de NCBI. Los aminoácidos que diferencian a ambas secuencias han sido destacados con sombreado.

### 1.2.3. Secuenciación del gen *lacZ*

Como en los casos anteriores, seleccionamos dos clones del plásmido pBUL para secuenciar, a partir de los oligonucleótidos T7 y T3 del vector y tres oligonucleótidos internos, el fragmento de ADN clonado.

Los datos obtenidos a partir de las reacciones de secuenciación se analizaron informáticamente, comprobando que el inserto del plásmido generado estaba compuesto por 3 027 pb y su secuencia nucleotídica era idéntica a la secuencia del gen *lacZ* depositado en la base de datos del NCBI (nº de acceso: M55068).

Según la secuencia obtenida, el gen clonado codificaría una proteína de 1 008 aminoácidos, con una masa molecular deducida de 114 190,5 Da. Dado que esta proteína sería idéntica a la descrita en la base de datos, esperamos que el producto del gen *lacZ* clonado en el vector pBUL fuese una  $\beta$ -galactosidasa funcional.

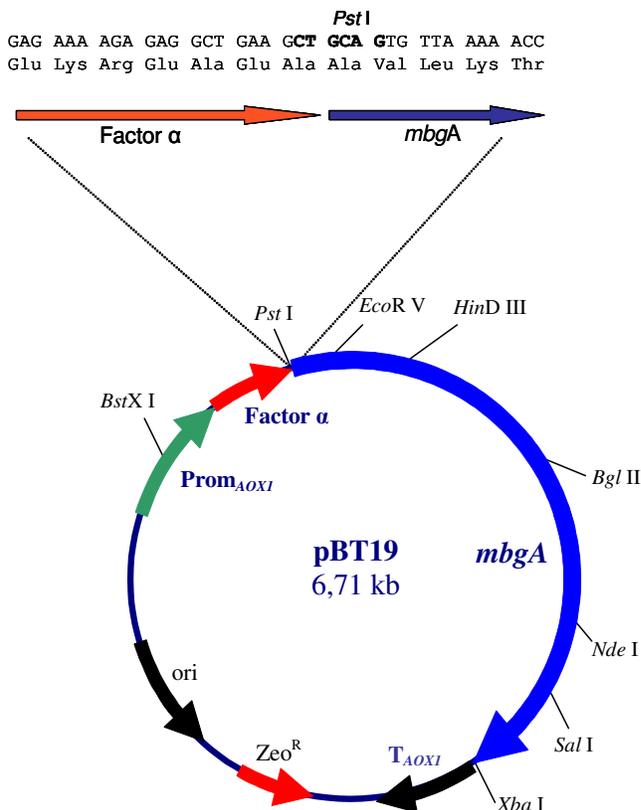
<b>LacZ (pBUL)</b> . . . . .	MSNKLVKEKRVDQADL
<b>LacZ (M55068)</b> . . . . .	MSNKLVKEKRVDQADL
AWLTDPEVYEVNTIPPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGDWLDIDYAENGQGPVNFY	
AWLTDPEVYEVNTIPPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGDWLDIDYAENGQGPVNFY	
AEDFDDSNFKSVKVPGNLELQGFQGPQYVNVQYPWDGSEEIFPPQIPSKNPLASYVRYF	
AEDFDDSNFKSVKVPGNLELQGFQGPQYVNVQYPWDGSEEIFPPQIPSKNPLASYVRYF	
DLDEAFWDKEVSLKFDGAATAIYVWLNHGFVGYGEDSFTPSEFMVTKFLKKENRLAVA	
DLDEAFWDKEVSLKFDGAATAIYVWLNHGFVGYGEDSFTPSEFMVTKFLKKENRLAVA	
LYKYSSASWLEDQDFWRMSGLFRSVTLQAKPRLHLEDLKLTAASLTDNYQKKGLEVEANI	
LYKYSSASWLEDQDFWRMSGLFRSVTLQAKPRLHLEDLKLTAASLTDNYQKKGLEVEANI	
AYRLPNASFKLEVRDSEGLVAEKLGP IRSEQLEFTLADLPVAAWSAEKPNLYQVRLYL	
AYRLPNASFKLEVRDSEGLVAEKLGP IRSEQLEFTLADLPVAAWSAEKPNLYQVRLYL	
YQAGSLLEVSRQEVGFRNFELKDGIMYLNQQRIVFKGANRHEFDSKLGRAITEEDMIWD	
YQAGSLLEVSRQEVGFRNFELKDGIMYLNQQRIVFKGANRHEFDSKLGRAITEEDMIWD	
IKTMKRSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDEANLESHGTWEKVGGHEDPSFNV	
IKTMKRSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDEANLESHGTWEKVGGHEDPSFNV	
PGDDQHWLGASLSRVKNMMARDKNHASILIWSLGNESYAGTVFAQMADYVRKADPTRVQ	
PGDDQHWLGASLSRVKNMMARDKNHASILIWSLGNESYAGTVFAQMADYVRKADPTRVQ	
HYEGVTHNRKFDATQIESRMYAPAKVIEEYLTNKPAPKPFISVEYAHAMGNSVGDLAAY	

```
HYEGVTHNRKFDDATQIESRMYAPAKVIEEYLTKPAKPFISVEYAHAMGNSVGDLAAY
TALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLLYGGDFDDRPTDYEF CGNGLVFADRTE SPKL
TALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLLYGGDFDDRPTDYEF CGNGLVFADRTE SPKL
ANVKALYANLKLEVKDGQLFLKNDNLF TNSSSYYFLTSLLV D GKLTYSRPLTFGLEPG
ANVKALYANLKLEVKDGQLFLKNDNLF TNSSSYYFLTSLLV D GKLTYSRPLTFGLEPG
ESGTFALPWPEVADEKGEVVYRVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAE EVAQKLPEFKPEGRP
ESGTFALPWPEVADEKGEVVYRVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAE EVAQKLPEFKPEGRP
DLVDSY NLGLKGNFQILFSKVKGWVSLKYAGREY LKRLPEFTFWRALTDNDRGAGY
DLVDSY NLGLKGNFQILFSKVKGWVSLKYAGREY LKRLPEFTFWRALTDNDRGAGY
GYDLARWENAGKYARLKD ISCEVKEDSVLVKTAFTLPVALKGD LTVTYEVDGRGKI AVT
GYDLARWENAGKYARLKD ISCEVKEDSVLVKTAFTLPVALKGD LTVTYEVDGRGKI AVT
ADFPGAEEAGLLPAFGLNLALPKELTDYRYYGLGNESYPDRFEGNYLGIYQGAVKKNF
ADFPGAEEAGLLPAFGLNLALPKELTDYRYYGLGNESYPDRLEGN YLGIYQGAVKKNF
SPYLRPQETGNRSKVRWYQLFDEKGGLEFTANGADLNLSALPYSAAQIEAADHAFELTN
SPYLRPQETGNRSKVRWYQLFDEKGGLEFTANGADLNLSALPYSAAQIEAADHAFELTN
NYTWVRALSAQMVGVDGDSWGQKVHPEFCLDAQKARQLRLVIQPLLLK
NYTWVRALSAQMVGVDGDSWGQKVHPEFCLDAQKARQLRLVIQPLLLK
```

**Figura 3.6.** Comparación de la secuencia aminoacídica deducida del gen *lacZ* clonado en el plásmido pBUL, que es idéntica a la depositada con el n° de acceso M55068 de NCBI.

### 1.3. Construcción de los plásmidos de expresión en *Pichia pastoris*

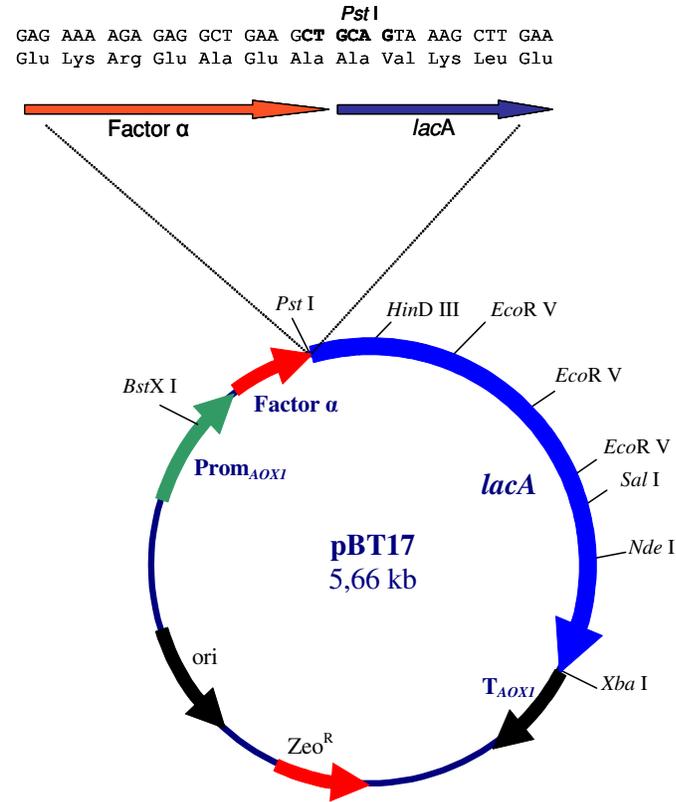
Una vez cumplido nuestro primer objetivo, clonar genes de  $\beta$ -galactosidasas, el siguiente paso en nuestro plan de trabajo era obtener un método de producción de estas enzimas utilizando un sistema de expresión que cumpliera dos requisitos principales: alto rendimiento y facilidad de purificación de la proteína expresada. Por las características que se han descrito en “Materiales y métodos” (ver apartado 9.2), *Pichia pastoris* es un hospedador para expresión heteróloga de proteínas que se adaptaba a



**Figura 3.7.** Plásmido pBT19 diseñado para la expresión del gen *mbgA* en *Pichia pastoris*. Se muestra ampliada la zona de la fusión entre el péptido señal del factor  $\alpha$  y el gen *mbgA*.

nuestros requerimientos. Es un sistema bien caracterizado que generalmente permite un alto rendimiento de expresión y que, gracias a la posibilidad de dirigir la producción de la proteína de interés al medio extracelular, facilita la purificación de dicha proteína. Para utilizar *P. pastoris* como hospedador en los experimentos de expresión de los genes de  $\beta$ -galactosidasas

clonados, en primer lugar, tuvimos que construir plásmidos de expresión adecuados.

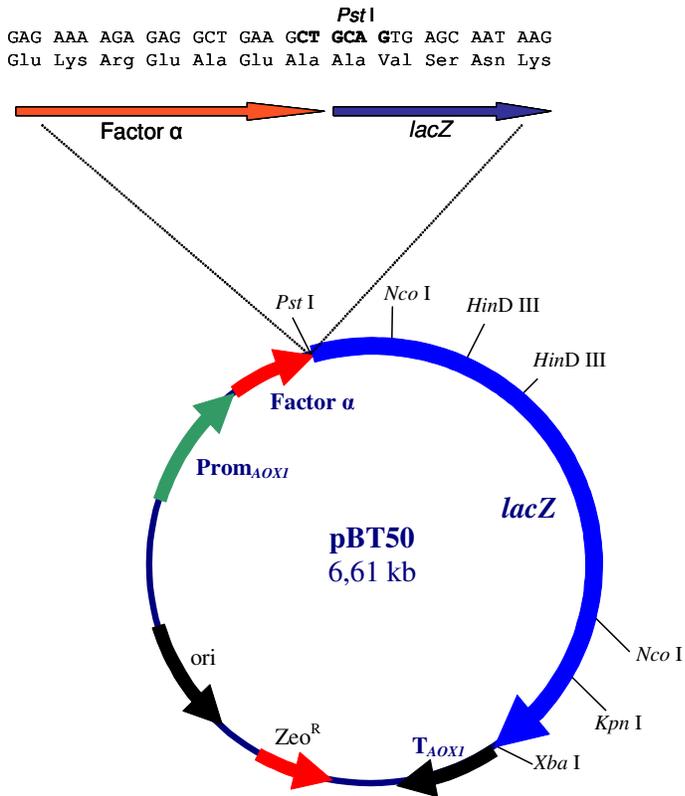


**Figura 3.8.** Plásmido pBT17 construido para la expresión en *Pichia pastoris* del gen *lacA*. Se muestra más detalladamente la zona de la fusión entre el factor  $\alpha$  y el gen *lacA*.

Para ello, seleccionamos el plásmido comercial pPICZaB (ver “Materiales y métodos”). Este plásmido posee el promotor  $P_{AOX1}$  fusionado al péptido señal del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces*

*cerevisiae*, lo que dirige la proteína fusionada a esta secuencia al medio extracelular.

A continuación existe una secuencia policonectora con varias dianas para enzimas de restricción y para completar el "cassette"



**Figura 3.9.** Plásmido pBT50, construido para la expresión en *Pichia pastoris* del gen *lacZ*. También se muestra la zona de la fusión entre el factor  $\alpha$  y el gen *lacZ*.

de expresión, el terminador de la transcripción  $T_{AOX1}$ .

Utilizamos los sitios de corte *Pst* I/*Xba* I del policonector mencionado para introducir fragmentos *Pst* I/*Xba* I aislados de los plásmidos pBME, pBSU y pBUL.

De esta forma obtuvimos tres vectores de expresión en *P. pastoris* que presentaban una fusión traduccional entre el factor  $\alpha$  y el gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus megaterium* (pBT19, fig. 3.7), *B. subtilis* (pBT17, fig. 3.8) y *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* (pBT50, fig. 3.9).

Posteriormente, se realizó una selección de transformantes por resistencia a zeocina. Obtuvimos entre 50 y 100 colonias resistentes a zeocina en cada una de las transformaciones, colonias que fueron sembradas de nuevo en medio selectivo con zeocina para descartar la existencia de falsos transformantes.

#### **1.4. Expresión de los genes de las $\beta$ -galactosidasas en *Pichia pastoris***

Para establecer las condiciones de incubación de los transformantes obtenidos, se realizó un ensayo de expresión preliminar (ver apartado 9.2 de "Materiales y métodos") con un clon seleccionado al azar de cada grupo de transformantes: tBT19, tBT17 y tBT50; portando los plásmidos pBT19, pBT17 y pBT50 respectivamente. Estos tres transformantes, junto a la cepa control X-33, se cultivaron en 25 ml de medio BMMY hasta alcanzar una  $DO_{600} = 2$ . En este punto, se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en medio de inducción de la expresión (BMMY), con una concentración de metanol del 0,5% (v/v) en el medio de cultivo, y se tomaron muestras de 1 ml de cada uno de los cultivos. Estas muestras se utilizaron para valorar la actividad  $\beta$ -galactosidasa (ver apartado 13 de "Materiales y métodos") presente en los sobrenadantes de los cultivos de los tres transformantes y en los distintos tiempos de inducción (0, 24, 48, 72 y 96 h). Mediante este ensayo, pudimos determinar que el máximo nivel de actividad  $\beta$ -galactosidasa se obtenía, en los tres transformantes, a las 72 h de incubación en condiciones de inducción (resultados no mostrados).

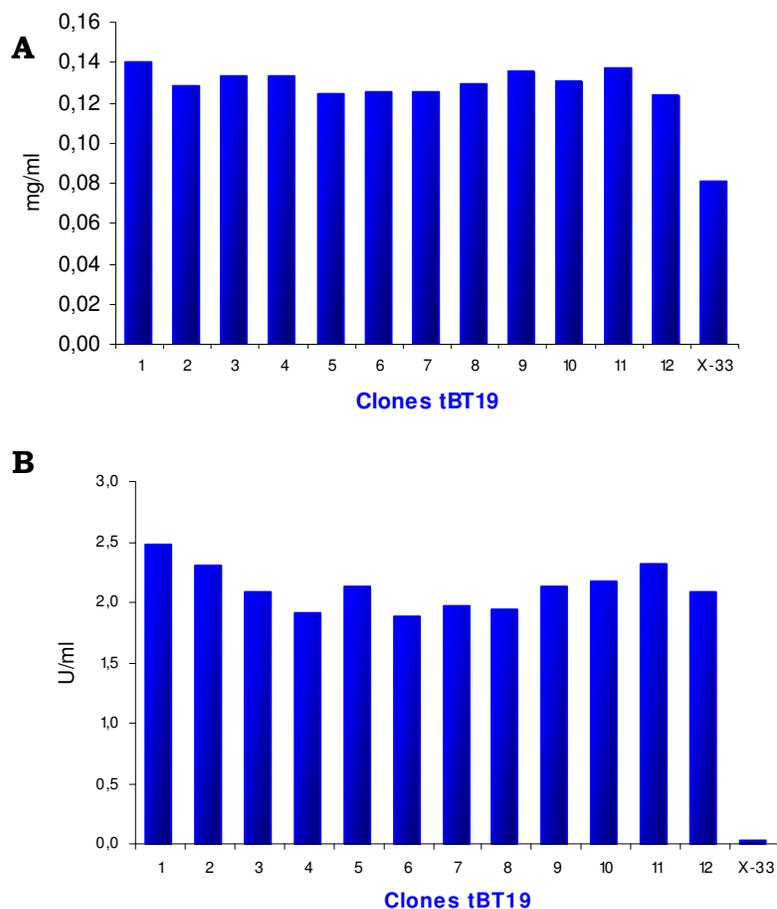
Una vez conocido el tiempo de inducción adecuado para nuestros estudios, se realizó un ensayo de expresión en las mismas condiciones descritas para el ensayo preliminar. En esta ocasión se seleccionaron varios transformantes al azar de cada uno de los grupos: 12 transformantes portadores del gen *mbgA* de *B. megaterium* (tBT19-1 a 12), 28 transformantes portadores del gen *lacA* de *B. subtilis* (tBT17-1 a 28) y 10 transformantes portadores

del gen *lacZ* de *L. d. bulgaricus* (tBT50-1 a 10). Una vez transcurridas 72 h de fermentación en condiciones de inducción de la expresión, con una concentración de metanol del 0,5% (v/v), se obtuvieron muestras de sobrenadantes y células de cada uno de los cultivos.

Para comprobar el nivel de expresión de los genes de  $\beta$ -galactosidasas de los distintos transformantes, en primer lugar, determinamos la concentración de proteínas totales en las muestras de sobrenadantes, y a continuación, realizamos un ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa frente a oNPG (ver apartado 13 de "Materiales y métodos") con las mismas muestras de sobrenadantes mencionadas.

Tanto los resultados de concentración de proteínas extracelulares, como los valores de actividad enzimática, demostraron que los tres grupos de transformantes producían las enzimas de interés y en estado activo.

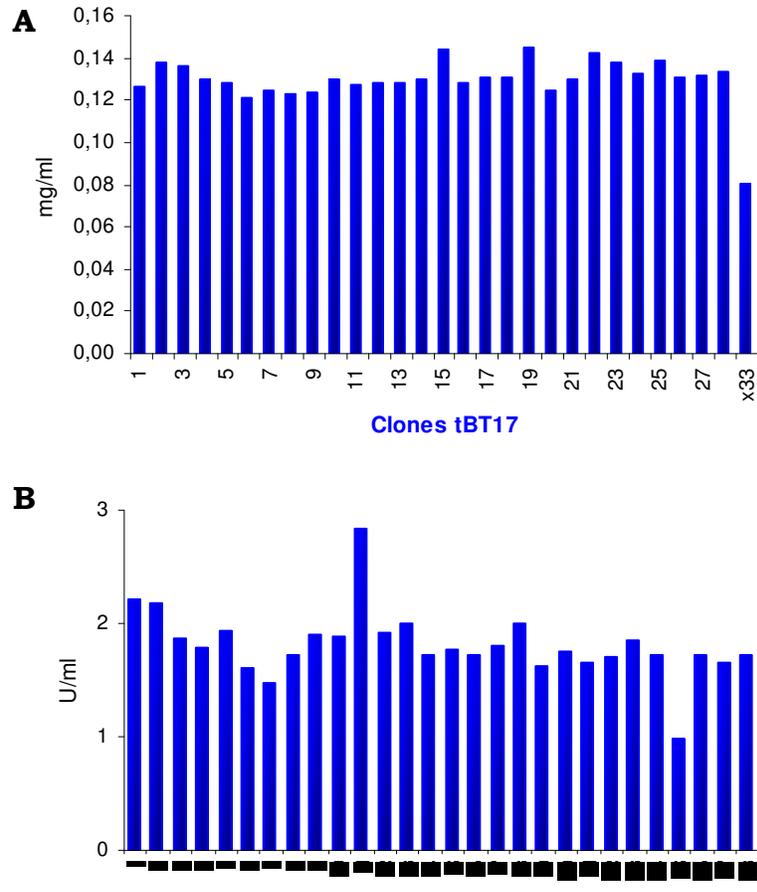
En el caso de los transformantes que expresaban la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *B. megaterium* (tBT19's), todos los clones mostraron una concentración extracelular de proteína similar, cercana a 0,130 mg/ml (Fig. 10A). Excluyendo las proteínas nativas de *P. pastoris* (dato extraído del control X-33), pudimos determinar que la  $\beta$ -galactosidasa codificada por el gen *mbgA* se producía en una concentración de 0,050 mg/ml, aproximadamente. Esta enzima demostró ser activa en todos los transformantes ensayados, observándose valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa situados entre 1,9 y 2,5 U/ml (Fig. 3.10B).



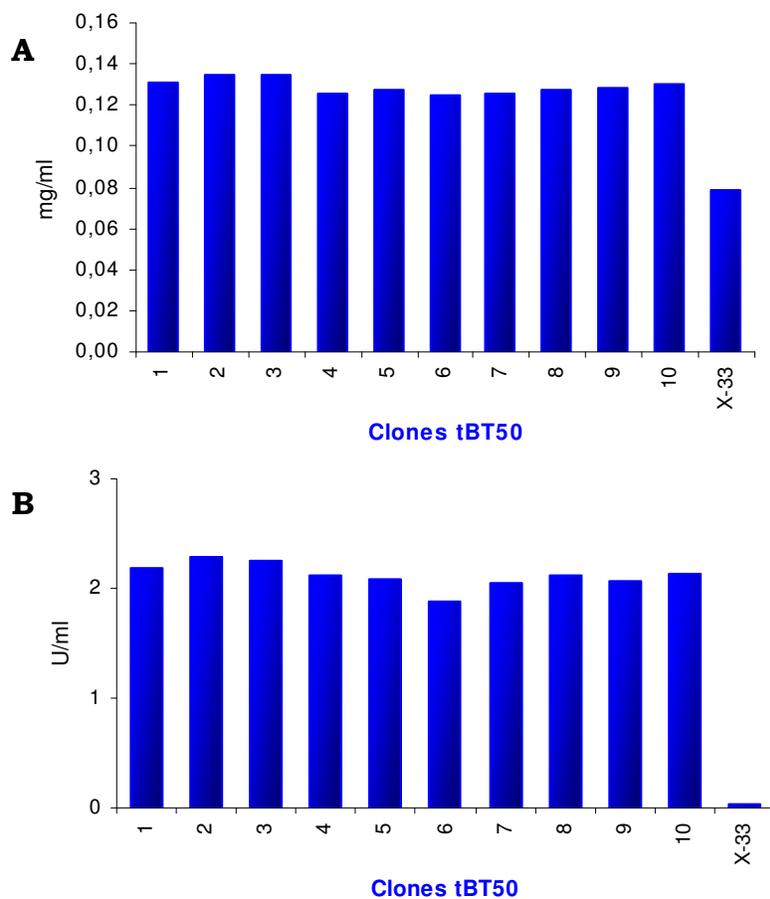
**Figura 3.10. A)** Concentración de proteína extracelular (mg/ml) producida por los transformantes tBT19. **B)** Actividad  $\beta$ -galactosidasa (U/ml) presente en el sobrenadante de los transformantes tBT19.

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados con las muestras de sobrenadantes de los transformantes tBT17 (portadores del gen *lacA* de *B. subtilis*), fueron similares a los descritos para los transformantes tBT19. Pudimos determinar valores de concentración de proteína asociados al producto del gen

*lacA* en torno a 0,050 mg/ml, sin diferencias significativas entre los distintos transformantes (Fig. 3.11A).



**Figura 3.11. A)** Concentración de proteínas extracelulares (mg/ml) producida por los transformantes tBT17. **B)** Actividad  $\beta$ -galactosidasa (U/ml) presente en el sobrenadante de los transformantes tBT17.



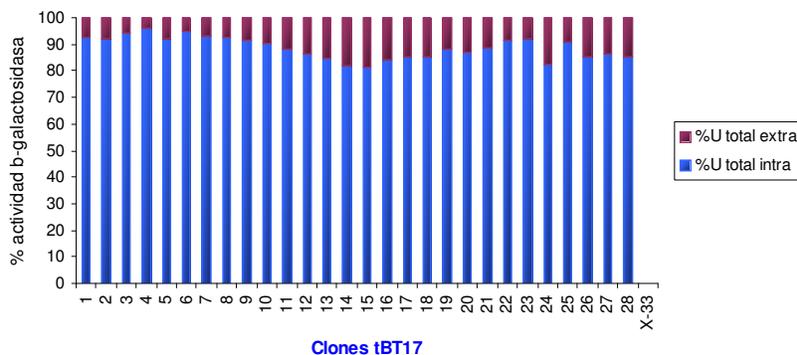
**Figura 3.12. A)** Concentración de proteínas extracelulares (mg/ml) producidas por los clones tBT50. **B)** Actividad  $\beta$ -galactosidasa (U/ml) presente en el sobrenadante de los transformantes tBT50.

La  $\beta$ -galactosidasa producida en estos transformantes también demostró ser activa en todos ellos. Los valores de actividad enzimática oscilaron entre 1,5 y 2,2 U/ml (Fig. 3.11B); excepto en dos transformantes en los que los resultados se situaron por encima de la media (3 U/ml en el transformante tBT17-11) y por debajo de la misma (1 U/ml en el transformante tBT17-25).

El tercer grupo de transformantes estudiados (tBT50), que portaban el gen *lacZ* de *L. d. bulgaricus*, mostraron de nuevo resultados similares a los otros dos grupos. La concentración de proteína extracelular asociada a la  $\beta$ -galactosidasa expresada en este caso fue cercana a 0,050 mg/ml en todos los clones (Fig. 3.12A). Los datos de actividad enzimática se situaron entre 2 y 2,2 U/ml, también sin revelar diferencias significativas entre los distintos transformantes ensayados (Fig 3.12B).

Los resultados obtenidos con todos los transformantes estudiados demostraban que *P. pastoris* era un organismo adecuado para la producción de las  $\beta$ -galactosidasas microbianas objeto de estudio. Sin embargo, aunque en todos los casos obtuvimos enzimas activas en el medio extracelular, los valores de actividad por ml de medio y de concentración de proteínas fueron más bajos de los que esperábamos.

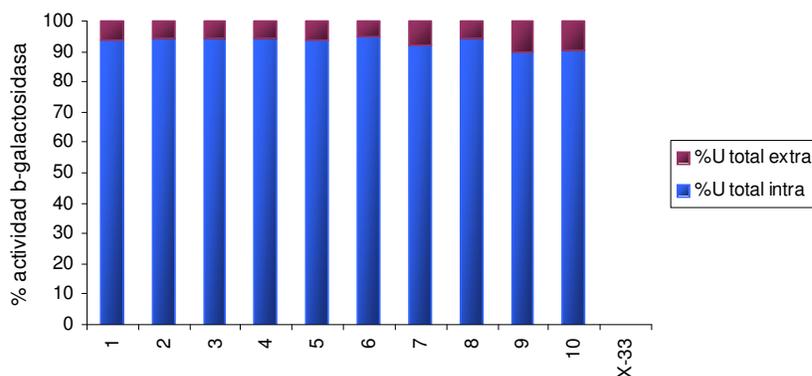
Un hecho que podría explicar los bajos valores de expresión podría ser una ineficiente secreción de las enzimas sintetizadas en los clones estudiados. Para comprobar esta posibilidad, obtuvimos extractos proteicos de las muestras de células de todos los transformantes cultivados en condiciones de expresión, y determinamos la actividad  $\beta$ -galactosidasa frente a oNPG utilizando alícuotas de estos extractos. Calculando la actividad enzimática total presente, tanto en las muestras de células como en los sobrenadantes de medio de cultivo, observamos que la mayor parte de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se encontraba, en todos los transformantes estudiados, en la fracción intracelular (Figs. 3.13, 3.14 y 3.15).



**Figura 3.13.** Distribución de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (% sobre el total) en las fracciones intra y extracelular de los transformantes tBT19.

Dado que *P. pastoris* carece de  $\beta$ -galactosidasa endógena, esta actividad enzimática detectada en los extractos celulares de todos los transformantes puede asociarse a las enzimas exógenas producidas.

Nuestros resultados revelaron que, en el mejor de los casos,



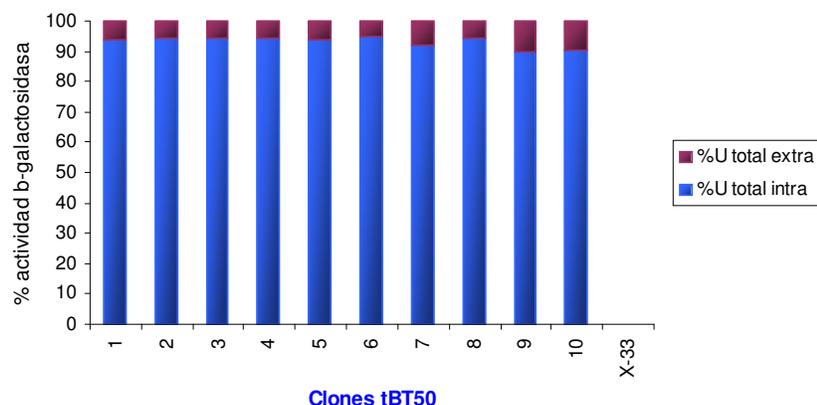
**Figura 3.14.** Distribución de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (% sobre el total) en las fracciones intra y extracelular de los transformantes tBT17.

sólo el 25% de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se encontraba en el

medio extracelular, por lo que asumimos que la baja producción de los tres enzimas de interés en *P. pastoris* se debía a una ineficiente secreción de los enzimas sintetizados en las levaduras hospedadoras.

Los bajos valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa, tanto extra- como intracelular, que determinamos en las muestras de los transformantes estudiados no nos permitirían realizar los estudios de síntesis de GOS que nos planteamos como uno de los objetivos de este trabajo. Además, debido a la localización intracelular de la mayor parte de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, la obtención del enzima para los estudios de síntesis de GOS implicaría utilizar procedimientos de rotura de células y, posiblemente, procesos de purificación posteriores.

Obligados a renunciar a uno de los requerimientos que



**Figura 3.15.** Distribución de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (% sobre el total) en las fracciones intra y extracelular de los transformantes tBT50.

establecimos para nuestro sistema de expresión, que facilitara la purificación posterior de los enzimas, decidimos utilizar un

organismo hospedador para expresión intracelular, pero de más fácil manejo y crecimiento más rápido que *P. pastoris*; en principio, que permitiera una expresión más eficiente de genes de origen procariota: *Escherichia coli*.

### **1.5. Obtención de la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3)<sup>w</sup>**

Como alternativa al sistema de expresión realizado en *Pichia pastoris*, elegimos el sistema inducible con IPTG, formado por los plásmidos pET (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) y como hospedador la cepa *E. coli* BL21(DE3) (ver "Materiales y métodos"). Sin embargo, este sistema nos planteó un problema: *E. coli* produce una  $\beta$ -galactosidasa propia codificada por el gen *lacZ* (3 075 pb).

Para solventar este inconveniente, decidimos inactivar dicho gen en la cepa *E. coli* BL21(DE3) mediante mutación y selección. Para ello, en nuestro laboratorio, se sometió esta cepa a una exposición a nitrosoguanidina en unas condiciones que indujeron entre un 95% y un 99% de mortalidad. Tras analizar la existencia de actividad  $\beta$ -galactosidasa, en medio sólido en presencia de X-gal (ver apartado 13 de "Materiales y métodos), en unas 2 000 colonias, se obtuvo un clon que carecía de la coloración azul propia de clones con  $\beta$ -galactosidasas activas (Adrio y Navas-Parejo, comunicación personal).

Para corroborar la inexistencia de una  $\beta$ -galactosidasa activa, realizamos un ensayo de actividad en medio líquido frente a oNPG (ver apartado 13 de "Materiales y métodos") mediante el cual no se detectó actividad  $\beta$ -galactosidasa en el clon aislado. Adicionalmente, se resolvió en un gel de poliacrilamida

desnaturalizante una muestra de un extracto celular del clon aislado, y pudimos comprobar que había desaparecido la banda correspondiente a la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*.

Por último, para caracterizar la o las mutaciones que habían provocado el cambio genotípico en el clon seleccionado, se amplificó su gen *lacZ* usando como molde ADN genómico y utilizando la ADN polimerasa *Pfu*. Los cebadores *lacZcoli-D* y *lacZcoli-R* fueron diseñados a partir de la secuencia depositada en la base de datos del NCBI (nº de acceso: NC000913) correspondiente a la cepa K-12 de la misma especie.

El fragmento resultado de la amplificación tenía un tamaño que se ajustaba al esperado (3 075 pb) y fue ligado al plásmido pZErO-2 (ver "Materiales y métodos"). Posteriormente, se secuenció el inserto de este vector y pudimos localizar una mutación en la posición 2 452 que generaba un codón de fin (TAG) en el lugar que correspondía al codón (CAG) del Gln 818, por lo que se formaría una proteína trunca de 93 108,7 Da e inactiva.

El clon obtenido, denominado *E. coli* BL21(DE3)*w*, carecía de una  $\beta$ -galactosidasa activa, por lo que se consideró un hospedador adecuado para los siguientes experimentos de expresión heteróloga de  $\beta$ -galactosidasa.

### **1.6. Construcción de los plásmidos de expresión para *E. coli* BL21(DE3)*w***

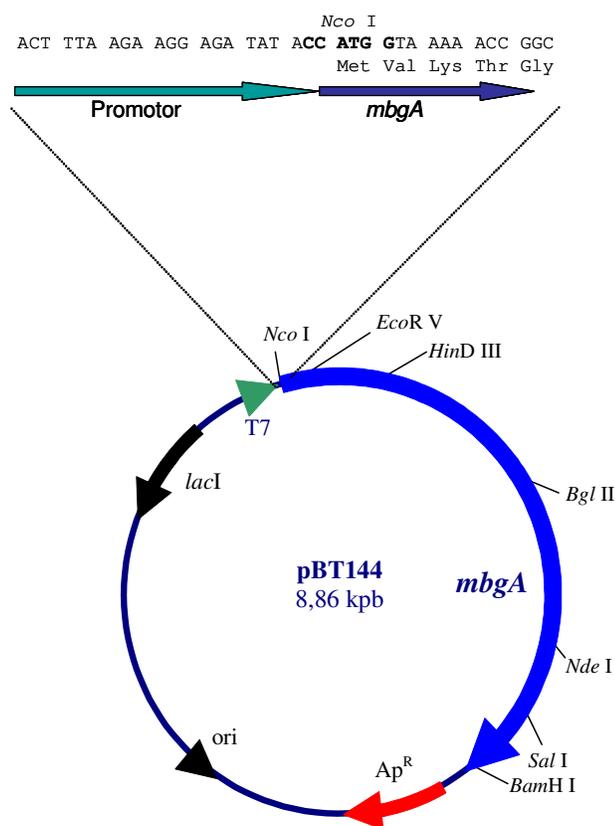
Una vez que disponíamos de una cepa hospedadora adecuada, el siguiente paso en nuestro plan de trabajo fue

construir los plásmidos de expresión en *E. coli* BL21(DE3)*w* que portaran los tres genes de  $\beta$ -galactosidasas clonados.

**1.6.1. Construcción del plásmido para la expresión del gen *mbgA* de *Bacillus megaterium* en *E. coli* BL21(DE3)*w***

Para realizar la expresión del gen *mbgA* de *B. megaterium* se escogió el plásmido pET11, el cual es un vector de expresión que contiene el promotor del gen *10* del bacteriófago T7, el cual promueve altos niveles de transcripción (ver apartado 2 de "Materiales y métodos"). Escogimos la versión pET11d (Fig. 2.2), con lugares de clonación *Nco* I/*Bam*H I, porque el gen *mbgA* posee una diana interna para la enzima de restricción *Nde* I, y esta diana es el lugar de clonación de las otras versiones de los plásmidos pET11d.

Para obtener el inserto, el gen *mbgA* fue amplificado por PCR usando la ADN polimerasa AHF2 (Clontech, EE.UU) con cebadores específicos (pBT19-*Nco*I-D y pBT19-*Bam*HI-R), y como molde el plásmido pBT19. Los cebadores contenían dianas específicas para las enzimas de restricción *Nco* I y *Bam*H I, de modo que tras ser digerido el producto de la PCR, y ser purificado, se ligó de forma dirigida al vector pET11d.

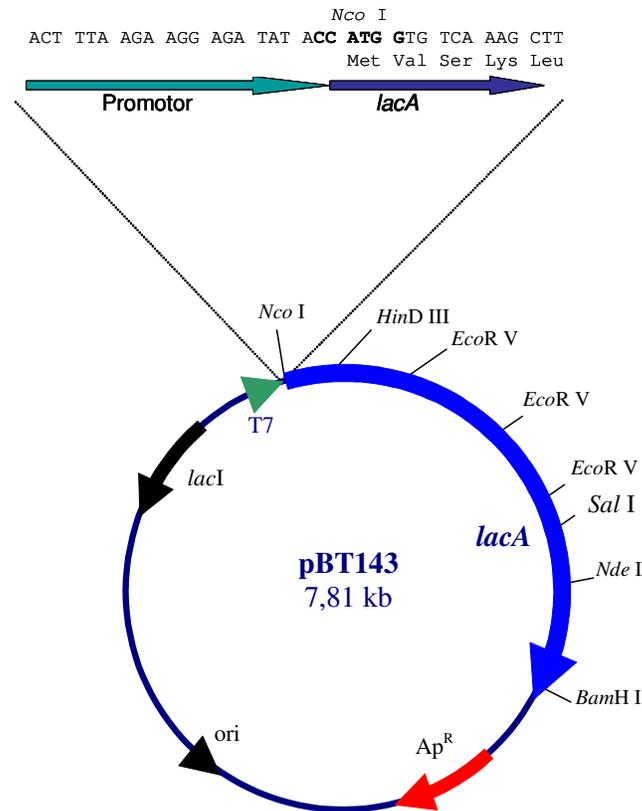


**Figura 3.16.** Plásmido pBT144 construido para la expresión en *E. coli* del gen *mbgA* de *B. megaterium*. Se muestra en detalle la región correspondiente a la fusión del gen *mbgA* al promotor del gen *10*.

La construcción obtenida se denominó pBT144 (Fig. 3.16). Se secuenció la región correspondiente al extremo 5' del gen *mbgA* a la fusión a partir del oligonucleótido T7 del vector y pudimos comprobar que la fusión entre el promotor del gen *10* y el gen *mbgA* era correcta (Fig. 3.16).

**1.6.2. Construcción del plásmido pBT143 para la expresión del gen *lacA* de *Bacillus subtilis* en *E. coli* BL21(DE3)*w***

De igual forma que en el caso anterior, escogimos el plásmido de expresión pET11d (Fig. 2.2), con lugares de clonación *Nco* I/*Bam*H I, ya que el gen *lacA* de *B. subtilis* también posee una diana para la enzima de restricción *Nde* I en su secuencia. Para



**Figura 3.17.** Plásmido pBT143 diseñado para la expresión en *E. coli* de la  $\beta$ -galactosidasa de *B. subtilis*. Se muestra la región de fusión del gen *lacA* y el promotor del gen *10*.

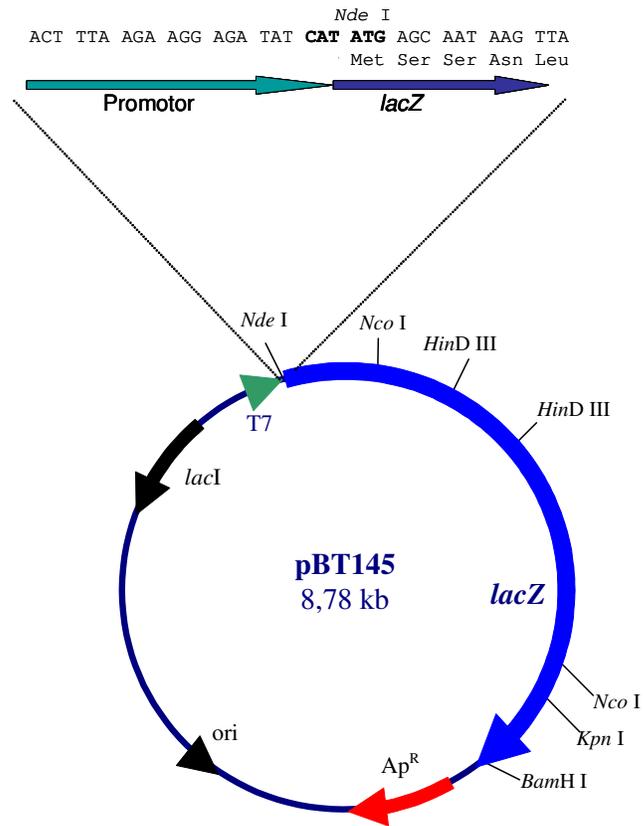
obtener el inserto, el gen *lacA* fue amplificado por PCR usando la ADN polimerasa AHF2 (Clontech, Palo Alto, EE.UU.) con cebadores específicos (pBT17-*Nco*I-D y pBT17-*Bam*HI-R), y como molde el plásmido pBT17. Los cebadores contenían dianas específicas para las enzimas de restricción *Nco* I y *Bam*H I, de modo que tras ser digerido el producto de la PCR, y ser purificado, se ligó de forma dirigida al vector pET11d.

La construcción obtenida se denominó pBT143 (Fig. 3.17). Pudimos comprobar que la fusión entre el promotor del gen *10* y el gen *lacA* era correcta tras secuenciar dicha región (Fig. 3.17).

### **1.6.3. Construcción del plásmido pBT145 para la expresión del gen *lacZ* de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* en *E. coli* BL21(DE3)*w***

En este último caso, utilizamos el plásmido pET11c, con lugares de clonación *Nde* I/*Bam*H I, ya que el gen *lacZ* posee dianas para la enzima de restricción *Nco* I en su secuencia. Para obtener el inserto, el gen *lacZ* fue amplificado por PCR usando la ADN polimerasa AHF2 (Clontech, Palo Alto, EE.UU.) con cebadores específicos (pBT50-*Nde*I-D y pBT50-*Bam*HI-R), y como molde el plásmido pBT50. Los cebadores contenían dianas específicas para las enzimas de restricción *Nde* I y *Bam*H I, de modo que tras ser digerido el producto de la PCR, y ser purificado, se ligó de forma dirigida al vector pET11c.

La construcción obtenida se denominó pBT145 (Fig. 3.18) y tras secuenciar, utilizando el oligonucleótido T7, pudimos comprobar que, al igual que en los casos anteriores, la fusión entre el promotor del gen *10* y el gen *lacZ* era correcta (Fig. 3.18).



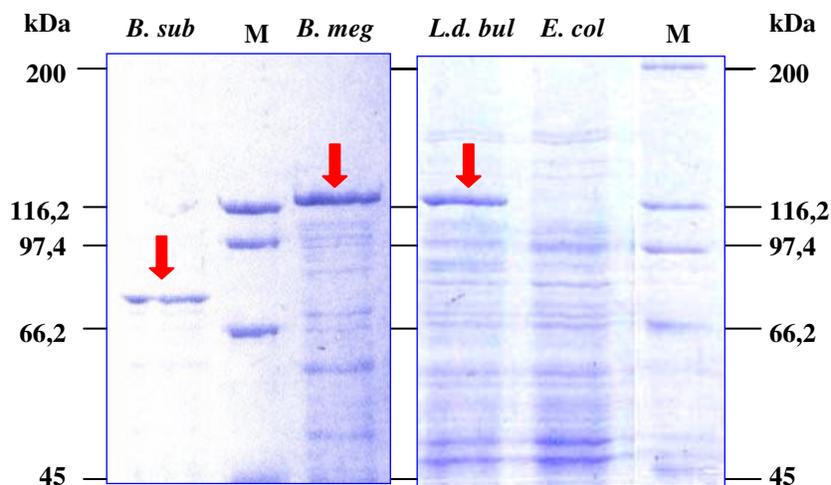
**Figura 3.18.** Plásmido pBT145 para la expresión en *E. coli* del gen *lacZ* de *L. d. bulgaricus*. Se muestra en detalle la fusión del gen *lacZ* al promotor del gen 10.

### **1.7. Expresión en *Escherichia coli* de los genes de las $\beta$ -galactosidasas**

Las construcciones pBT144, pBT143 y pBT145, portando los genes de las  $\beta$ -galactosidasas de *B. megaterium*, *B. subtilis* y *L. d. bulgaricus*, se utilizaron para transformar *E. coli* BL21(DE3)*w*. De cada una de las transformaciones se seleccionaron 12, 11 y 9 transformantes respectivamente. Como primer paso para realizar la expresión de los genes clonados, se prepararon cultivos de los clones seleccionados y la cepa control *E. coli* BL21(DE3)*w* en 10 ml de LB con ampicilina. Estos cultivos se incubaron durante 16 horas, a 37°C y en aerobiosis (250 rpm), transcurrido este tiempo, se utilizaron 500  $\mu$ l para inocular cultivos de 5 ml de LB de cada uno de los clones y se incubaron en matraces de 50 ml durante dos horas a 37°C y a 250 rpm en aerobiosis. Tras este período, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubaron los cultivos durante 3,5 horas en las mismas condiciones. A continuación se centrifugó el volumen completo de cada uno de los cultivos para recoger las células. Estas muestras se emplearon para obtener extractos crudos rompiendo las células con perlas de vidrio. Después de determinar la concentración de proteína de cada una de las muestras, se realizó un ensayo enzimático para valorar la actividad  $\beta$ -galactosidasa frente a oNPG (ver apartado 13 de "Materiales y métodos") presente en los extractos obtenidos.

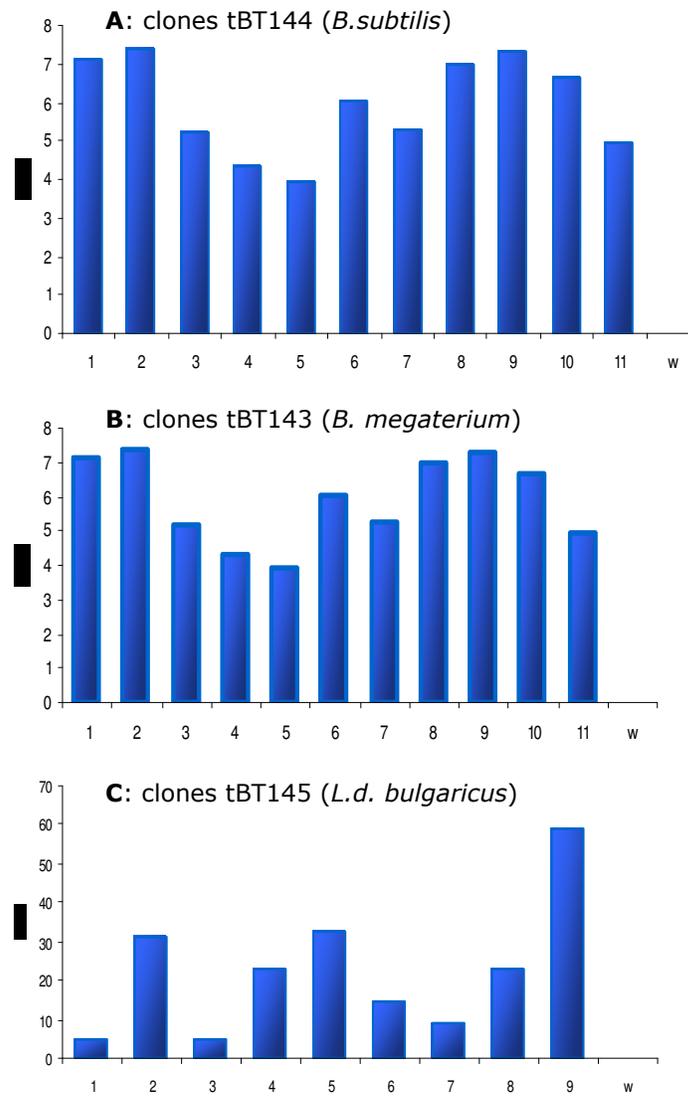
Los resultados obtenidos mostraron que los genes de  $\beta$ -galactosidasas introducidas en los tres grupos de transformantes eran expresadas en forma de enzimas activas en todos los casos. Este resultado concordaba con la presencia de bandas proteicas, del tamaño esperado para la  $\beta$ -galactosidasa expresada en cada

caso, detectadas mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes de extractos proteicos de un transformante de cada grupo seleccionado al azar (Fig. 3.19).



**Figura 3.19.** Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida de extractos proteicos de los transformantes: (***B. sub***) tBT143-1, (**M**) marcador de masa molecular ("Broad SDS-Page Unstained Standard, Bio-Rad), (***B. meg***) tBT144-1, (***L.d. bul***) tBT145-1 y (***E. col***) *E. coli* BL21(DE3)*w*. Con una flecha se señala la banda correspondiente a la β-galactosidasa expresada.

A diferencia de lo que ocurría en *Pichia pastoris*, los resultados de actividad enzimática obtenidos entre clones expresando una misma β-galactosidasa presentan sensibles diferencias. En los transformantes tBT144, que portaban la β-galactosidasa de *B. megaterium*, los valores de actividad oscilaban entre 5 y 11 U/ml de extracto (Fig. 20A). En el caso de los transformantes tBT143, expresando la β-galactosidasa de *B. subtilis*, estos valores se situaron entre 3,8 y 7,2 U/ml.



**Figura 3.20.** Actividad  $\beta$ -Galactosidasa presente en extractos acelulares de los transformantes tBT144 (A), tBT143 (B) y tBT145 (C) tras un periodo de inducción de 3.5 horas.

Los mejores resultados en cuanto a actividad  $\beta$ -galactosidasa, se obtuvieron con los transformantes tBT145, que

expresaban la  $\beta$ -galactosidasa de *L. d. bulgaricus*. En estos transformantes, los valores de actividades oscilaron entre las 5 U/ml de extracto que presentó el transformante tBT50-1 y las 60 U/ml de extracto del transformante tBT50-9.

Con estas comprobaciones damos por conseguido nuestro objetivo de expresar las  $\beta$ -galactosidasas clonadas.

## **2. Purificación parcial y determinación de la masa molecular de la $\beta$ -galactosidasa lacA de *Bacillus subtilis*.**

Debido a que el sistema de expresión elegido inicialmente, basado en la producción extracelular de las enzimas en *Pichia pastoris*, no mostró la eficiencia esperada, tuvimos que recurrir a un sistema de expresión intracelular utilizando *E. coli*.

La obtención de muestras enzimáticas a partir de precipitados celulares ocasionaba que las soluciones de  $\beta$ -galactosidasa expresadas contuvieran también una elevada cantidad de proteínas intracelulares de *E. coli*. Por esta razón, creímos necesario poner a punto un sistema de purificación para disponer de las enzimas  $\beta$ -galactosidasas relativamente concentradas y limpias a partir de los extractos acelulares. Para estos experimentos, decidimos utilizar extractos de la  $\beta$ -galactosidasa LacA de *B. subtilis* producida en *E. coli* BL21(DE3)*w*, por ser la primera  $\beta$ -galactosidasa expresada en el presente trabajo en dicho hospedador.

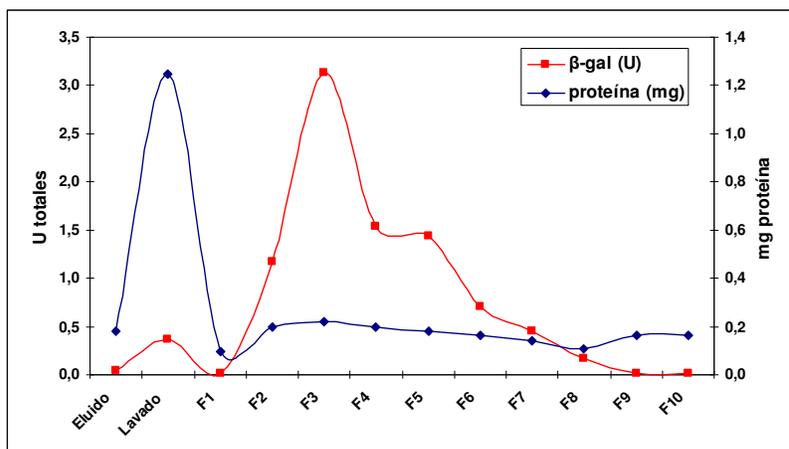
Para disponer de suficiente cantidad de muestra para los procesos de purificación, se realizó un cultivo del transformante tBT143-2, clon que había mostrado el mayor nivel de expresión de

la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus subtilis* en los anteriores experimentos, en un volumen de medio LB de 250 ml.

Primero se preparó un preinóculo en 50 ml de LB con ampicilina y se incubó toda la noche en agitación (250 rpm) a 37°C. Posteriormente, con 12,5 ml de este cultivo se inocularon 250 ml de LB. Este nuevo cultivo fue incubado durante 2 h a 250 rpm a 37°C. Al terminar este período se le añadió IPTG a una concentración final de 1 mM. El cultivo, en presencia de inductor de la expresión, fue incubado a 37°C en agitación (250 rpm) durante 20 h.

Una vez finalizado el cultivo, se recogieron las células por centrifugación. El precipitado de células se resuspendió en 3 ml de tampón Z con glicerol 10% y EDTA 1 mM. Se añadieron perlas de vidrio y para llevar a cabo la ruptura mecánica de las células se trató la mezcla con un agitador de tubos durante 10 pulsos de 15" alternando con 15" de incubación en hielo. Por último, la muestra se centrifugó durante 15 min a 11 000 rpm y a 4°C para poder obtener un sobrenadante con la fracción de proteínas. Se tomó una muestra de este extracto para posteriores ensayos y se empleó el resto (2 ml) para los procedimientos de purificación que a continuación se detallan.

El método de purificación elegido fue la cromatografía de afinidad porque es uno de los procedimientos más específicos. En nuestro caso utilizamos una columna de agarosa-*p*-aminofenil- $\beta$ -D-tiogalactósido (Sigma Chemical, EE.UU.) a cuyos residuos galactósido se une de forma específica la  $\beta$ -galactosidasa.



**Figura 3.21:** Actividad  $\beta$ -galactosidasa y concentración de proteína en las distintas fracciones recogidas durante el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de agarosa-*p*-aminofenil- $\beta$ -D-tiogalactósido.

Para llevar a cabo la purificación se equilibró una columna con 3 ml de fase estacionaria con 25 ml de tampón Z y se hicieron pasar 2 ml del extracto crudo por la columna (eluido).

A continuación se eluyeron las proteínas no unidas a la columna con 6 ml de tampón Z (lavado), y por último, se desprendieron las proteínas ligadas a la matriz haciendo pasar 6 ml de borato sódico 0,1 M pH 10 por la columna. Durante esta fase se recogieron fracciones de 0,5 ml cada una. Dado el alto pH de la solución de borato que podría afectar a la actividad enzimática se llevó a cabo un proceso de ultrafiltración (filtros Ultrafree 50kDa UFV5BQK00, Millipore) y posterior dilución en tampón Z. Por último, para regenerar la matriz, se realizó un lavado final con 30 ml de NaCl 0,5 M.

Una vez finalizado el proceso de purificación, se analizaron las diferentes fracciones obtenidas, determinando su concentración de proteína total y cuantificando la actividad  $\beta$ -galactosidasa frente

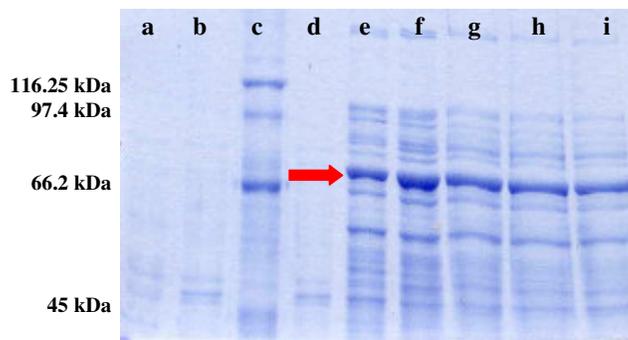
a oNPG que presentaban. Además, se desarrolló una electroforesis en condiciones desnaturalizantes de 10 µl de cada una de las fracciones mencionadas.

Fracción	β-gal (U)	prot (mg)	% act	% prot	Factor
Extracto	21,963	4,980	100,0	100	1,00
Fracción 3	3,137	0,223	14,3	4,5	3,20

**Tabla 3.1.** Parámetros de la purificación parcial por cromatografía de afinidad con agarosa de la β-galactosidasa LacA de *B. subtilis*.

El análisis de las diferentes fracciones obtenidas del experimento de purificación mostró que la β-galactosidasa de *B. subtilis* había sido desprendida de la columna de afinidad en las fracciones 2 a 7 principalmente. En estas fracciones residía el 38% de la actividad enzimática y el 22% de la proteína total, siendo la fracción 3 la que mayor concentración de enzima mostró (6,27 U/ml) que constituía el 14,3% de la actividad total (Figs. 3.21 y Tabla 3.1)

La información existente en la literatura, principalmente aportada por los estudios bioquímicos de Vikha et ál. (1987), establece una masa molecular de 105 kDa para la enzima lacA de *B. subtilis*. Este valor difiere significativamente de los, aproximadamente, 80 kDa que mostraba la enzima lacA expresada en *Escherichia coli* y sometida a electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Fig. 3.19), siendo este último valor más cercano a la masa molecular que se calcula (79 021 Da) de la secuencia aminoacídica deducida del gen *lacA*.



**Figura 3.22.** Gel desnaturalizante de poliacrilamida en el que se analizan 10  $\mu$ l de las fracciones recogidas durante la purificación con columna de afinidad: (a) fracción recogida tras pasar el extracto por la columna; b) lavado con tampón Z; c) marcador de masa molecular ("Broad SDS-Page Unstained Standard, Bio-Rad, EE.UU."); d) a i) fracciones 1 a 6 recogidas durante la elusión de la columna con borato sódico.

Para calcular la masa molecular, en estado nativo, de la proteína producida en nuestros experimentos, decidimos realizar un estudio mediante cromatografía de filtración en gel. Utilizamos un sistema de FPLC ("Fast Protein Liquid Chromatography") *Åktaexplorer* (Amersham Pharmacia Biotech) equipado con una columna de agarosa entrecruzada Superose™ 12 HR 10/30 que se caracteriza por tener un límite de exclusión de  $2 \cdot 10^6$   $M_r$  y un rango de separación óptimo de 1 000 a  $3 \cdot 10^5$   $M_r$ .

La columna se equilibró con solución tampón (fosfato sódico 50 mM, pH 7, 0,15 M NaCl) y se inyectaron 200  $\mu$ l de muestra obtenida de la fracción 3 del experimento de purificación por afinidad descrito en el apartado anterior. A continuación, la muestra se liberó con un flujo de 0,3 ml/min de la misma solución tampón. Las proteínas liberadas se detectaron en línea mediante la

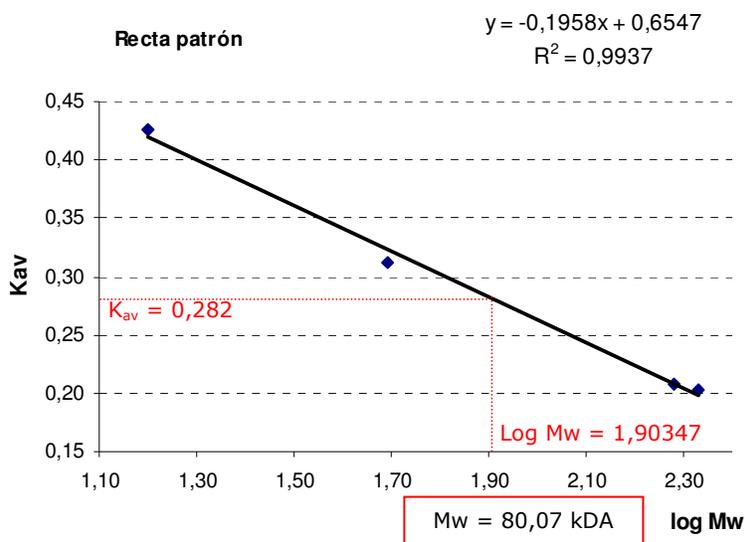
medida de la absorbancia a 280 nm. Se recogieron fracciones de 0,5 ml.

Las fracciones recogidas se utilizaron para realizar un ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa, frente a oNPG, en tubo (ver apartado 13 de "Materiales y métodos"). La fracción que poseía el mayor contenido de la enzima LacA correspondió con un volumen de elución de 13,23 ml.

Con este valor obtenido ( $V_e$ ) junto a los valores de volumen muerto de la columna ( $V_0 = 9$  ml) y el volumen total de tampón de desprendimiento ( $V_t = 24$  ml) calculamos la constante  $K_{av}$  ( $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ ) obteniéndose un valor de 0,282.

El dato de  $K_{av}$  obtenido se interpoló en una recta de calibrado determinada con los valores de  $K_{av}$  de las proteínas de masa molecular conocida (Amersham Biosciences UK Limited, Reino Unido): ribonucleasa A (15 800 Da), ovalbúmina (49 400 Da), aldolasa (191 000 Da) y catalasa (215 000 Da) frente al logaritmo de la masa molecular de cada una de ellas (Tabla X). De esta se calculó una masa molecular de la enzima lacA de *B. subtilis*, en condiciones nativas, de 80,07 kDa (Figura 3.23).

	V elución	Kav	Masa mol.	Log Mm
<b>Ribonucleasa A</b>	15,40	0,427	15,8	1,199
<b>Ovalbúmina</b>	13,67	0,311	49,4	1,694
<b>Aldolasa</b>	12,12	0,208	191	2,281
<b>Catalasa</b>	12,05	0,203	215	2,332
<b>LacA (<i>B. subtilis</i>)</b>	<b>13,23</b>	<b>0,282</b>	<b>80,07</b>	<b>1,903</b>



**Figura 3.23.** Recta patrón de  $K_{AV}$  frente a log de la masa molecular de las proteínas patrón.

### 3. Síntesis de GOS

Una vez expresadas las distintas  $\beta$ -galactosidasas, el siguiente paso era analizar su capacidad de síntesis de galacto-oligosacáridos. Para ello escogimos la  $\beta$ -galactosidasa que era producida en mayor cantidad: la  $\beta$ -galactosidasa de *L. d. delbrueckii*.

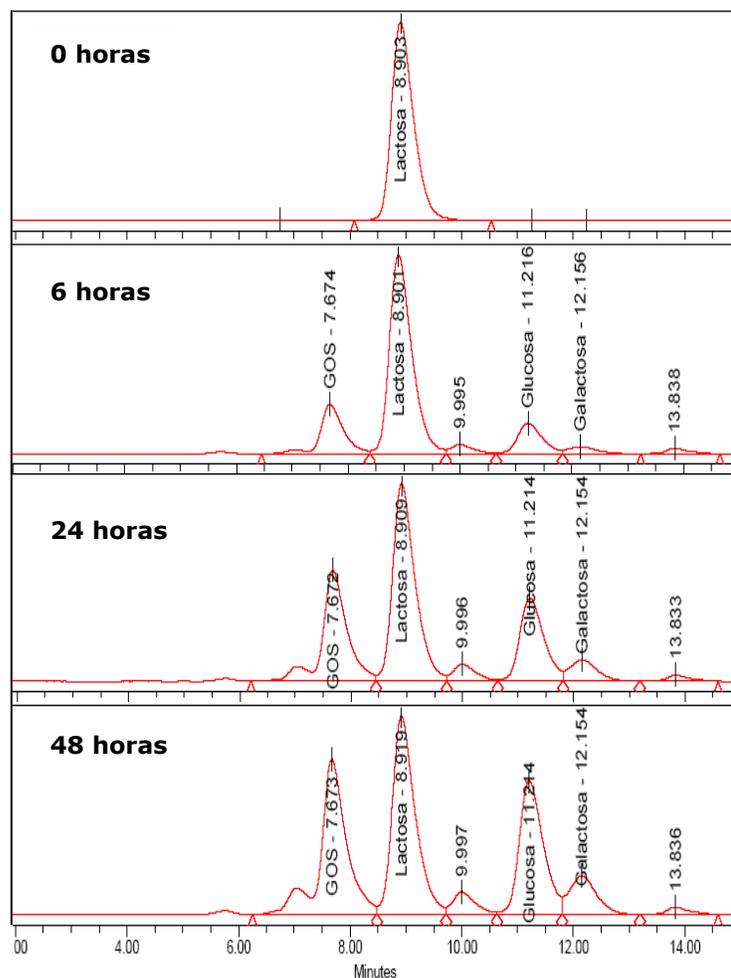
Por medio de estudios preliminares con preparaciones de  $\beta$ -galactosidasa comerciales se había establecido que la concentración óptima de enzima para una reacción de síntesis de GOS era de 10 U/g lactosa. Con esta concentración de enzima lacZ

se realizó un ensayo de síntesis de GOS en biorreactores Biostat Q (Braun, Frankfurt, Alemania) (Moreno y Merino, comunicación personal) con 300 ml de agua estéril, pH 6, 50°C y 40% (p/v) lactosa. La reacción se mantuvo en agitación (300 rpm) durante 96 h y se fueron tomando muestras de 10 ml periódicamente.

Dada la no existencia de patrones de GOS, asumimos como este tipo de oligosacárido todo compuesto con un tiempo de retención diferente de los tiempos de retención de la lactosa, glucosa y galactosa (Fig. 3.24). Para la cuantificación de los compuestos considerados GOS, se utilizó un patrón de fructo-oligosacáridos (fructosil-nistosa). Este método cuantitativo está respaldado por el hecho de que todos los oligosacáridos generan una respuesta similar al ser detectados por el índice de refracción.

El análisis de las diferentes muestras tomadas a lo largo de la reacción de síntesis de GOS, reveló que, en las condiciones ensayadas, la  $\beta$ -galactosidasa de *L. d. bulgaricus* era capaz de sintetizar hasta 148 g/l de GOS tras 48 h de reacción. Esta concentración correspondía a un 35% (p/p) del total de azúcares presentes en la reacción (Fig 3.25). El resto de productos de la reacción fueron glucosa (26,8%), galactosa (9,1%) y un 29,1% de lactosa que no actuó como sustrato.

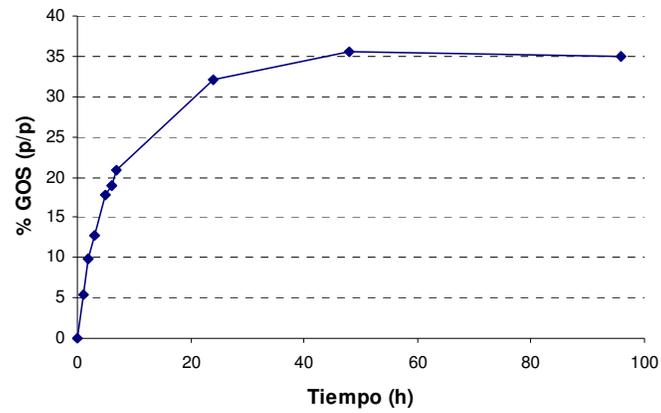
La composición de las muestras tomadas a lo largo de la reacción se determinó mediante HPLC utilizando un equipo "HPLC 2695 Alliance" acoplado a un detector de índice de refracción.



**Figura 3.24.** Cromatogramas de una muestra de la reacción de síntesis de GOS a las 0, 6, 24 y 48 horas desde el inicio de la reacción. Pueden identificarse los picos correspondientes a la galactosa, glucosa y lactosa. El resto de picos que aparecen en el cromatograma se consideran asociados a diferentes tipos de GOS generados en la reacción.

Se utilizó como fase estacionaria una columna "MCI GEL (CK08E) 300 x 8,0 mm, y agua como fase móvil. Se inyectaron 10

μl por muestra diluida veinticinco veces, la temperatura del detector fue de 50°C y la medida se realizó por áreas.



**Figura 3.25.** Porcentaje de galacto-oligosacáridos con respecto al producto total (p/p) de la reacción realizada por la enzima lacZ.

## **4. Inactivación de la proteína lacA de *B. subtilis***

### **4.1. Mutación dirigida: obtención del mutante *tBT17lacA***

La enzima  $\beta$ -galactosidasa de *B. subtilis*, codificada por el gen *lacA*, pertenece a la familia 42 de las glicosidasas. Las enzimas agrupadas en esta familia presentan, característicamente, un residuo de Glu como aminoácido nucleofílico. El análisis de la secuencia del gen *lacA* clonado en nuestro laboratorio permitió identificar el aminoácido Glu situado en la posición 322 como posible centro nucleofílico. En la reacción de hidrólisis, la molécula de galactosa se une a este residuo nucleofílico formando el intermediario galactosil-enzima (Fig. 1.3). La sustitución del sitio activo carboxilado nucleofílico por un aminoácido de cadena no nucleofílica resulta en una enzima de plegamiento correcto pero que es hidrolíticamente inactiva (Mackenzie et ál., 1998), ya que no puede formar el intermediario galactosil-enzima. Sin embargo, como el resto del sitio activo permanece inalterado, se ha visto que puede catalizar la unión de un derivado glicosídico activado, con el que se puede formar el intermediario galactosil-enzima, a un azúcar aceptor apropiado.

Con el fin de comprobar si la enzima lacA de *B. subtilis* podría ser utilizada como base para obtener una enzima glicosintasa, se diseñó un experimento de mutación dirigida. Decidimos sustituir el aminoácido potencialmente localizado en el centro activo, el Glu 322, por una Ala, cuya cadena lateral no es nucleofílica, y posteriormente analizar la actividad hidrolítica del mutante resultante.

El vector pBT143, plásmido de expresión del gen *lacA* de

*Bacillus subtilis* en *Escherichia coli* (Fig. 3.17), se utilizó como molde en los procesos de mutación dirigida, utilizando el kit comercial "Quick-change<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit". La enzima utilizada para la PCR fue la ADN polimerasa PfuTurbo<sup>®</sup> y los cebadores de las reacciones fueron los oligonucleótidos pBT17-NcoI-D y pBT17-BamHI-R (Tabla 2.1).

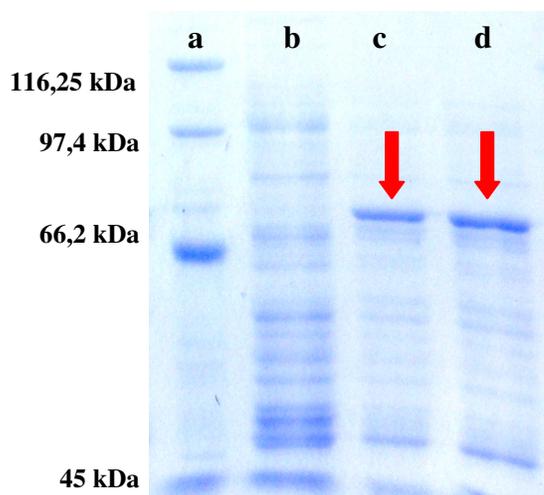
El inserto del plásmido resultante (pBT143/lacA<sup>-</sup>) fue secuenciado, confirmándose el cambio del codón GAG, correspondiente al aminoácido en posición 322, por el codón GCG. De este modo, en la proteína resultante se habría sustituido el ácido glutámico (322) por una alanina.

#### **4.2. Expresión y caracterización de la $\beta$ -galactosidasa mutada expresada a partir del plásmido pBT143lacA<sup>-</sup>**

El plásmido pBT143/lacA<sup>-</sup> fue utilizado para transformar *Escherichia coli* BL21(DE3)w. Posteriormente, se realizó una selección de transformantes por resistencia a ampicilina. Y por último, se hizo una comprobación adicional de la resistencia a ampicilina para descartar falsos transformantes. Además, se realizó un ensayo cualitativo de actividad  $\beta$ -galactosidasa en medio sólido (ver apartado 13 de "Materiales y métodos") de modo que adicionalmente pudimos comprobar que los clones obtenidos no eran capaces de hidrolizar X-gal.

Se realizó un ensayo de expresión (ver apartado 9.1 de "Materiales y métodos") con tres transformantes seleccionados al azar. Para ello, en primer lugar, se prepararon cultivos de los clones seleccionados, un transformante portador del plásmido con

el gen sin mutar (pBT143) y la cepa control sin plásmido *E. coli* BL21(DE3)*w* en 10 ml de LB con ampicilina. Estos cultivos se incubaron durante 16 horas, a 37°C y en aerobiosis (250 rpm), transcurrido este tiempo, se utilizaron 500 µl para inocular cultivos de 5 ml de LB de cada uno de los clones y se incubaron en matraces de 50 ml durante dos horas a 37°C y a 250 rpm en

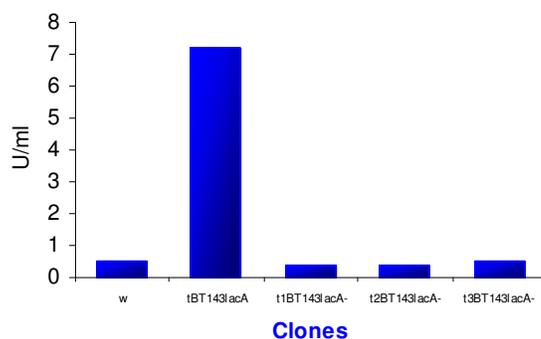


**Figura 3.26.** Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida de extractos proteicos de las cepas: BL21(DE3)*w* (a), marcador de masa molecular ("Broad SDS-Page Unstained Standard (Bio-Rad, EE.UU.)") (b), tBT143*lacA* (c) y t1BT143*lacA* (d). Con una flecha se señala la banda correspondiente a la β-galactosidasa expresada.

aerobiosis. Tras este período, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubaron los cultivos durante 3,5 horas en las mismas condiciones. Por último, se centrifugó el volumen completo de cada uno de los cultivos para recoger las células. Estas muestras se emplearon para obtener extractos crudos rompiendo las células con perlas de vidrio.

Alícuotas de las muestras obtenidas se desarrollaron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El resultado de esta electroforesis nos permitió observar una banda proteica, no presente en la cepa control BL21(DE3)*w* sin plásmido, del tamaño esperado para la  $\beta$ -galactosidasa (80 kDa) tanto en el transformante control tBT143/*lacA* como en los transformantes tBT143/*lacA*<sup>-</sup> (Fig. 3.26).

Después de determinar la concentración de proteína de cada una de las muestras, se realizó un ensayo enzimático para valorar la actividad  $\beta$ -galactosidasa frente a oNPG en tubo (ver apartado 13 de "Materiales y métodos") presente en los extractos obtenidos. Se pudo comprobar que los clones con el gen mutado habían perdido la actividad hidrolítica (Fig. 3.27).



**Figura 3.27.** Comparación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de los extractos crudos de la cepa control BL21(DE3)*w*, de la cepa productora de la enzima *lacA* activa y de tres clones de la cepa productora de la enzima *lacA* inactiva.

Tal y como esperábamos, según nuestro planteamiento teórico, la sustitución del aminoácido nucleofílico del centro activo de la  $\beta$ -galactosidasa codificada por el gen *lacA*, generó enzimas

hidrolíticamente inactivas. A continuación, se debería comprobar la capacidad de las enzimas producidas por los transformantes tBT143/acA<sup>-</sup> de sintetizar oligosacáridos utilizando como sustratos un derivado glicosídico activado (“donador”) y un disacárido (“acceptor”). Sin embargo, la no disponibilidad de monosacáridos activados adecuados, y la dificultad técnica de sintetizar estos compuestos por vía química, hizo que no pudiéramos realizar estos ensayos durante el período de trabajo experimental dedicado a la elaboración de esta memoria.

### **5. Obtención de variantes termoestables de la proteína lacZ de *L. d. bulgaricus* mediante evolución dirigida**

Recapitulando los resultados anteriores, hasta este punto se han clonado y expresado tres  $\beta$ -galactosidasas, y con una de ellas, la enzima LacZ de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, se ha conseguido sintetizar galacto-oligosacáridos (GOS).

Una de las dificultades técnicas que impiden mejorar el rendimiento en reacciones de síntesis de GOS es que se requieren altas concentraciones de lactosa. La preparación de soluciones con altas concentraciones de este sustrato está limitada por su solubilidad (180 gr/l a 20°C, 320 gr/l a 40°C). Un incremento de la temperatura de reacción incrementaría la solubilidad de la lactosa, y por lo tanto, incrementaría el rendimiento de la reacción de síntesis de GOS. Este incremento de temperatura está limitado por la temperatura máxima a la que las enzimas utilizadas en las

reacciones de síntesis de GOS son estables. Así, el objetivo último de la presente tesis fue generar una proteína, por mutación y selección (evolución dirigida), a partir de la proteína salvaje, que tuviera mayor termoestabilidad que su predecesora. Una mayor estabilidad permitiría realizar reacciones a mayor temperatura, con lo cual se podría incrementar la concentración de lactosa en el medio y como resultado se obtendrían mayores cantidades de GOS.

Como sujeto de los ensayos de evolución dirigida se escogió la  $\beta$ -galactosidasa lacZ de *L. d. bulgaricus* porque fue la enzima que se expresó más eficientemente en el sistema de expresión diseñado en *E. coli*, y porque demostró, en nuestros ensayos, ser capaz de sintetizar GOS con buenos rendimientos.

La evolución dirigida comprende dos fases: generación de diversidad molecular y búsqueda de las proteínas, generadas a partir de estas secuencias, que cumplan las funciones deseadas de acuerdo a un criterio específico.

### **5.1. Generación de variantes del gen lacZ de *L. d. bulgaricus* por mutación aleatoria**

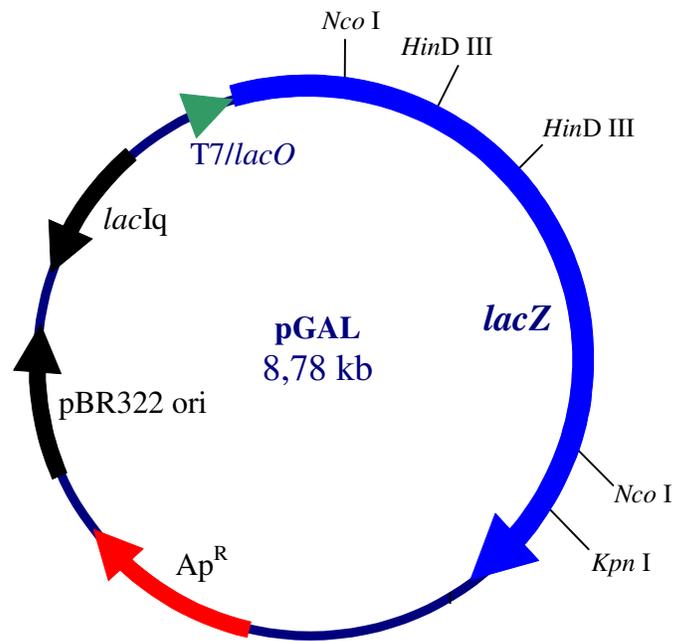
La primera opción elegida para la generación de variantes del gen *LacZ* de *L. d. bulgaricus* fue utilizar la cepa *E. coli* XL1-Red (Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Esta cepa se caracteriza por ser deficiente en tres de las primeras rutas de reparación del ADN, por lo que acumula mutaciones producidas durante la replicación, tanto del genoma bacteriano como del ADN exógeno. El sistema consiste en introducir un plásmido portador del gen de interés en esta cepa hospedadora para que cuando se produzca la replicación del plásmido no se reparen las posibles mutaciones que se hayan

producido en el gen de interés. El acúmulo de mutaciones es cada vez mayor a medida que se mantiene el cultivo de la cepa con el gen de interés en su interior.

Se transformó la cepa *E. coli* XL1-Red con el plásmido pBT145 (Fig. 3.18), y se mantuvo el cultivo en LB con ampicilina durante cinco días a 37°C en agitación (250 rpm). Cada 24 h se recogió una muestra de cultivo de 1 ml de la que se aisló el ADN plasmídico. Tras secuenciar los insertos de los plásmidos de diez clones del quinto día de cultivo, para analizar la tasa de mutación obtenida, pudimos comprobar que la tasa media de mutación era inferior a 0,1 cambios por kilobase, lo cual era insuficiente para nuestros experimentos. Por este motivo, decidimos descartar este sistema de generación de variantes.

Para la generación de variantes del gen *LacZ* de *L. d. bulgaricus* se seleccionó, finalmente, el sistema Mutazyme™ de Stratagene (La Jolla, EE.UU.) y el sistema de clonación dirigida Champion™ pET Direccional TOPO® de Invitrogen (Carlsbad, EE.UU.). El motivo que nos condujo a utilizar el sistema Mutazyme™ para generar mutaciones al azar es que permite controlar el número de mutaciones puntuales, producidas por una ADN polimerasa diseñada para generar errores, variando simplemente la cantidad de ADN molde utilizado en la reacción de PCR. El sistema de clonación escogido permitía además que los fragmentos de ADN producidos en la PCR mutagénica fueran ligados de forma dirigida y con alta eficiencia a los vectores pET101/D-TOPO, evitando que se generaran plásmidos sin inserto, gracias al sistema basado en la actividad topoisomerasa (ver “Materiales y métodos”).

En primer lugar, el gen *lacZ* de *L. delbrueckii bulgaricus* fue amplificado por PCR usando la ADN polimerasa *PfuTurbo*® (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) con cebadores específicos (Der y Pum), y como molde el plásmido pBT145. A continuación, este fragmento de ADN se ligó de forma dirigida al vector pET101/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.), generando el plásmido que nos sirvió como control en los experimentos de "screening" (pGAL, fig. 3.28). Adicionalmente, analizamos 10 transformantes de esta construcción y comprobamos que todos tenían el inserto adecuado, por lo que asumimos una eficiencia de ligación cercana al 100%.



**Figura 3.28.** Esquema del plásmido de expresión pGAL.

Antes de proceder con la generación de variantes, realizamos un ensayo cualitativo previo de expresión con un clon portador del plásmido pGAL utilizando X-Gal como sustrato para la detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en medio sólido (ver apartado 13 de "Materiales y métodos"). Efectivamente, pudimos confirmar la presencia de actividad  $\beta$ -galactosidasa en las células tras ser incubadas 16 horas en placas de LB sólido con IPTG, X-Gal y ampicilina.

Para la generación de variantes del gen *lacZ*, se planificó la reacción de PCR mutagénica para que se produjeran de 2 a 7 cambios nucleotídicos por kilobase, que es lo que se ha descrito como una tasa de mutación adecuada para los ensayos de evolución dirigida (Wan et ál, 1998).

Para ello, se realizó una PCR en las mismas condiciones que para la construcción del plásmido control, pero utilizando la ADN polimerasa Mutazyme™ y 1 ng del plásmido pBT145 como molde de partida. Como producto de esta PCR obtuvimos fragmentos de ADN del tamaño del gen *lacZ*. A continuación, purificamos dichos fragmentos y los utilizamos como insertos en una reacción de ligación con el vector pET101/D-TOPO. Obtuvimos un conjunto de plásmidos portadores de supuestas variantes del gen *lacZ*. Esta mezcla se utilizó para transformar por electroporación la cepa *E. coli* BL21(DE3)*w*. Se seleccionaron diez transformantes al azar para comprobar la eficiencia de la ligación y, por secuenciación, la eficiencia de mutación del proceso de mutagénesis. Se comprobó que el 100% de los plásmidos eran portadores del inserto adecuado y las variantes obtenidas tenían una tasa de mutación de 1,2 mutaciones por kilobase. Esta tasa de mutación no era

suficiente para proseguir con nuestros experimentos, así que decidimos incrementar dicho parámetro.

Para incrementar la tasa de mutación se aisló por "miniprep" el ADN plasmídico de un cultivo inoculado con todos los clones obtenidos en la reacción de transformación previamente mencionada. Esta preparación de ADN, formada por una mezcla de plásmidos conteniendo variantes del gen *lacZ* de *L. d. bulgaricus*, fue utilizada como molde en una nueva reacción de PCR con el sistema Mutazyme™. Tras repetir el mismo procedimiento descrito anteriormente, se obtuvo una tasa de mutación de 2,5 mutaciones por kilobase para este nuevo conjunto de transformantes. Esta tasa de mutación se consideró adecuada.

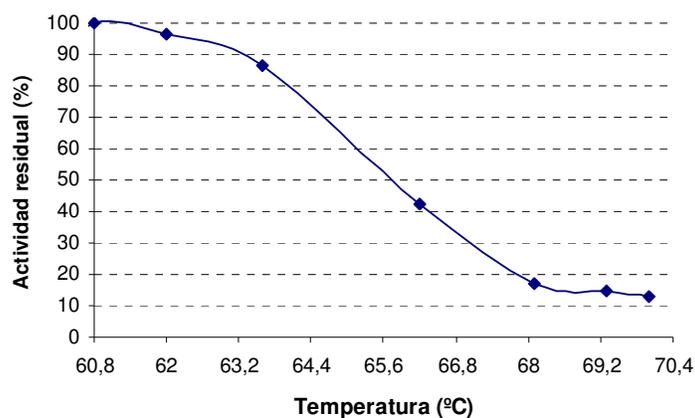
### **5.2. Selección de variantes termoestables ("Screening")**

El primer paso que se dio para poner a punto las condiciones del "screening" fue establecer la temperatura de selección de las variantes termoestables. Para ello se realizó una serie de estudios previos con la cepa control, *E. coli* BL21(DE3)*w* (pGAL), la cual expresaba la  $\beta$ -galactosidasa de *L. delbrueckii bulgaricus* sin mutar. Tanto en los ensayos previos que a continuación describiremos, como en los experimentos de "screening", decidimos utilizar directamente cultivos de los clones de *E. coli* expresando las variantes enzimáticas en los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa. De esta forma simplificamos el método experimental, evitando la obtención de extractos celulares.

Con la cepa control se realizó un ensayo de expresión en matraz con un período de inducción de 16 horas (ver "Materiales y métodos") y un volumen de cultivo de 10 ml. Posteriormente,

distintas fracciones de este cultivo, de 50  $\mu$ l cada una, fueron sometidas a un gradiente de temperatura, comprendido entre 60°C y 70°C, durante 5 min en un termociclador i-cycler de Bio-Rad Laboratories (Hercules, EE.UU.). Escogimos un tiempo de incubación corto para facilitar, posteriormente, el procesamiento de numerosas muestras.

Por último, se realizó un ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa utilizando los 50  $\mu$ l incubados a diferentes temperaturas como muestra enzimática, siguiendo el procedimiento habitual descrito en "Materiales y métodos" (apartado 13) para placas de 96 pocillos utilizando oNPG como sustrato e incubando las reacciones a 37°C.



**Figura 3.29.** Representación gráfica de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la enzima LacZ expresada en *E. coli* tras ser sometida a un gradiente de temperatura durante 5 min.

Pudimos comprobar que la actividad  $\beta$ -galactosidasa residual, tras la incubación a diferentes temperaturas, de la cepa

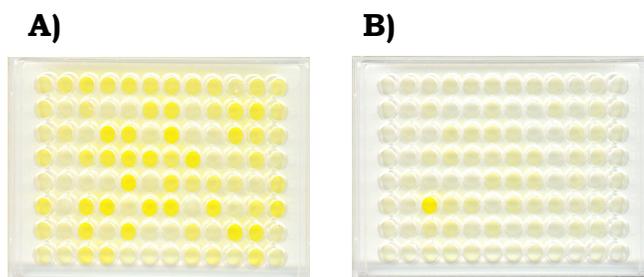
control descendía a partir de los 60°C hasta que a 70°C desaparecía casi totalmente (Fig. 3.29).

Para que el "screening" fuera lo suficientemente sensible decidimos establecer la temperatura de selección a 65°C, donde la actividad residual se sitúa ligeramente por encima del 50% (respecto a la actividad residual de la muestra incubada a 60°C).

Una vez establecidas las condiciones de incubación, iniciamos los experimentos de selección de variantes termoestables. Como hospedador para la expresión de las variantes del gen lacZ se utilizó la cepa de *E. coli* BL21(DE3)*w*. Se llevaron a cabo diez transformaciones con el ADN plasmídico purificado previamente obteniéndose aproximadamente 10 000 transformantes. Cuatro mil de estos transformantes se inocularon en 1 ml de LB con ampicilina e IPTG con ayuda de un robot picador de colonias "QPix2" (Genetix, Hampshire, Reino Unido); y se incubaron en placas de 96 pocillos, de 2 ml de volumen, durante 48 horas a 28°C y 250 rpm.

A continuación, se realizó por duplicado un ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa frente a oNPG, utilizando como muestra enzimática 50  $\mu$ l de los cultivos de los clones "variantes" obtenidos previamente. Una de las réplicas se realizó con la muestra enzimática sometida a una incubación a 65°C durante 5 min (muestra "tratada"), mientras que la otra réplica se realizó con la muestra enzimática sin incubar (muestra "control"). En ambos casos, se añadieron 50  $\mu$ l de oNPG (4 mg/ml) a la muestra enzimática, se incubó a 37°C durante 20 min y se paró la reacción añadiendo 100  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M (Fig. 3.30). A continuación se

realizó una lectura de la absorbancia a 415 nm y a 595 nm, de cada una de las reacciones.



**Figura 3.30.** Imagen de las placas de “screening” del ensayo de termoestabilidad: (A) muestra “control” y (B) muestra “tratada”.

Con los valores de absorbancia de las muestras control y de las muestras tratadas de los 4 000 clones analizados se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Actividad inicial (A}_i\text{)} = \frac{\text{DO}_{415} \text{ (inicial)} - f \text{ DO}_{595} \text{ (inicial)}}{\text{DO}_{595} \text{ (inicial)}}$$

$$\text{Actividad residual (A}_r\text{)} = \frac{\text{DO}_{415} \text{ (residual)} - f \text{ DO}_{595} \text{ (residual)}}{\text{DO}_{595} \text{ (inicial)}}$$

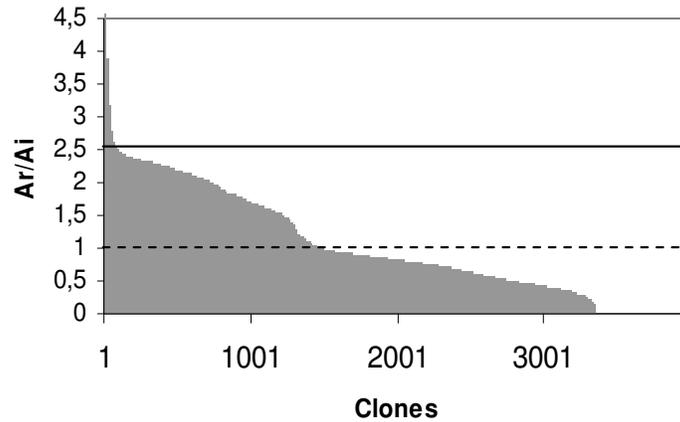
Como se puede deducir de estas expresiones, la actividad inicial ( $A_i$ ) se calculó basándonos en la cantidad de 2-nitrofenol liberado durante la hidrólisis del oNPG producida por la “muestras control”. Para determinar este dato se realizó una lectura a 415 nm, longitud de onda a la que absorbe el 2-nitrofenol pero también los restos celulares. Para corregir este error se resta al valor de  $\text{DO}_{415}$  el valor obtenido en una lectura a 595 nm (elementos

celulares) ajustado por un factor de normalización (f) que varía en cada ronda de clones analizados ( $DO_{415} - f DO_{595}$ ). En cada experimento utilizamos controles negativos (sin actividad  $\beta$ -galactosidasa) para calcular "f", y este valor lo aplicamos a todos los transformantes de dicho experimento. De modo que para un clon que no muestre actividad  $\beta$ -galactosidasa  $DO_{415} - f DO_{595} = 0$ . Para normalizar el resultado de actividad enzimática con respecto al número de células de la muestra se divide por la lectura a 595 nm, longitud de onda a la que absorben las células.

La actividad residual ( $A_r$ ) la calculamos por la cantidad de 2-nitrofenol liberado durante la hidrólisis del oNPG durante 20 min a 37°C, por las "muestras tratadas". Para determinar este dato se realiza una lectura a 415 nm, y al igual que en el caso anterior le restamos el valor obtenido en una lectura a 595 nm, ajustada por un factor de normalización (f). En este caso, para normalizar el resultado de actividad enzimática respecto al número de células, tomamos el valor de  $DO_{595}$  de las muestras control correspondientes, porque tras ser sometidas a 65°C gran parte de las células de las muestras tratadas, se disgregan y la lectura en este caso a 595 nm no aporta un resultado fiable indicativo de la concentración celular.

Una vez obtenidos los datos de  $A_i$  y  $A_r$ , estos valores se utilizaron para calcular la proporción obtenida entre la actividad inicial y la actividad residual ( $A_i/A_r$ ), dato que nos da una estimación de la estabilidad. Dado que es una relación entre la actividad mostrada por alícuotas del mismo cultivo, este índice de estabilidad corrige las diferencias en actividad debidas a la variación en la expresión de la proteína.

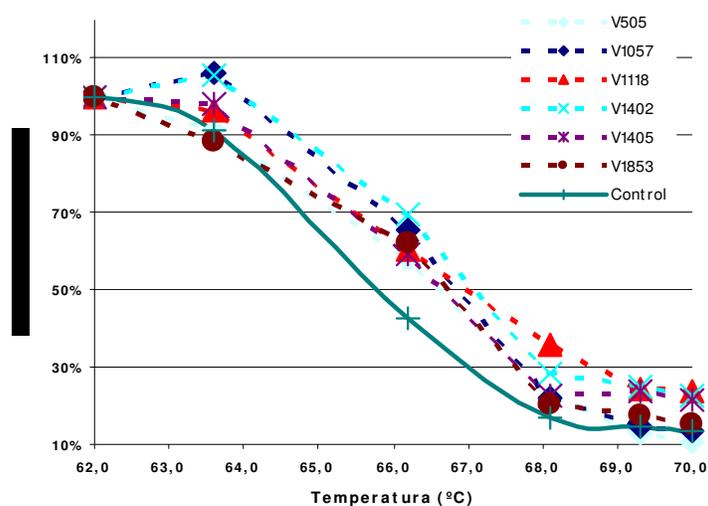
Puesto que se observó la aparición de varias decenas de variantes potencialmente mejoradas no se siguieron procesando más transformantes, siendo los analizados en total 4 000. En conjunto se realizaron dos rondas de análisis de 2 000 variantes cada una. Establecimos por cuestiones prácticas que el 1,5% de las variantes que tenían mayor relación  $A_r/A_i$  (el umbral lo pusimos en 2,55) fueran seleccionados para la siguiente fase del "screening" (en total 60 clones) (Fig. 3.31).



**Figura 3.31.** Índice de termoestabilidad ( $A_r/A_i$ ) de los clones analizados. Con una línea negra continua se señala el umbral de actividad que se eligió para considerar una variante como positiva para pasar a la segunda fase del "screening".

La segunda fase del "screening" de termoestabilidad consistió en realizar un estudio más preciso, con los 60 clones seleccionados para confirmar la termoestabilidad de las  $\beta$ -galactosidasas que expresaban dichos clones, y tratar de establecer la temperatura de resistencia de cada transformante. Para ello se realizó un ensayo de termoestabilidad incubando

alícuotas de cultivos de los 60 clones a diferentes temperaturas, dentro de un gradiente entre 60°C y 70°C. De este experimento se obtuvieron resultados que nos permitieron seleccionar los clones en los que se producía un descenso de la actividad residual, a lo largo del gradiente de temperatura de incubación inferior al producido en la cepa control. Seis de las sesenta variantes obtenidas produjeron un perfil de termoestabilidad mejor que los controles (Fig. 3.32) mostrando un mayor porcentaje de actividad residual que la cepa control a temperaturas cercanas a la temperatura de selección de la primera fase de "screening" (65°C) y a temperaturas superiores (68 y 69°C).

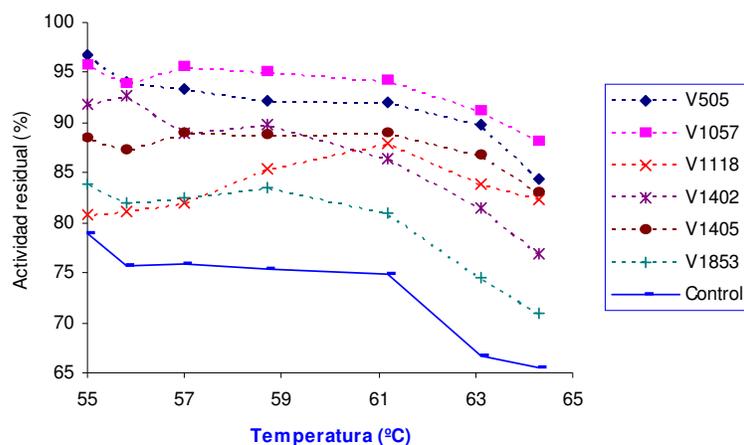


**Figura 3.32.** Actividad residual de las seis variantes seleccionadas con respecto a la media de los controles, a lo largo de un gradiente de temperatura.

A continuación, y para descartar que la mayor termoestabilidad mostrada por los clones aislados se debiera a un

efecto protector de las células sobre las  $\beta$ -galactosidasas expresadas, repetimos el ensayo anterior pero utilizando extractos crudos obtenidos a partir de precipitados celulares de los clones seleccionados, e incubando las muestras en un rango de temperaturas más estrecho (55-65°C).

El porcentaje de conservación de actividad fue superior en todas las variantes con respecto a los controles a lo largo de todo el rango de temperaturas (Fig. 3.33).



**Figura 3.33.** Actividad residual en los extractos de las seis variantes seleccionadas con respecto a la media de los controles a lo largo de un gradiente de temperatura.

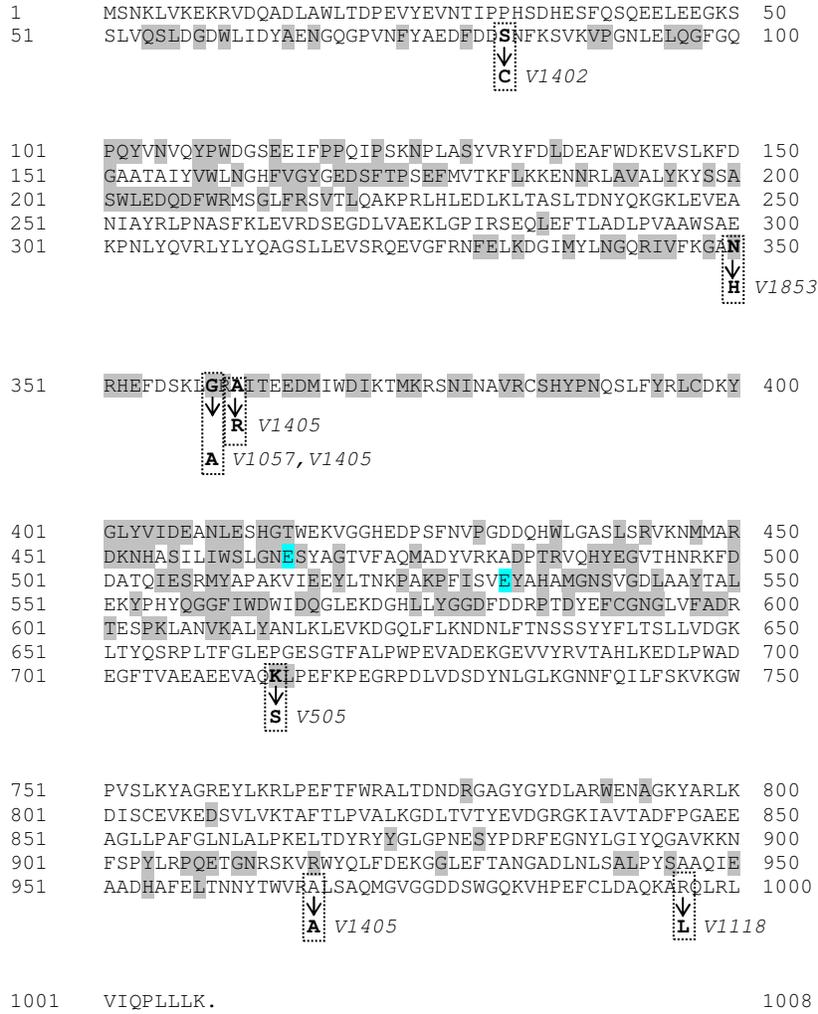
### 5.3. Identificación de mutaciones en las variantes termoestables

Los resultados obtenidos en la caracterización de clones termoestables identificados en nuestros experimentos de "screening" parecían indicar que, efectivamente, habíamos

obtenido seis variantes de la  $\beta$ -galactosidasa de *L. d. bulgaricus* más termoestables que la enzima salvaje. Nuestro siguiente objetivo fue identificar las posibles mutaciones responsables del cambio fenotípico observado. Para ello, se obtuvo, mediante "minipreps", ADN plasmídico de las variantes seleccionadas. Los insertos que portaban estos plásmidos fueron secuenciados a partir de los oligonucleótidos T7 y T7terminador del vector, y tres oligonucleótidos internos. El análisis de las secuencias nos permitió localizar una mutación en cada uno de los insertos de los plásmidos obtenidos de las variantes V505, V1057, V1118, V1402 y V1853. En todos ellos, las mutaciones generaron un cambio de codón, por tanto, de aminoácido en la proteína deducida (Tabla 3.2). En el clon V1405, la secuencia del inserto del plásmido purificado reveló la existencia de tres mutaciones, generando sólo dos de ellas un cambio de aminoácido en la proteína deducida (Tabla 3.2). En la figura 3.34 se recogen todos los cambios aminoacídicos descubiertos en los clones analizados.

Variante	Posición	Sec. salvaje	Sec. variante	Cambio
<b>505</b>	714	AAG	AGC	Lys → Ser
<b>1057</b>	359	GGC	GCC	Gly → Ala
<b>1118</b>	996	CGC	CTC	Arg → Leu
<b>1402</b>	82	AGC	TGC	Ser → Cys
<b>1405</b>	359	GGC	GCC	Gly → Ala
	361	GCT	CGT	Ala → Arg
	967	GCC	GCT	Ala → Ala
<b>1853</b>	350	AAC	CAC	Asn → His

**Tabla 3.2.** Resumen de las mutaciones y sus posiciones localizadas en las secuencias de los genes *lacZ* de las variantes termoestables.



**Figura 3.34.** Secuencia aminoacídica de la enzima lacZ salvaje y de las variantes termoestables. Los aminoácidos conservados característicos de la familia 2 de las glicosidasas están resaltados con fondo gris.

#### **5.4. Síntesis de galacto-oligosacáridos (GOS) con las $\beta$ -galactosidasas termoestables generadas**

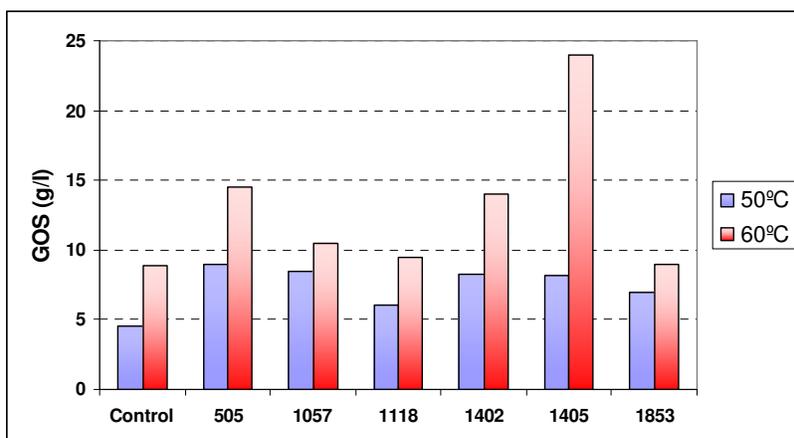
Como hemos dicho previamente, una de las aplicaciones de una  $\beta$ -galactosidasa mejorada en cuanto a termoestabilidad podría ser la síntesis de galacto-oligosacáridos en reacciones a elevadas temperaturas y con una alta concentración de lactosa

Decidimos comprobar si las  $\beta$ -galactosidasas termoestables generadas en nuestros experimentos de evolución molecular podrían mejorar el rendimiento en un proceso de síntesis de GOS. Para ello, obtuvimos extractos celulares de cultivos de los seis clones aislados, y de la cepa control *E. coli* BL21(DE3)*w* [pGAL], mantenidos en condiciones de inducción durante 4 h.

Estos extractos se utilizaron como muestra enzimática para llevar a cabo dos series de reacciones de síntesis de GOS: la primera en condiciones estándar, a 50°C con 45% (p/v) de lactosa (Fig. 3.35), y la segunda, en condiciones de alta temperatura, a 60°C con 55% (p/v) de lactosa (Fig 3.35). En los dos grupos de reacciones la incubación se realizó a pH 6 y durante 16 h, transcurridas las cuales se inactivaron las enzimas manteniendo la mezcla de reacción a 100°C durante 10 min. Alícuotas de cada una de las reacciones se analizaron mediante HPLC utilizando el mismo método descrito en el apartado "Síntesis de GOS" de "Resultados y Análisis".

Los resultados revelaron que, en las condiciones ensayadas, las seis enzimas termoestables sintetizaban GOS con mayor eficiencia que la enzima salvaje, en condiciones estándar (50°C y

45% p/v de lactosa) (Fig. 3.35). En las reacciones a 60°C y 55% (p/v) de lactosa, la eficiencia de síntesis de GOS fue mayor en todas las muestras, incluso en la reacción control con la enzima salvaje. Además, en tres de las variantes, V505, V1402 y especialmente en el caso de la variante V1405, la síntesis de GOS fue sensiblemente más eficiente que en la reacción control.



**Figura 3.35.** Producción de GOS de las variantes termoestables a 50°C en una solución al 45% de lactosa (columnas azules) y a 60°C en una solución al 55% de lactosa (columnas rojas).



**IV-Discusión**



## 1. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes de $\beta$ -galactosidasas

### 1.1. Clasificación de las $\beta$ -galactosidasas

Durante la descripción de las  $\beta$ -galactosidasas producidas en este trabajo se han mencionado las familias 2 y 42 de las enzimas glicosil hidrolasas (GH). Esta clasificación, basada en la estructura de los dominios se concreta en una base de datos en la que Coutinho y Henrissat clasifican todas las enzimas activas sobre carbohidratos ("Carbohydrate-Active enZYmes, CAZY") de secuencia conocida. Entre ellas se encuentran las glicosil hidrolasas (como las  $\beta$ -galactosidasas), estableciendo sus relaciones filogenéticas.

Familia de glicosidasas	Nº de entradas CAZY	Actividad enzimática conocida	Organismos en los que están presentes
<b>GH-1</b>	622	$\beta$ -glucosidasa <b><math>\beta</math>-galactosidasa</b> $\beta$ -manosidasa $\beta$ -glucuronidasa $\beta$ -D-fucosidasa...	Procariotas micetozoos hongos plantas nematodos insectos peces anfibios mamíferos
<b>GH-2</b>	636	<b><math>\beta</math>-galactosidasa</b> $\beta$ -manosidasa $\beta$ -glucuronidasa exo- $\beta$ -glucosaminidasa	
<b>GH-35</b>	183	<b><math>\beta</math>-galactosidasa</b>	
<b>GH-42</b>	62	<b><math>\beta</math>-galactosidasa</b>	Procariotas

**Tabla 4.1.** Características de las cuatro familias de glicosidasas en las que se distribuyen las  $\beta$ -galactosidasas conocidas.

Según esta clasificación las  $\beta$ -galactosidasas están repartidas en cuatro familias (GH-1, GH-2, GH-35 y GH-42) que pertenecen al clan GH-A (Tabla 4.1). Las enzimas pertenecientes a

este clan se caracterizan por tener un dominio denominado "TIM barrel", que incluye el centro catalítico y por realizar la reacción de hidrólisis manteniendo la configuración anomérica del sustrato.

Aproximadamente el 25% de las secuencias de  $\beta$ -galactosidasas depositadas en GenBank son de bacterias ácido lácticas, y todas ellas están incluidas en la familia 1, 2 ó 42. La familia 1 incluye además a las fosfo- $\beta$ -galactosidasas y las  $\beta$ -glucosidasas. La familia 2 contiene, entre otras, la  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*, la de *Streptococcus thermophilus*, la de *Bacillus megaterium* y la de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. La mayoría de las  $\beta$ -galactosidasas conocidas en plantas y animales pertenecen a la familia 35. Mientras que, la mayoría de las  $\beta$ -galactosidasas de organismos termofílicos están situadas en la familia 42.

#### **1.1.1. MbgA de *Bacillus megaterium***

Actualmente hay depositadas dos secuencias correspondientes al gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus megaterium* en la base de datos del NCBI ("National Center for Biotechnology Information"), con números de acceso AF047824 (cepa ATCC 14581; Shaw et ál., 1998) y AJ000733 (cepa DSM319; Strey et ál., 1999). La secuencia obtenida en el presente trabajo es idéntica a la depositada con el número de acceso AF047824 y similar en un 98% a la correspondiente al número de acceso AJ000733. Esto es lógico teniendo en cuenta que la cepa ATCC 14581 es equivalente a la CECT 4313<sup>t</sup>, cuyo ADN es el que se ha utilizado como molde para amplificar el gen.

La  $\beta$ -galactosidasa de *B. megaterium*, así como la de *E. coli*, pertenece a la familia 2 de las glicosil hidrolasas. Las  $\beta$ -

galactosidasas que pertenecen a esta familia comparten varias secuencias consenso correspondientes a varios dominios descritos como: "TIM barrel domain", "sugar binding domain", "N terminal domain", "C terminal domain" e "inmunoglobulin-like beta-sandwich domain". Estos dominios se han descrito basándose en la estructura tridimensional de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*. En la secuencia aminoacídica deducida del gen *mbgA* clonado se pueden localizar las secuencias correspondientes a estos dominios, los cuales están conservados casi en su totalidad (Fig. 4.1).

```

MLKTGKKFHYTAPANGYPEWNNNPEIFQLNRSKAHALLMPYQTVVEEALKNDRKSSVYYQ
SLNGSWYFHFHAENADGRVKNFFAPEFSYKKWDSISVPSHWQLQGYDYPQYTNVYYPWVE
NENLEPPFAPTKYNLSVSTSVLLHLNQNKGISPCTSASKGVESAFYVWINGEFVGYSED
SFTPAEFDITSYLQEGENTIAVEVYRWSASWLEDQDFWRMSGIFRVDVLYSTPQVHIY
DFSVRSSLDNNYEDGELSVSADILGCFEHDQDLTFEVMLYDANGQEVLRPLQTNLSV
SDQRTVSLRTHIKSPAKWSAESPPLYTLVLSLKNAAAGSIIETESCKVGFRTFELKNGLM
TINGKRIVLRGVNRHEFDSVKGRAGITREDMIHDILLMKQHNIKPVRTSHYPNDSVWYE
LCNEYGLYVIDETNLETHGTWYLYLQEGEQKAVPGSKPEWKENVLDRCSRMYERDKNHPS
IIIWSLGNESFGGENFQHMYYFFKEKDSTRLVHYEGIFHHRDYDASDIESIMYVKPADV
ERYALMNPKKPYILCYSHAMGNSCGNLYKYWELFDQYPILQGGFIWDWKDQALQATAE
DGTSYLAYGGDFGDTFNDGNFCGNGLIFADGTASPKIAEVKKCYQPVKWTAVDATKGF
AVQNKHLFTNLNAYDFVWTVEKNGELVEKHASLLNVAPDGTDELTSYPLYEQENEADE
FVLTLSRLSKDTAWASAGYEVAYEQFVLPAKAAMP SVKAAHPALTVNQNEQTLTVTGT
NFTAIFDKRKGQFISYNYERTELLASGFRPNFWRAVTDNDLGNKLHERCQTRQASLEQ
HVKKVIVQPVDFVVISVELALDNLASCYVYTYLYNDGKMKIEQSLAPSETMPEIPEI
GMLFTMNAAFDSLWYGRGPHENYWRKTGAKLALHKGSVKEQVTPYLRPQECGNKTDV
RWATIINDQGRGLIKGLPTVELNALPYSPPFELEAYDHFYKLPASDSVTVRVNYKQMGV
GGDSWQAKTHPDYTYLYANRSYTNFTLKL

```

. "sugar binding domain"  
 . "immunoglobulin-like beta-sandwich domain"  
 . "TIM barrel domain"  
 . "N terminal domain"  
 . "C terminal domain"

E Se han destacado en rojo los dos ácidos glutámicos catalíticos

**Figura 4.1.** Distribución sobre la secuencia aminoacídica deducida de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus megaterium* de los dominios descritos para la familia 2 de las  $\beta$ -galactosidasas.

Los dos aminoácidos que intervienen directamente en la catálisis, Glu 464 y Glu 531, están el dominio conocido como "TIM

barrel domain". El "sugar binding domain" es el dominio que contiene la zona de unión a la galactosa. El dominio "N-terminal domain" se encuentra en la porción amino-terminal de la cadena pequeña de las  $\beta$ -galactosidasas diméricas. El dominio "C-terminal domain" se encuentra en la porción carboxi-terminal de la cadena pequeña de las  $\beta$ -galactosidasas diméricas.

### **1.1.2. LacA de *Bacillus subtilis***

En *B. subtilis* se han descrito dos secuencias que codifican enzimas  $\beta$ -galactosidasas. Una de ellas, correspondiente al gen *lacA*, ha demostrado codificar una enzima activa (Vikha et ál., 1987). La otra secuencia, *yesZ*, fue identificada durante la secuenciación del genoma de este organismo (Kunst et ál., 1997). Se sospecha que es una  $\beta$ -galactosidasa porque presenta similitud en su secuencia con las  $\beta$ -galactosidasas de la familia 42.

Tras el análisis de la secuencia nucleotídica del gen clonado en el vector pBSU se observó que el 94% de los nucleótidos son iguales a los del gen depositado en el NCBI (nº de acceso NC\_000964) correspondiente a la cepa *B. subtilis subtilis* 168. Esta variabilidad entre genes de la cepa 168 y la utilizada en el presente trabajo (ATCC6633), no parece estar limitada a la secuencia del gen *lacA*, sino que parece ser "habitual" entre estas cepas. Comparando la secuencia de otros genes en diferentes cepas de *B. subtilis* se pueden observar diferencias del 6% y del 9% en la secuencia nucleotídica, como es el caso de los genes de la timidilato sintasa (*thyA*) y el gen de la azorreductasa (*azr*) respectivamente.

En el caso de las diferencias en la secuencia del gen *lacA* de la cepa ATCC6633, los cambios aminoacídicos producidos por estas diferencias son intrascendentes en el sentido de que, o son cambios sinónimos o afectan a aminoácidos no conservados en las proteínas pertenecientes a la familia de esta enzima. Tan sólo un cambio afecta a un aminoácido conservado perteneciente al dominio responsable de la actividad catalítica, pero está alejado de los aminoácidos con una implicación directa, hipotéticamente, en la catálisis.

```
MSKLEKTHVTGAKFMLHGGDYNPDQWLDRPDILADDITLMKLSHTNTFSVGIFAWSA
LEPEGVYQFEWLDDIFERIHSIGGRVILATPSGARPAWLSQTYPEVLRVNASRVKQ
LHGGRHNHCLTSQVYREKTRHINRLLAERYGNHPALLMWHISNEYGGEGCHDLCQHA
FREWLKSKEYDNSLALNHAWWTFWSHTFNDWSQIESPSPIGENGLHGLNLDWRRFV
TDQTI SFYENEI IIPLNELTPDIPITTNFMADTPDLIPYQGLDYSKFAKHVDVI SWDA
YPVWHDWESTADLAMKVGFINDLYRSLKQQPFLMECTP SAVNWHNVNKAKRPGMN
LLSSMQMIAHGSDSVLYFQYRKSRSSEKLGAIVDHDNSPKNRVFQEVAKTGETLE
RLSEVVGTRKPAETA ILYDWHNHWALEDAQGFAKATKRYAQTLLQOHYRTFWEHDIPV
DVI TKEQDFSPYKLLIVPMLYLI SEDTISRKLTFTANGGALVMTYISGIVNEHDLTY
TGGWHPDLQAIFGIEPLETDTLYPKDRNAVSYRSQTYEMKDYATVIDVKTASAEAVY
QEDFYARTPAVTSHQYQQGKAYF IGARLKDQFHRDFYEGLITDLSLSPVFPVVRHGKG
VSVQARQDQDNDYIFVMNFTEEKQLVTFDHSVKDMMTGDILSGDLTLEKYEVRIVVN
TH
```

“Dominio común entre las  $\beta$ -galactosidasas de la familia 42”

**Figura 4.2.** Secuencia aminoacídica deducida a partir del gen *lacA* de *Bacillus subtilis* clonado sobre el que se señala la secuencia conservada en las  $\beta$ -galactosidasas de la familia 42.

La  $\beta$ -galactosidasa *lacA* pertenece a la familia 42 de las glicósido hidrolasas de la que sólo se ha cristalizado la enzima de *Thermus thermophilus* A4 (Hidaka et ál., 2002). Esta familia, al igual que la familia 2, pertenece a la superfamilia GH-A. Sin embargo, en la familia 42, no se han descrito dominios tan definidos como en la familia 2. Tan sólo se ha descrito un dominio común formado por aminoácidos conservados en la mayoría de las  $\beta$ -galactosidasas pertenecientes a esta familia, sin que, hasta la

fecha, se hayan determinado qué aminoácidos intervienen exactamente en la actividad catalítica del enzima lacA. En la secuencia aminoacídica obtenida a partir del gen *lacA* clonado se puede localizar este dominio (Fig. 4.2).

### **1.1.3. LacZ de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus***

La primera secuencia de este gen depositada en la base de datos del NCBI está compuesta por 3 024 nucleótidos (nº de acceso: M23530) y fue clonado a partir del genoma de la cepa B131 (Schmidt et ál., 1989). Posteriormente se depositó una secuencia compuesta por 3 027 nucleótidos (nº de acceso: M55068), clonada esta vez a partir del genoma de la cepa ATCC 11842 (Leong-Morgenthaler et ál., 1991).

El gen clonado en el presente estudio tiene una secuencia idéntica al segundo caso (nº de acceso: M55068), y ambos se diferencian con respecto a la primera secuencia depositada (nº de acceso: M23530) en tan sólo la aparición de un aminoácido adicional (lisina) en la posición 905. El resultado es lógico puesto que nuestra cepa CECT 4005<sup>T</sup> es la misma que la ATCC 11842.

La  $\beta$ -galactosidasa de *L. d. bulgaricus*, al igual que la enzima de *B. megaterium*, pertenece a la familia 2 de las glicosil hidrolasas. Tal como hemos dicho anteriormente, las  $\beta$ -galactosidasas que pertenecen a esta familia comparten varias secuencias consenso correspondientes a varios dominios descritos como: "TIM barrel domain", "sugar binding domain", "N terminal domain", "C terminal domain" e "inmunoglobulin-like beta-sandwich domain". En la secuencia aminoacídica deducida del gen *lacZ* de *L. d. bulgaricus* clonado en el presente trabajo, también se

pueden localizar las secuencias correspondientes a estos dominios, los cuales están conservados casi en su totalidad (Fig. 4.3). La extensa cantidad de trabajos realizados, incluida su cristalización, sobre la enzima LacZ de *E. coli*, han permitido determinar que hay dos aminoácidos implicados directamente en el proceso catalítico: Glu 461, que actúa como donador de protón, y Glu 537, que actúa como nucleófilo (Juers et ál., 2001). Por similitud, estos sitios activos corresponden con el Glu 461 y el Glu 531 de la enzima de *L. d. bulgaricus* respectivamente.

```

MSNKLKVEKRVQADLAWLTDPEVYEVNTIPPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGD
WLIDYAENGGQGPVNFYAEDFDDSNFKSVKVPGNLELQGFQOPQYVNVQYFWDGSEEIFP
PQIPSKNPLASVVRVFDLDEAFWDKEVSLKFDGAATAIYVWLNHGFVGYGEDSFTPSEF
MVTKFLKKNRNLAVALYKYSSASWLEDQDFWRMSGLFRSVTLQAKPRLHLEDLKLTA
LTDNYQKGLVEANIAYRLPNASFKLEVRDSEGLVAEKLGPVIRSEQLEFTLADLPVA
AWSAEKPNLYQVRLYLYQAGSLLVSRQEVGFRNFELKDGIMYLNQRTIVFKGANRHEE
DSKLGRAITEEDMIWDIKTMKRSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDEANLESH
GTWEKVGGHEDPSFNVPGGDQHWLGASLSRVKNMMARDKNHASILIWSLGNISYAGTVF
AQMADYVRKADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYAPAKVIEEYLTNPKAKPFISV
LYAHAMGNSVGDLAAYTALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLLYGGDFDDRPTDYE
CGNGLVFAADRTESPKLANVKALYANLKLEVKDGGQLFLKNDNLFNTSSSYFLTSLLDVG
KLTYSRPLTFGLEPGESGTFALPWPEVADEKGEVVYRVTAHLKEDLPWADEGFTVAEA
EEVAQKLPEFKPEGRPDLVSDYNLGLKGNFQILFSKVKGWVPSLKYAGREYLKRLPE
FTFWRALTDNDRGAGYGYDLARWENAGKYARLKDISEVKEKEDSVLVKTAFVLPVAKGD
LTVTYEVDGRGKIAVTADFPGAEEAGLLPAFGLNLALPKELTDYRYYGLGPNESYPDRF
EGNYLGIYQGAVKKNFSPYLRPQETGNRSKVRWYQLFDEKGGLEFTANGADLNLALP
YSAAQIEAADHAFELTNNYTWVRALSAQMGVGGDDSWGQKVHPEFCLDAQKARQLRLVI
QPLLLK

```

. “sugar binding domain”  
 . “immunoglobulin-like beta-sandwich domain”  
 . “TIM barrel domain”  
 . “N terminal domain”  
 . “C terminal domain”  
 E Se han destacado en rojo los dos ácidos glutámicos catalíticos

**Figura 4.3.** Distribución sobre la secuencia aminoacídica deducida de la  $\beta$ -galactosidasa de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* de los dominios descritos para las  $\beta$ -galactosidasas pertenecientes a la familia 2.

## **2. Expresión heteróloga de $\beta$ -galactosidasas**

### **2.1. Expresión heteróloga de $\beta$ -galactosidasas en *Pichia pastoris***

*Pichia pastoris* se ha revelado en la última década como un sistema de expresión muy eficaz para la producción de proteínas heterólogas. Esto es debido a que tiene uno de los promotores conocidos más eficientes y fuertemente regulados, concretamente, el promotor derivado del gen regulado por metanol de la alcohol oxidasa 1 (AOX1).

En general, *P. pastoris* no es considerado un hospedador adecuado para expresar genes bacterianos, especialmente utilizando la vía de la secreción extracelular. Esta limitación se debe a que el plegamiento, la glicosilación y otras modificaciones postraduccionales que lleva a cabo esta levadura, podrían afectar gravemente a la estructura actividad de la proteína producida. Sin embargo, 30 proteínas bacterianas han sido expresadas exitosamente en *P. pastoris* (tres del género *Bacillus* y ninguna del género *Lactobacillus*), y 18 de ellas han sido secretadas al medio extracelular.

Un ejemplo es la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis*, enzima con la que se alcanzó un rendimiento de 2,5 g/l, de proteína secretada, utilizando la secuencia señal del gen SUC2 de *Saccharomyces cerevisiae* para dirigir la proteína híbrida al medio extracelular (Paifer et ál., 1994). Otro ejemplo de enzima de un organismo cercano al género *Bacillus* es la D-alanina carboxipeptidasa de *Geobacillus stearothermophilus*. Esta proteína se secretó al medio extracelular en *P. pastoris* alcanzándose una producción de 0,1 g/l. Se comprobó además que no existen

diferencias entre la proteína producida y la proteína nativa en estructura y actividad (Despreaux y Manning, 1993).

Hasta el día de hoy se han expresado de forma heteróloga con este sistema aproximadamente 447 proteínas (<http://faculty.kgi.edu/cregg/Pichia2004.htm>) (Tabla 4.2).

Origen de la proteína	Nº de proteínas expresadas en <i>P. pastoris</i>	Secretadas	Intracelulares
Bacterias	30	18	12
Hongos	51	46	5
Protistas	8	4	4
Algas	4	1	3
Plantas	58	44	14
Invertebrados	36	26	10
Vertebrados (no humanos)	92	71	21
Humano	133	108	25
Virus	16	10	6

**Tabla 4.2.** Proteínas expresadas heterológamente en *P. pastoris*.

Estos antecedentes hicieron que decidiéramos seleccionar, como primera opción, la levadura *P. pastoris*, como hospedador en nuestros experimentos de expresión de  $\beta$ -galactosidasas bacterianas.

En los tres casos abordados en nuestros ensayos, la expresión de cada uno de los genes bacterianos introducidos en *Pichia pastoris* generó enzimas activas, con masas moleculares aparentes en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), similares a las masas moleculares deducidas de la

secuencia nucleotídica de los genes correspondientes. Este resultado demostró que *P. pastoris* es un hospedador adecuado para la expresión de las  $\beta$ -galactosidasas de *Bacillus subtilis* (LacA), *Bacillus megaterium* (MbgA) y *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* (LacZ); sin que modificaciones postraduccionales que puede llevar a cabo esta levadura generen enzimas inactivas.

En los tres genes expresados en el presente trabajo se han obtenido las siguientes producciones medias de proteína extracelular: 0,134 g/l para el LacA, 0,133 g/l para el MbgA y 0,129 g/l para el LacZ. Estos valores son similares a los obtenidos para otras enzimas: 0,1 g/l para la D-alanina carboxipeptidasa de *Geobacillus stearothermophilus* (Despreaux y Manning, 1993), 0,078 g/l para la neurotoxina BoNT del serotipo A y B de *Clostridium botulinum* (Smith, 1998) y 0,079 g/l para la enterotoxina del cólera Ace de *Vibrio cholerae* (Trucksis et ál., 1997).

Por otro lado, la actividad específica intracelular obtenida en las tres expresiones realizadas en *Pichia* fue de 133 U/mg para el MbgA, 96 U/mg para el LacA y 115 U/mg para el LacZ (Fig. 3.12., 3.16. y 3.33). Estas cantidades de enzima no fueron suficientes para hacer ensayos posteriores. Además, dichas proteínas no fueron eficientemente secretadas (la proporción de enzima secretada no supera el 20% en ninguno de los tres casos).

La baja actividad detectada puede ser debida a que haya un bajo número de copias del "cassette" de expresión en la cepa hospedadora. Este problema se podría solventar seleccionando clones con un alto número de copias. Otro factor que podría haber influido es la importancia de las regiones no traducidas 5' y 3' del

ARNm (UTR, "untranslated regions"), cuya solución habría sido la clonación del gen con la secuencia adyacente en el extremo 3' por ejemplo. Existen otros factores como, el lugar y el modo de integración en el cromosoma del "cassette" de expresión, el contexto del codón de iniciación (AUG) de la traducción, la naturaleza de la señal de secreción, la actividad proteasa endógena, y la fisiología de la cepa hospedadora, que descartamos debido a que son independientes del gen clonado en cuestión y su eficacia está respaldada por numerosos trabajos (Sreekrishna et ál., 1997). Por último, el medio y las condiciones de crecimiento, y los parámetros de fermentación se podrían optimizar para incrementar en cierta medida la productividad general del sistema.

El problema de la escasa secreción de proteína al medio extracelular ha sido descrita anteriormente (Cereghino y Cregg, 2000). Se ha propuesto que la proximidad de residuos de prolina a las dianas de las peptidasas encargadas de separar el péptido señal de la proteína (Lys-Arg para la Kex2 y Glu-Ala para la Ste13) puede influir en la eficiencia de dichas peptidasas.

Como se puede observar en las figuras 3.7, 3.8 y 3.9, no aparecen prolinas en las cercanías de las dianas de las peptidasas en nuestras construcciones. Adicionalmente, y probablemente sea nuestro caso, la estructura terciaria formada por la proteína de interés podría proteger dichas dianas de las respectivas proteasas. La posibilidad de mejorar nuestro sistema habría consistido en diseñar un péptido señal de mayor longitud que ampliara la distancia entre las dianas y la proteína de interés.

Este procedimiento ha sido utilizado para evitar los problemas de secreción que presentaba la insulina humana al ser producida por este sistema de expresión (Kjeldsen et ál, 1999).

## **2.2. Expresión heteróloga de $\beta$ -galactosidasas en *Escherichia coli***

Como alternativa al sistema de expresión en *Pichia pastoris*, decidimos utilizar *Escherichia coli* como hospedador para la producción de las enzimas  $\beta$ -galactosidasas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*.

Los tres genes seleccionados (*lacA*, *mbgA* y *lacZ*) expresados en *Escherichia coli* BL21(DE3)<sup>w</sup> dieron lugar a la producción de proteínas del tamaño esperado (ver sección 3.19) y, en los tres casos, se pudo detectar actividad enzimática. La producción de enzimas heterólogas varió entre las 5-10 U/ml de los transformantes tBT143 y tBT144, expresando los genes de *B. subtilis* y *B. megaterium*, respectivamente, y las 5-69 U/ml de los transformantes tBT145, expresando el gen de *L. d. bulgaricus*.

A diferencia de los resultados obtenidos con el sistema de expresión en *P. pastoris*; en *E. coli* pudimos comprobar la existencia de diferencias significativas en el nivel de producción enzimática entre distintos clones expresando la misma  $\beta$ -galactosidasa. Estas diferencias fueron más notables en el caso de los transformantes tBT145, en los que determinamos variaciones en los valores de actividad por mililitro de extracto celular cercanos al 1000% (aprox. 5 U/ml en el clon tBT145-1 y 55 U/ml en el clon tBT145-9).

## **2.3. Purificación de $\beta$ -galactosidasas**

En los extractos proteicos de cada una de las  $\beta$ -galactosidasas expresadas heterológamente aparecían numerosas

proteínas propias de las células hospedadoras. Con el fin de obtener fracciones de  $\beta$ -galactosidasa más puras producidas decidimos utilizar un sistema de purificación basado en una agarosa con restos tiogalactósidos por los que este tipo de enzimas tiene afinidad.

Como resultado de la purificación con columna de afinidad, que en un principio debería haber sido altamente específica, obtuvimos un grado de purificación relativamente pobre, tal como se puede observar por la aparición de numerosas bandas de proteína en el gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (Fig. 3.22).

La mejor fracción, la número 3, mostró un 14,3% de la actividad total y un 4,5% de la cantidad de proteína total. La suma de las fracciones 2-6 constituye un 36% de la actividad total y el 21,8% de la cantidad de proteína total. Esto supone una pérdida del 64% de la actividad inicial, a pesar de conseguir un grado de purificación de 3,2 para la fracción 3 y del 1,9 para el conjunto de las fracciones 2-6. Esta pérdida de actividad puede atribuirse al elevado pH del tampón de elución (borato sódico 0,1 M pH 10) que habría afectado irreversiblemente a la actividad de la enzima purificada.

Este sistema de purificación no ha respondido, por su ineficacia en relación a su coste, a los requerimientos esperados para su aplicación en nuestro laboratorio y mucho menos a nivel industrial.

#### **2.4. Determinación de la masa molecular de la proteína lacA de *Bacillus subtilis***

Vikha et ál. (1987) determinaron, mediante cromatografía por filtración en gel, una masa molecular de 215 kDa para la  $\beta$ -galactosidasa producida de forma nativa por *Bacillus subtilis*. Este mismo grupo estimó una masa molecular, para esta misma enzima, de 105 kDa mediante electroforesis en un gel desnaturizante.

En nuestro trabajo, hemos observado claramente que la banda correspondiente a la  $\beta$ -galactosidasa expresada en *E. coli* estaba comprendida entre las bandas del patrón correspondientes a 97,4 y 66,2 kDa. Además, hemos calculado mediante cromatografía por gel-filtración, una masa molecular de 80,07 kDa para la proteína LacA nativa. Este último resultado se aproxima más a la masa molecular predicha por la secuencia aminoacídica: 79 022,1 Da.

*Bacillus subtilis* produce otra  $\beta$ -galactosidasa, codificada por el gen *yesZ* (Kunst et ál., 1997). La cadena polipeptídica calculada a partir de la secuencia aminoacídica de esta proteína es de 74,098 kDa, valor que dista aún más de la masa molecular descrita por Vikha et ál. (1987).

Dado que no aparece actividad  $\beta$ -galactosidasa en ninguna otra fracción de elución se puede afirmar que la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus subtilis* es una enzima monomérica de masa molecular 79-80 kDa valor que difiere de los valores determinados por los investigadores citados anteriormente.

### 3-Mutación dirigida

Una de las aplicaciones directas de la mutación dirigida es la confirmación de la importancia de determinados aminoácidos como esenciales para la actividad de la enzima.

Así, por ejemplo, se ha confirmado que el Glu 461 de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, era esencial para la actividad enzimática. Según el aminoácido por el que era cambiado se podía determinar cuál era el papel del Glu 461 en la catálisis (Cupples et ál., 1990). Si se sustituía por una Asp, se introducía una cadena lateral con una carga negativa idéntica. Sin embargo, la cadena del Asp es más corta que la del Glu, por lo que se hacía presente una cavidad antes inexistente. La sustitución con Gly hacía que desapareciera la cadena lateral al completo. Esto abría también una cavidad. En ambos casos, esta cavidad podía colapsarse y ser rellenada. Si se sustituía con Gln no se producía ese espacio. Si se sustituía con His, aparecía un grupo capaz de donar electrones, y era más nucleófilo que el propio Glu porque la densidad electrónica de los nitrógenos de la His es mayor que la de los oxígenos del Glu. Todos estos cambios producían enzimas con muy baja actividad (menos del 0,3% del original en el mejor de los casos). Además, todas las sustituciones daban lugar a enzimas menos estables (55°C) que la salvaje. Esto no es extraño puesto que el estado del sitio activo en la mayoría de las enzimas es muy importante para su estabilidad (Yao et ál., 1984).

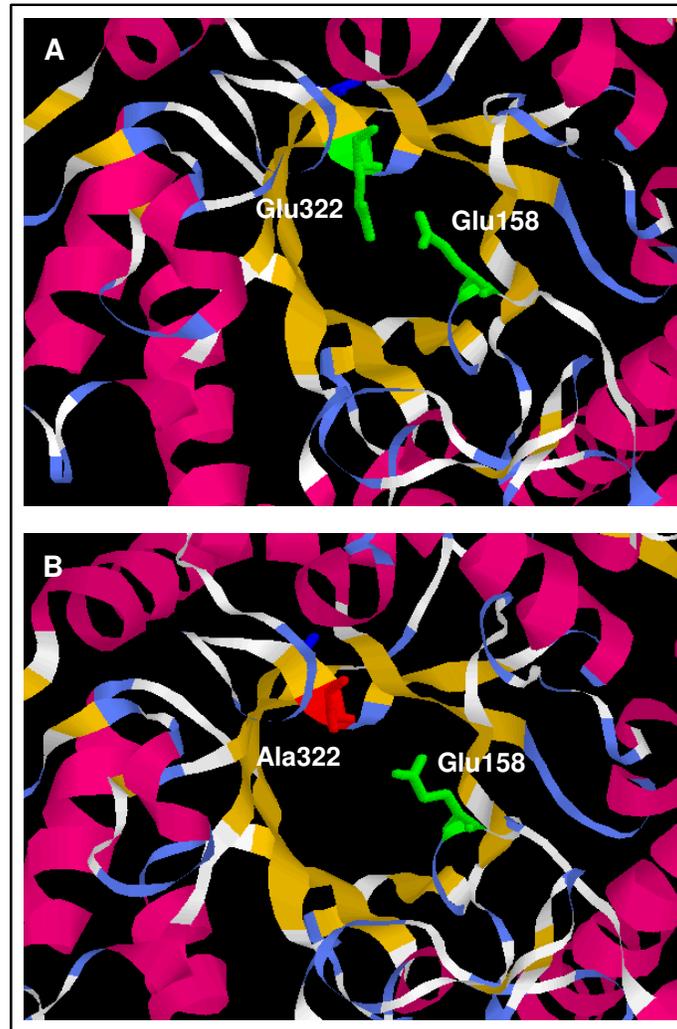
La  $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* A4 (Hidaka et ál., 2002) es la única glicósido hidrolasa de la familia 42 que ha sido cristalizada hasta el día de hoy. En ella se han descrito dos residuos de ácido glutámico esenciales para la reacción hidrolítica:

Glu 141 y Glu 312.

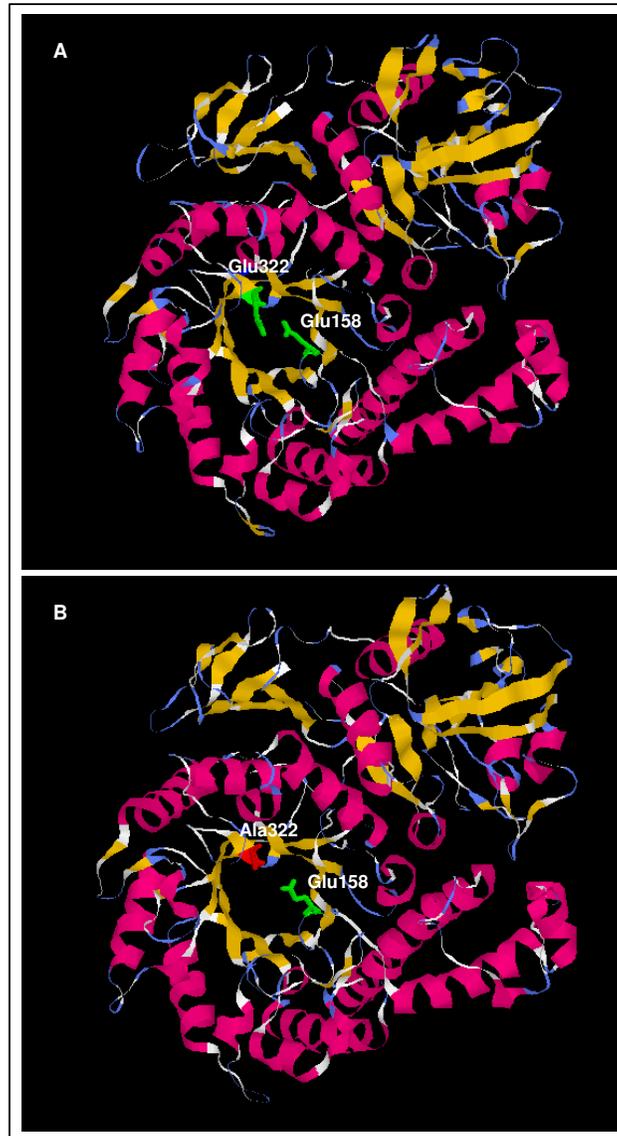
Mediante el análisis de la secuencia aminoacídica de regiones conservadas en la  $\beta$ -galactosidasa de *B. subtilis* (familia 42) con secuencias depositadas en bases de datos, se dedujo que el Glu 322 podría actuar como nucleófilo en la reacción de hidrólisis.

Con el fin de confirmar esta hipótesis, se diseñó un experimento de mutación dirigida en dicho aminoácido, potencialmente localizado en el centro activo, para analizar posteriormente la actividad hidrolítica del mutante resultante. Al expresar la proteína mutante en un sistema heterólogo carente actividad  $\beta$ -galactosidasa, se pudo comprobar que el cambio del Glu 322 por una Ala provocaba una pérdida de la actividad hidrolítica del enzima.

Estudios previos (Mackenzie et ál., 1998), indican que la sustitución del sitio activo carboxilado nucleofílico por un aminoácido de cadena no nucleofílica resulta en una enzima de plegamiento correcto pero que es hidrolíticamente inactiva, ya que no puede formar el intermediario glicosil-enzima. Sin embargo, como el resto del sitio activo está intacto puede catalizar la unión de un derivado glicosídico activado, con el que se puede formar el intermediario glicosil-enzima, a un azúcar aceptor apropiado. Por este motivo, uno de nuestros próximos objetivos es analizar si la nueva enzima puede actuar como glicosintasa, y si así fuera, frente a qué tipo de sustratos.



**Figura 4.4.** Localización del cambio producido sobre el aminoácido nucleófilo Glu 322 del centro activo de la  $\beta$ -galactosidasa *lacA* de *Bacillus subtilis* por una Ala sobre la estructura tridimensional del centro activo.



**Figura 4.5.** Localización del cambio producido sobre el aminoácido nucleófilo Glu 322 del centro activo de la  $\beta$ -galactosidasa *lacA* de *Bacillus subtilis* por una Ala sobre la estructura tridimensional de la proteína.

#### **4. Obtención, selección y análisis de las variantes termoestables de $\beta$ -galactosidasa mediante evolución dirigida.**

##### **4.1. Generación de variantes de la $\beta$ -galactosidasa de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus***

Tras clonar y expresar en distintos sistemas las  $\beta$ -galactosidasas lacA, mbgA, y lacZ, se decidió escoger la enzima de *L. d. bulgaricus* (lacZ) para los experimentos de obtención de variantes termoestables que se han presentado en esta memoria. Esta decisión se sustentó en que esta enzima fue la que se expresó más eficientemente en *E. coli*, por proceder de un organismo con reconocimiento GRAS y, como hemos demostrado en nuestros experimentos, por ser capaz de sintetizar GOS.

Una de las primeras dudas que surge a la hora de generar una genoteca de variantes de la enzima a modificar es el grado de mutación que estas variantes deben poseer con respecto al gen salvaje. Está descrito que para analizar la relación estructura-función, se genera el cambio de un solo aminoácido (1-2 cambios nucleotídicos) por gen; mientras que para evolución dirigida se emplean típicamente frecuencias de mutación de uno a cuatro cambios aminoácidos (2-7 cambios nucleotídicos) por gen (Wan et ál., 1998).

Para obtener una colección de variantes del gen lacZ con una tasa de mutación adecuada, nuestra primera opción fue utilizar la cepa *Escherichia coli* XL1-Red. Esta cepa se caracteriza por ser deficiente en tres de las primeras rutas de reparación del ADN, por lo que acumula mutaciones producidas durante la replicación, tanto del genoma bacteriano como del ADN exógeno.

Tras analizar la tasa de mutación generada por este sistema y comprobar que era baja (0,1 mutaciones por kilobase) concluimos que este sistema no era el adecuado para obtener un gran número de variantes. Desconocemos los motivos por lo que nuestros resultados no se han ajustado a lo descrito por el fabricante de este sistema de generación de variabilidad.

Nuestra segunda opción en este sentido fue la utilización de un sistema de mutación basado en una ADN polimerasa con alto grado de error (Mutazyme). Se realizó una primera ronda de mutación en la que se obtuvo una media de 1,2 mutaciones puntuales por kilobase. Tomando como molde los genes de la primera ronda, se hizo una segunda y definitiva ronda de mutación y se obtuvo una media de 2,5 mutaciones por kilobase. Dado que el gen consta de 3 kb, se esperarían en este último caso unas 7,5 mutaciones en total, que podrían suponer entre cero y ocho cambios aminoacídicos. La distribución de las mutaciones a lo largo de la cadena nucleotídica fue uniforme. La tasa de mutación obtenida y la distribución de las mutaciones eran adecuadas para nuestro experimento de evolución dirigida.

Como resultado del análisis de las 12 kb secuenciadas de las variantes de la primera ronda de mutación, se pudo calcular una relación (AT→GC/GC→AT) de 1, lo cual es cinco veces superior a lo descrito para esta polimerasa. Esta diferencia puede deberse a que la cantidad de ADN secuenciada no sea suficiente. En un principio no consideramos que fuera a afectar a nuestros resultados. Sin embargo, el ratio Ts/Tv obtenido si estaba dentro de los márgenes esperados (0,8-1,2), en nuestro caso es igual a 1, sin que exista una preferencia de la incorporación de transiciones (purina por

purina o pirimidina por pirimidina) sobre transversiones (purina por pirimidina o pirimidina por purina).

#### **4.2. Selección de las variantes termoestables de la $\beta$ -galactosidasa lacZ**

El número de clones analizados y el número de mutaciones producidas han sido suficientes para obtener un número aceptable de variantes positivas.

El tratamiento a temperaturas elevadas de los extractos celulares para determinar la termoestabilidad de la proteína se ha realizado mediante incubación en un termociclador. Esto ha supuesto un problema técnico debido al alto número de cultivos a analizar. Sin embargo, este sistema ha permitido conseguir un mayor control sobre la temperatura de incubación en comparación con otros sistemas como estufas o baños termostatizados.

El hecho de haber analizado un alto número de clones y de que no se hayan obtenido falsos positivos tras tres rondas de selección, nos hace concluir que el sistema de selección ha sido suficientemente robusto para el presente trabajo. Sí habría que destacar el grado de sensibilidad que ha ofrecido el termociclador ya que, nos ha permitido seleccionar variantes en las que el incremento de la termoestabilidad sobre la proteína salvaje ha sido tan sutil como uno o dos grados de diferencia.

La detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, en la que hemos utilizado el sustrato cromogénico oNPG, unida a la utilización de espectrofotómetro nos permitió cuantificar los resultados obtenidos para poder discriminar con cierta fiabilidad a las mejores variantes. Este sistema ha sido bastante constante en

su respuesta y consideramos que también ha sido adecuado para este sistema de selección.

### **4.3. Análisis de los cambios aminoacídicos producidos con respecto a la mejora en la termoestabilidad de las variantes de la $\beta$ -galactosidasa lacZ obtenidas**

#### **4.3.1. Variabilidad natural de la termoestabilidad de las enzimas naturales**

El grado de estabilidad frente a altas temperaturas de las  $\beta$ -galactosidasas puede variar enormemente (Tabla 4.3).

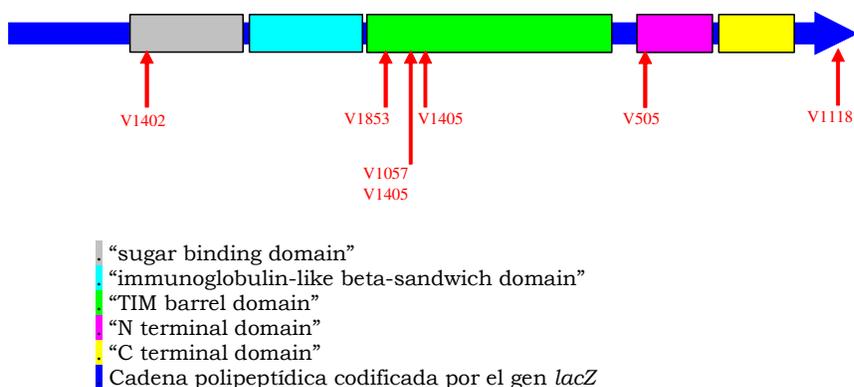
<b>Organismo</b>	<b>Tiempo de incubación</b>	<b>T<sup>a</sup></b>	<b>Actividad residual</b>	<b>Referencia</b>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	24 h	45,5°C	0%	Ohmiya, 1977
<i>Bacillus subtilis</i>	30 min	55°C	85%	Anema, 1964
	5 min	60°C	0%	
<i>Escherichia coli</i>	9 min	50°C	6%	Cohn, 1950
	1 min	55°C	0%	
<i>Thermotoga maritima</i>	16 min	90°C	50%	Kim et ál., 2004
	16 h	80°C	0%	

**Tabla 4.3.** Algunos ejemplos sobre la variabilidad del grado de estabilidad frente a altas temperaturas de las  $\beta$ -galactosidasas.

Algunas enzimas como la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*, tienen una gran importancia industrial, a pesar de mostrar una baja termoestabilidad. Frente a estas enzimas, las  $\beta$ -galactosidasas de organismos termófilos, como *Thermotoga maritima*, poseen una elevada resistencia a temperaturas

extremas y a solventes orgánicos; aunque de momento su utilización en la industria alimenticia está sujeta a que sea demostrada su inocuidad para el ser humano.

Las secuencias de enzimas hipertermofílicas y mesofílicas, exceptuando diferencias filogenéticas, son relativamente similares (40-85%), y generalmente, muestran estructuras tridimensionales superponibles y comparten los mismos mecanismos catalíticos (Vieille et ál., 1995). Esto permite explicar como, en algunos casos, unos mínimos cambios aminoacídicos en la secuencia de una enzima pueden mejorar su estabilidad térmica sin alterar significativamente su actividad enzimática.



**Figura 4.6.** Localización de las mutaciones correspondientes a las distintas variantes obtenidas mediante evolución dirigida a partir de la proteína *lacZ* de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*.

En las variantes termoestables obtenidas en el presente trabajo (figura 4.6) hemos localizado sólo un cambio aminoacídico para cada una de ellas con respecto a la secuencia de la enzima salvaje. Tan sólo la variante V1405 presentaba dos cambios

aminoácidos. Estos cambios pueden haber incrementado la termoestabilidad de dichas variantes de la enzima lacZ de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* a través de varios mecanismos que trataremos a continuación.

#### **4.3.2. Mecanismos que afectan a la termoestabilidad**

Los principales mecanismos implicados en la termoestabilidad de una enzima son: la rigidez, la hidrofobicidad, las fuerzas estabilizadoras intrínsecas (puentes disulfuro, puentes salinos, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas) y las fuerzas estabilizadoras extrínsecas (sales, altas concentraciones de proteína, coenzimas, sustratos, activadores y estabilizadores generales como la termamina (Vieille et ál, 1996)).

Se ha pensado que la composición aminoácida total del conjunto de la proteína podría influir en la termoestabilidad enzimática pero como se verá más adelante esta hipótesis aún dista mucho de ser confirmada. Sin embargo, sí se ha podido comprobar cómo la sustitución "in vitro" de determinados aminoácidos ha contribuido a la mejora de la termoestabilidad de la enzima debido a la contribución puntual que puede producir su residuo al descenso de la entropía general de la proteína. Existen además, otros elementos que afectan a la termoestabilidad relacionados con la orientación de las hélices  $\alpha$ , la influencia de iones metálicos, la glicosilación o la posición de las regiones N y C terminales.

#### **4.3.2.1. Rigidez**

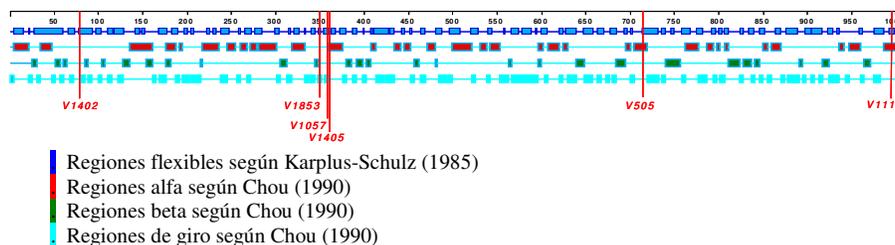
Una hipótesis actual postula que las enzimas hipertermofílicas son más rígidas que sus homólogas mesofílicas a temperaturas mesofílicas y que la rigidez es un prerequisite para una proteína altamente termoestable.

Esta hipótesis ha ido cobrando fuerza a medida que han ido apareciendo datos experimentales (Gershenson et ál., 2000; Manco et ál., 2000). También se ha propuesto que una excesiva rigidez explicaría por qué las enzimas hipertermófilas son a menudo menos activas a bajas temperaturas. Se ha observado que al añadir agentes desnaturalizantes (Beauchamp et ál., 1997) o detergentes (De Montigny y Sygusch, 1996) algunas de estas enzimas se activan aunque no estén a temperaturas óptimas. Sin embargo, en unas pocas enzimas hipertermofílicas se ha visto que son más activas que sus homólogas mesofílicas a 37°C (Ichikawa y Clarke, 1998). En estos casos, la alta actividad catalítica a temperaturas mesofílicas sugiere que estas enzimas combinan una flexibilidad local en su sitio activo (que es el responsable de la actividad a bajas temperaturas) con una rigidez del resto (que es responsable de la termoestabilidad). La existencia de estas enzimas sugiere que la termoestabilidad no es incompatible con una alta actividad a temperaturas moderadas (Giver et ál., 1998).

En el presente trabajo, hemos aplicado el modelo de Karplus-Schulz (1985), que predice las regiones flexibles de las proteínas, a las secuencias de la cadena polipeptídica de la enzima lacZ salvaje y de las variantes termoestables obtenidas. Según las predicciones realizadas siguiendo este modelo se puede afirmar que los cambios aminoacídicos producidos en las variantes no están implicados en un cambio de la flexibilidad de la cadena

polipeptídica (Fig. 4.7), con la única excepción del cambio en la posición 350 en la variante V1853 (Fig. 4.9). Además, pudimos observar que todos los cambios aminoacídicos producidos, salvo el de la posición 361 de V1405, se han producido sobre una región posiblemente flexible.

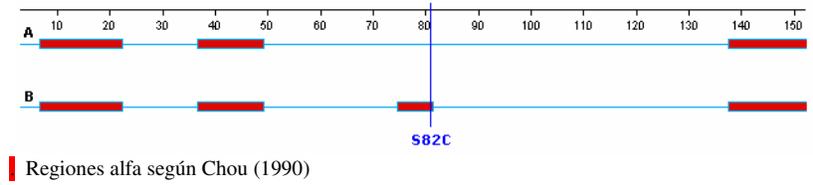
Se ha estudiado la participación de los residuos individuales en las estructuras helicoidales como un mecanismo importante en la estabilidad. En la comparación realizada entre las estructuras proteínicas de mesófilos e hipertermófilos (Facciano et ál., 1998) se observó que las hélices de las proteínas termofílicas son generalmente más estables que las de las proteínas mesofílicas. Detectaron, además, que aparecían menos residuos ramificados en  $\beta$  (Val, Ile y Thr) en las hélices de las proteínas termofílicas (los residuos ramificados en  $\beta$  no son bien tolerados en las hélices por su linealidad).



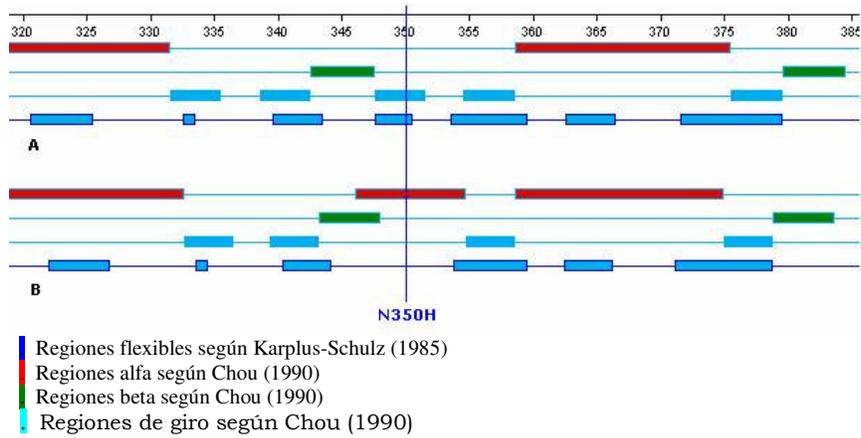
**Figura 4.7.** Representación de distintas regiones la cadena polipeptídica de la enzima lacZ de *L. d. bulgaricus* atendiendo a la flexibilidad predicha por el modelo de Karplus y Schulz (1985), y a la estructura secundaria predicha por el modelo de Chou (1990). Se destacan con una línea vertical las posiciones de los cambios correspondientes a cada una de las variantes.

Para poder dilucidar cómo habrían afectado los cambios aminoacídicos a la estructura secundaria de las enzimas, aplicamos el modelo de Chou (1990) tanto a la secuencia aminoacídica de la

proteína salvaje como a las secuencias aminoacídicas de las variantes termoestables (Fig. 4.7).



**Figura 4.8.** Estructura secundaria del inicio de la cadena polipeptídica de la proteína lacZ salvaje (A) sobre la cadena polipeptídica de la variante V1402 (B) en la que se destaca cómo el cambio S82C ha generado una región de tipo hélice alfa (cuadrado rojo) según las predicciones del modelo de Chou (1990).



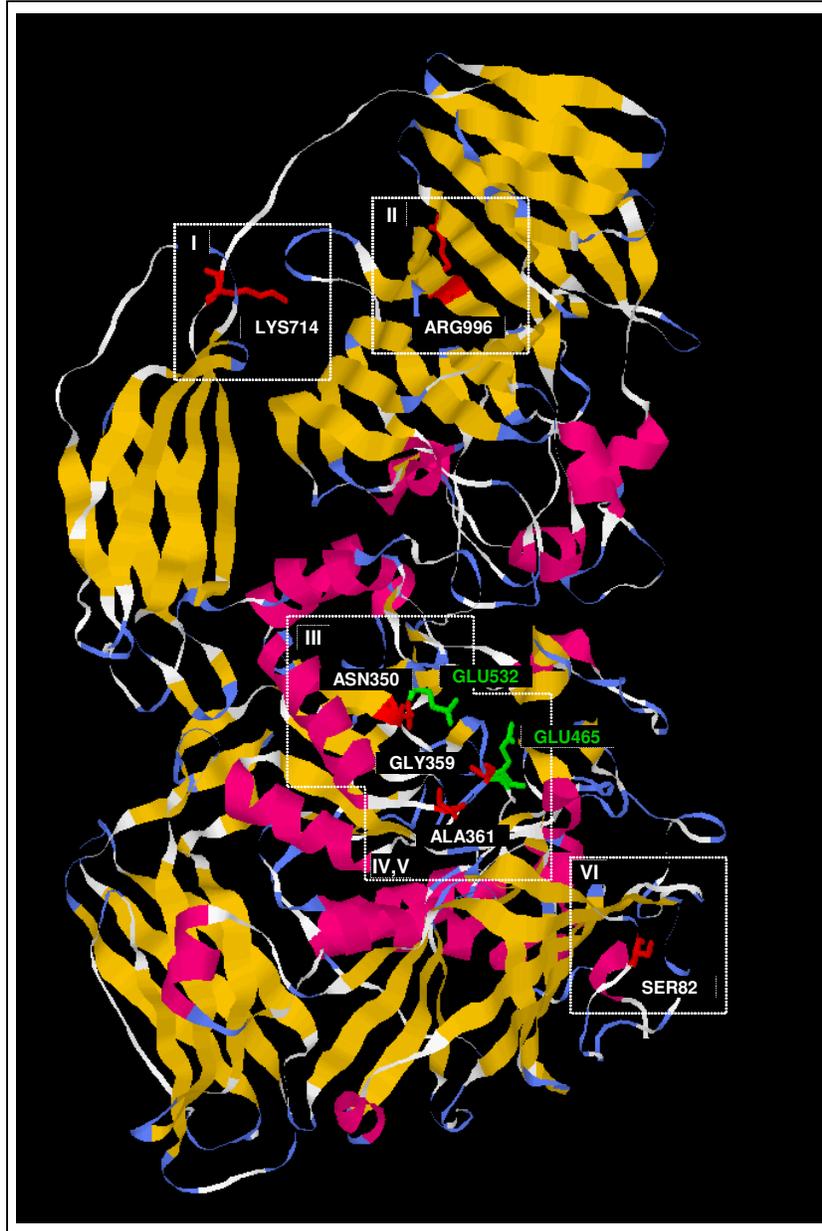
**Figura 4.9.** Estructura secundaria (alfa, beta y giros) y regiones flexibles de una región de la cadena polipeptídica de la proteína lacZ salvaje (A) sobre la cadena polipeptídica de la variante V1853 (B) en la que se destaca cómo el cambio N350H habría generado una región de tipo hélice alfa (cuadrado rojo) según las predicciones del modelo de Chou (1990) haciendo desaparecer un giro y un punto de flexibilidad de la cadena polipeptídica.

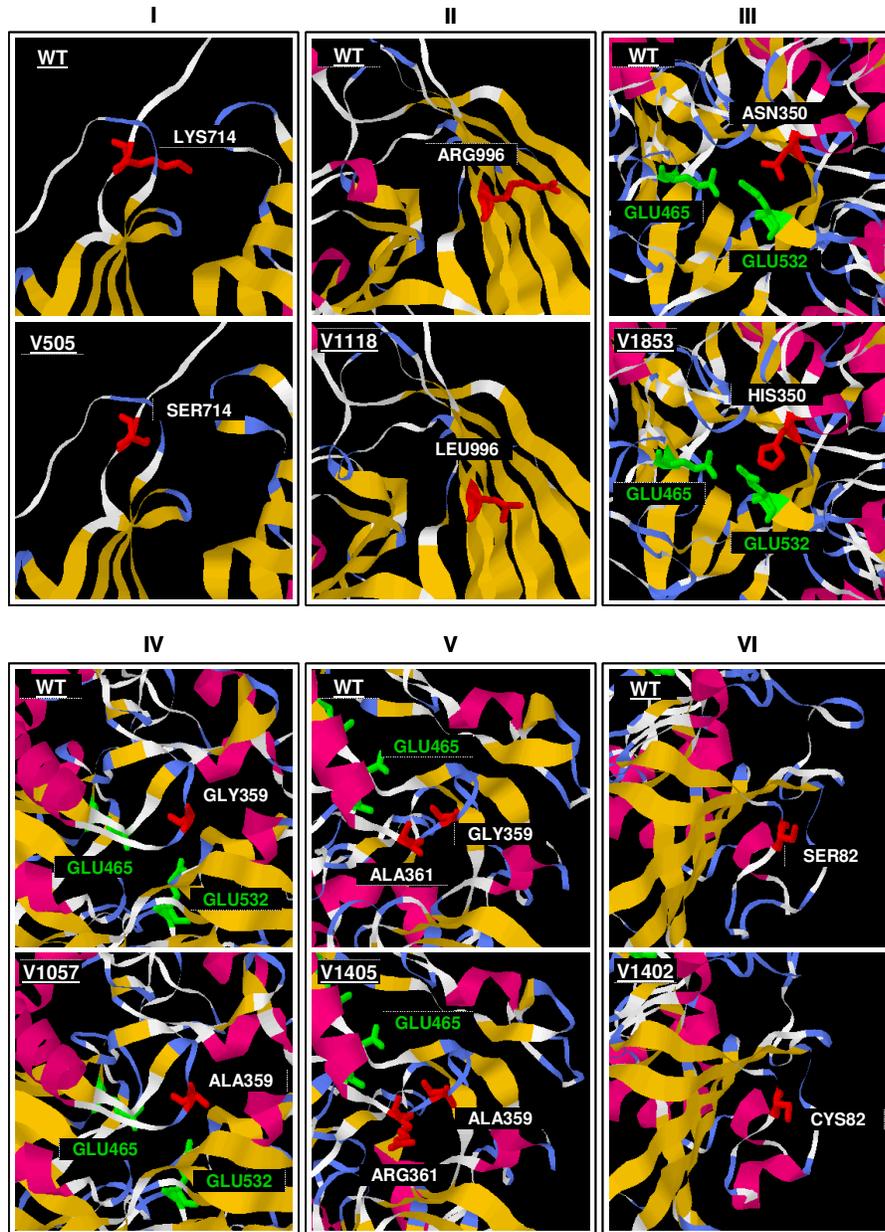
En ninguna variante se observó variación alguna en la estructura secundaria salvo en las variantes V1402 y V1853. En la variante V1402, el cambio de Ser a Cys en la posición 82 (fig. 4.8) habría generado, según este modelo, una región de tipo hélice alfa. Como dijimos anteriormente, este cambio no ha afectaría, según el modelo de Karplus-Schulz, a la flexibilidad en ese punto de la proteína termoestable. Pudimos observar además, que el cambio que había producido una pérdida de flexibilidad en el mutante V1853, tenía su reflejo a nivel de estructura secundaria en la que desaparece una región predicha como giro de la cadena polipeptídica siendo sustituida por una hélice alfa.

Es complicado considerar que el incremento en la termoestabilidad de la variante V1402 sea debido a un incremento en la rigidez dado que no se observa una pérdida de flexibilidad según el modelo de Karplus-Schulz. Sin embargo, esto sí ocurre con la variante V1853 en la que se puede observar como la pérdida de una región de giro, y parece ser que a la vez flexible, habría incrementado puntualmente la rigidez de la proteína. Si bien es cierto que la aplicación de distintos algoritmos puede ofrecer resultados distintos, hemos intentado aplicar en este trabajo aquellos modelos que nos han parecido más estrictos.

Hemos aplicado el programa EsysPred3D (Lambert et ál., 2002) para obtener la predicción de la posible estructura tridimensional de la proteína lacZ de *L. d. bulgaricus*. En ella hemos localizado las mutaciones y hemos observado que no se producen cambios significativos a nivel de estructura secundaria salvo para la mutación Ser82Cys en la que se genera una estructura en alfa hélice en la variante V1402. Tal como se puede

ver en la figura 4.5, este mismo resultado lo hemos obtenido aplicando el modelo de Chou (1990).





#### **4.3.2.2. Hidrofobicidad**

El efecto de la hidrofobicidad está considerado como el principal elemento del plegamiento de la proteína (Pace et ál., 1996). La hidrofobicidad conduce a la proteína a una estructura plegada en la que la estructura nativa es resultado de la contribución de todos los tipos de fuerzas (puentes de hidrógeno, interacciones iónicas e interacciones de Van der Waals).

Se han revisado las evidencias que apoyan esta teoría: los solventes apolares desnaturalizan las proteínas; los residuos hidrofóbicos se sitúan generalmente en el interior de la proteína, donde evitan el contacto con el agua; los residuos y la hidrofobicidad en el interior de la proteína están más conservados y relacionados con la estructura que ningún otro tipo de residuo (la sustitución de un residuo hidrofóbico del interior es generalmente más disruptivo que otro tipo de cambio). Si damos un papel central al efecto hidrofóbico sobre el plegamiento de la proteína, es fácil asumir que el efecto hidrofóbico es también la principal fuerza responsable de la estabilidad de la proteína; y esto viene confirmado por la información acumulada en los últimos veinte años sobre la secuencia, estructura y mutagénesis de las proteínas (Dill, 1990).

Dos observaciones sugieren que los homólogos hipertermofílicos y mesofílicos tienen una estabilidad básica común respaldada por el hecho de que el interior de la proteína está conservado: las interacciones hidrofóbicas y los residuos del interior que están implicados en estructuras secundarias están mejor conservados que los de la superficie, y muchas sustituciones estabilizadoras se encuentran en las zonas expuestas a los solventes. El alto grado de similitud encontrado en el interior de

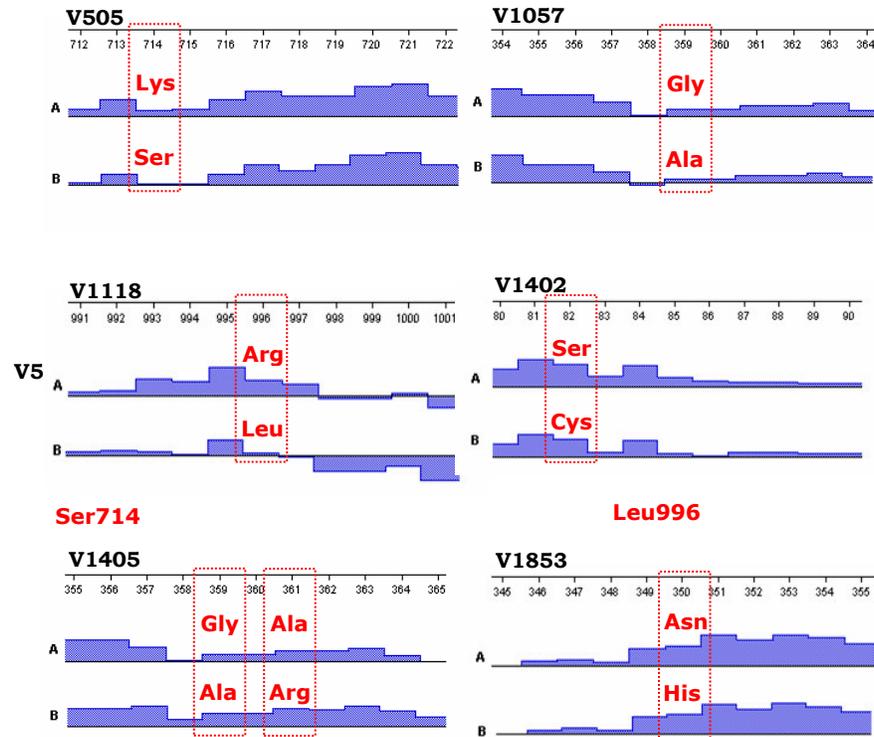
las proteínas tanto mesofílicas como hipertermofílicas indican que las proteínas mesofílicas están empaquetadas tan eficientemente como es posible y que no hay mucho margen para mejorar la estabilización en el interior. Las interacciones estabilizantes de los hipertermófilos se encuentran a menudo en las zonas menos conservadas de la proteína.

En el presente trabajo, hemos aplicado el modelo de Kyte-Doolittle (1982) a la secuencia aminoacídica de la proteína lacZ salvaje y a las variantes termoestables para determinar la variación en la hidrofobicidad local por los cambios aminoacídicos producidos. Este modelo adjudica un índice de hidrofobicidad para cada aminoácido según el cual cuanto más hidrofóbica es su cadena lateral más positivo es, mientras que para cadenas hidrofóbicas el valor es negativo. Según este parámetro, la isoleucina sería el aminoácido con la cadena lateral más hidrofóbica correspondiéndole el valor -4,5; y la arginina sería el aminoácido con cadena lateral más hidrofílica con un valor de 4,5.

Para contrastar las diferencias producidas, obtuvimos una predicción para la proteína salvaje y la comparamos, una a una, con las predicciones para las proteínas termoestables (Fig. 4.10). En la variante V1402, el cambio se produce sobre un aminoácido no conservado (Ser) cuyo índice de hidrofobicidad es de 0,8 siendo sustituido por un aminoácido (Cys) cuyo índice es de -2,5. Hay un incremento puntual de la hidrofobicidad, que según el modelo de Kyte-Doolittle afectaría levemente a la hidrofobicidad de la región.

En la variante V1853, se produce una disminución de la hidrofobicidad de 3,5 a 3,2 como consecuencia del cambio de una Asn por una His. Este cambio se ha producido en un aminoácido

**V1405** conservado del dominio en forma de barril, donde está el centro catalítico, aunque en las cercanías de la zona limítrofe con el siguiente dominio.



**Figura 4.10.** Comparación por regiones de la hidrofiliidad de los aminoácidos de la proteína salvaje y de las variantes termoestables según el modelo de Kyte-Doolittle (1982). En todas las gráficas aparece la región correspondiente a la proteína salvaje (**A**) y debajo la correspondiente a cada una de las variantes (**B**).

Algo más complejo es lo que ocurre con la variante 1405, donde el cambio en la posición 359 afecta a una Gly que está conservada en esta familia de  $\beta$ -galactosidasas (en la zona límite

del domino en forma de barril), y es sustituida por una Ala. Este cambio afecta a la zona produce una disminución de la hidrofiliidad de 0,4 a -1,8. Al contrario ocurre con el otro cambio de V1405 el cual está situado en la posición 361 (Ala → Arg), que no afecta a una posición conservada pero que incrementa la hidrofiliidad de -1,8 a 4,5.

La variante V1057 sufre el mismo efecto que la variante V1405 con respecto al cambio aminoacídico en la posición 359 porque es idéntico en ambas.

La V505 tiene un cambio aminoacídico (Lys → Ser) que se produce sobre una posición conservada pero fuera del domino en forma de barril. Debido a este cambio se produce un incremento de la hidrofobicidad, o lo que es lo mismo, una disminución de la hidrofiliidad (3,9 → 0,8).

Por último, el cambio más radical se ha producido en la variante V1118 donde el cambio de una Arg a una Leu ha supuesto un cambio de la hidrofiliidad de 3,5 a -3,8.

Como se puede observar, a nivel local se ha producido un incremento de la hidrofobicidad para la mayoría de los cambios, pero es complicado afirmar que este incremento puntual haya afectado en gran medida a la hidrofobicidad general de la proteína.

#### **4.3.2.3. Composición aminoacídica**

Tradicionalmente se ha pensado que la composición aminoacídica está correlacionada con la termoestabilidad. Un estudio estadístico que compara las composiciones en proteínas mesofílicas y termofílicas indica que en las enzimas termoestables

son frecuentes las sustituciones del tipo Gly → Ala, Ser → Ala, Ser → Thr, Asp → Glu y Lys → Arg.

En las variantes 1405 y 1057, se produce el cambio Gly → Ala en la posición 359, aunque en la posición 361 se pierde una Ala produciéndose el cambio Ala → Arg. El hecho de encontrar un alto contenido de alanina en las proteínas termofílicas hizo suponer que este aminoácido es el mejor residuo para la conformación α-hélice (Argos et ál., 1979). Sin embargo, la mayoría de los datos experimentales, especialmente las secuenciaciones completas de genomas, nos indican que no existen unas claves sobre la adaptaciones termofílicas que vengan definidas en términos de diferencias significativas en la composición aminoacídica (Böhm y Jaenicke, 1994).

Las secuencias genómicas de varios organismos mesófilos (*B. subtilis*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Richettsia prowazekii* y *Synechocystis* sp.) han sido comparadas a nivel de composición aminoacídica con las secuencias genómicas de varios organismos hipertermófilos (*Aeropyrum fulgidus*, *Aquifex aeolicus*, *Aeropyrum pernix*, *Methanococcus jannaschii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus horikoshii* y *Thermotoga maritima*). Se ha observado (Böhm y Jaenicke, 1994) que en las hipertermófilas hay un +3.24% más de residuos con carga que en las mesófilas, a expensas de residuos polares sin carga, -4.98%, particularmente Gln (-2.21%). La cantidad de residuos hidrofóbicos y aromáticos en las proteínas hipertermofílicas es levemente mayor que en las mesofílicas.

Estos datos obtenidos de la secuenciación del genoma no pueden ser generalizados, ya que, existen grandes variaciones

entre los genomas de los organismos hipertermófilos. Por ejemplo, el conjunto de proteínas conocidas actualmente de *Aeropyrum pernix* contiene menos residuos cargados, menos residuos hidrofóbicos y menos residuos aromáticos que los mesófilos estudiados. Sin embargo, las proteínas de *A. pernix* contienen más Ala, Gly, Pro, Ser y Thr residuos que los mesófilos del estudio.

Es probable que, más que la composición aminoacídica en el conjunto de las proteínas, el factor relevante sea la distribución de los residuos y sus interacciones en la proteína. Por ejemplo, la proteasa subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (mesófilo) tiene el mismo número de residuos cargados que su homóloga la termitasa de *Thermoactinomyces vulgaris* (hipertermófilo), pero esta última tiene ocho interacciones iónicas más (Teplyakov et ál., 1990).

Algunas propiedades de los residuos de Arg sugieren que podrían estar mejor adaptados a las altas temperaturas que los residuos de Lys. La Arg mantiene más fácilmente las interacciones iónicas y una carga neta positiva a altas temperaturas que la Lys. En el estudio de comparación de los genomas se vio que las relaciones Arg/Lys en mesófilos e hipertermófilos están asociadas a grandes desviaciones estándar, lo cual sugiere aunque un incremento en el contenido de Arg sea estabilizante no es un mecanismo universal utilizado por los hipertermófilos.

En nuestra variante 1405 se produce el cambio de una Ala por una Arg en la posición 361, de modo que a pesar de perder aparentemente un elemento característico de las  $\alpha$ -hélices, es sustituido por un aminoácido con tendencias estabilizantes. Esto, sumado a la sustitución de la Gly 359 por una Ala, y teniendo en

cuenta que tanto la Ala como la Arg están relacionados con una mejora en la estabilidad, resume las posibles explicaciones del incremento en la termoestabilidad de la  $\beta$ -galactosidasa 1405.

Algunas enzimas hipertermofílicas contienen menos Asn que sus homólogos mesofílicos (Hess et ál., 1995). Una prueba indirecta de que la desamidación afecta a las proteínas hipertermofílicas es la alta actividad de la L-isoaspartyl metiltransferasa de *Thermotoga maritima* (Ichikawa y Clarke, 1998). Esta enzima metila los residuos L-isoAsp que se producen por la desamidación de la Asn o por la isomerización del Asp. Su alta actividad sugiere que se ha adaptado para la gran cantidad de daños que sufren las proteínas a altas temperaturas. Las hipertermófilas que tienen más Asn las tienen situadas en localizaciones y conformaciones que no son susceptibles de desamidación. En el estudio de genomas de mesófilos e hipertermófilos no sólo se observó un decremento del contenido en Asn sino que también se producía una disminución significativa de Gln.

Nuestra variante 1853 ha sufrido el cambio Asn250His, de modo que se produce la pérdida de un grupo amida. Este cambio se produce en una zona conservada que podría haber afectado a la actividad global de la enzima, de hecho esa variante es la que menor producción de GOS presenta a 60°C.

#### **4.3.2.4. Fuerzas de estabilización intrínsecas**

Se piensa que los puentes disulfuro estabilizan las proteínas principalmente porque disminuyen la entropía del polipéptido no plegado (Matsumura et ál., 1989). El efecto entrópico de los

puentes disulfuro incrementa en proporción al logaritmo del número de residuos que separan dos cisteínas unidas.

Hemos aplicado el programa GDAP ("Genomic Disulfide Análisis Program) para la predicción de formación de puentes disulfuro en la proteína salvaje lacZ y en la variante V1402 porque en ella, el cambio Ser82Cys aporta un residuo disulfuro que podría participar en dichos enlaces. Según este programa, ni la proteína salvaje lacZ ni la variante V1402 presentan puentes disulfuro.

Otras interacciones están relacionadas con la estabilidad de la proteína (interacciones hidrofóbicas, interacciones aromáticas, puentes de hidrógeno, interacciones iónicas) en las que su efecto depende en gran medida de las distancias existentes entre los aminoácidos en el plegamiento. Se piensa que las interacciones iónicas no son especialmente importantes en el plegamiento de las proteínas (Dill, 1990) debido a que son escasas y no están fuertemente conservadas. Sin embargo, cualquiera de estas interacciones puede ser importante en casos concretos, como en la proteína GDH (glutamato deshidrogenasa) de *Pyrococcus furiosus* en la que un alto porcentaje de residuos participan en interacciones iónicas, particularmente la Arg (el 90% de los residuos de Arg en esta proteína participan en interacciones iónicas) (Yip et ál., 1995).

#### **4.3.2.5. Entropía de la proteína**

Se ha propuesto que las proteínas de estructura tridimensional conocida podrían estar estabilizadas por un descenso de su entropía de polipéptido sin plegar (Matthews et ál., 1987). En el estado sin plegar, la glicina, que carece del carbono  $\beta$ , es el residuo con mayor entropía conformacional. Al contrario

ocurre con la prolina, la cual puede adoptar sólo unas pocas configuraciones y éstas están restringidas a las permitidas por el residuo precedente (Sriprapundh et ál., 2000). Así, las mutaciones del tipo Gly → Xaa o Xaa → Pro deberían disminuir la entropía del polipéptido sin plegar y por lo tanto, estabilizar la proteína, siempre que los cambios realizados no introduzcan cadenas desfavorables a la estructura de la proteína. Esta técnica ha sido utilizada para obtener enzimas más termoestables termodinámicamente, y está respaldada por numerosos trabajos.

Por ejemplo, a la proteasa neutra de *Geobacillus stearothermophilus* se le realizaron las sustituciones Ser65Pro y Ala69Pro, que eran los únicos cambios que no eliminaban interacciones no covalentes, ni creaban tensiones conformacionales ni tampoco sufrían torsiones en ángulos inapropiados. El resultado fue que, tal como predecía el modelo propuesto, se incrementó la termoestabilidad de la enzima (Hardy et ál., 1993).

En otro caso, se introdujeron numerosas prolinas en lugares adecuados en la oligo-1,6-glucosidasa del mesofílico *Bacillus cereus*. Generalmente, la termoestabilidad se incrementaba con el número de prolinas introducidas (Watanabe et ál., 1996).

Las variantes de  $\beta$ -galactosidasa 1405 y 1057 sufrieron la sustitución Gly359Ala, de modo que la entropía ha sido disminuida puntualmente por la pérdida del aminoácido que permite mayor rotación. Esto ha podido producir un incremento puntual de la rigidez y en consecuencia ha mejorado la termoestabilidad de las enzimas.

La variante 1405 es la que mayor actividad de síntesis de GOS presenta a altas temperaturas. En ella se acumulan dos cambios, uno que es el común con la variante 1057, y otro (Ala361Arg) que incorpora una Arg que posiblemente intervenga en una interacción iónica estabilizante.

No conocemos una posible explicación para la mejora de la termoestabilidad de los clones 505 y 1118. En la variante 1118 el cambio Arg → Leu se produce en una región no conservada del dominio conocido como "aminoterminal de las formas diméricas", y el incremento en la termoestabilidad es moderado si lo comparamos con el resto de variantes. Sin embargo, la variante 505 incorpora una Ser en donde había una Lys conservada del dominio carboxiterminal.

#### ***4.4. Conclusiones sobre la mejora en la termoestabilidad***

En conclusión, mediante la aplicación de las técnicas de Evolución Dirigida se han conseguido enzimas más termoestables que la proteína salvaje. El cambio de 1 o 2 residuos aminoácidos, la mayoría situados en la superficie de la proteína, han incrementado aparentemente la rigidez o la estabilidad suficientemente como dar lugar a diferencias de termoestabilidad cuantificables.

Las distintas variantes, en general, han incrementado la hidrofobicidad local en la región que ha sufrido el cambio aminoácido, se han generado estructuras de tipo hélice alfa o se ha disminuido la entropía como consecuencia de dicho cambio. Como resultado, estas nuevas variantes son capaces de realizar la reacción de hidrólisis a una temperatura superior, por lo que se

pueden utilizar en soluciones concentradas de lactosa a temperaturas elevadas para la síntesis de GOS. La existencia de variantes de la enzima que son más termoestables sin llegar a perder la actividad a temperaturas moderadas indica que la actividad y la termoestabilidad son propiedades parcialmente independientes que pueden ser optimizadas en el mismo enzima.

#### **4.5. Síntesis de GOS**

En el presente trabajo hemos podido comprobar que la  $\beta$ -galactosidasa lacZ de *L. d. bulgaricus* es capaz de sintetizar galacto-oligosacáridos tras 48 h de reacción. Este proceso se realizó a pH 6, a 50°C y frente a un 40% de lactosa. Se obtuvo un rendimiento en la síntesis del 35% (p/p) de GOS. No existen precedentes de esta reacción con esta enzima con los que podamos comparar.

Sin embargo, los resultados obtenidos por otros autores con otras enzimas apuntan a resultados que oscilan entre 25-45%. Algunas de estas reacciones se han realizado con enzimas originarias de organismos termófilos, como ocurre con la  $\beta$ -glucosidasa de *Thermus* sp Z-1 con la que se obtuvo un rendimiento del 40% (p/p) de GOS a partir de una solución al 30% (p/v) de lactosa a 70°C durante 6 h (Akiyama et ál., 2001). Otras se han realizado con enzimas de bifidobacterias, como por ejemplo, *Bifidobacterium bifidum* BB-12, *B. adolescentis* ANB-7, *B. infantis* DSM-28088, *B. pseudolongum* DSM-20099. Con sus respectivas  $\beta$ -galactosidasas se han obtenido rendimientos que oscilan entre el 24,7-47,6% frente a un 30% (p/v) de lactosa durante 7 h (Rabiu et ál., 2001). Algunos de estos procesos han sido sujetos de patentes, como por ejemplo, el método

desarrollado para la síntesis de GOS por Taksuhiko (1986), según la cual, se obtuvo un rendimiento del 27% (p/p) de GOS, dentro de los siguientes parámetros: 20-50°C, 10-50% (p/v) de lactosa y pH 3-8 durante 2-4 h. Nuestros resultados indican resultados similares pero para tiempos de reacción mayores.

No hemos encontrado ningún precedente en la bibliografía de obtención de GOS con mayor rendimiento tras evolucionar la proteína hacia una mejor termoestabilidad. En el presente trabajo hemos podido comprobar que es posible mejorar el rendimiento de síntesis de GOS siguiendo este procedimiento. Esta mejora ha superado el 100% (V1405) en reacciones a 60°C en comparación con la proteína salvaje. Las expectativas de mejora de éxito de esta reacción estarían vinculadas a la posibilidad de obtener enzimas termoestables a mayores temperaturas siguiendo el mismo procedimiento de mutación/selección y/o combinando los cambios producidos mediante un proceso de "gen shuffling" (barajado de fragmentos génicos) e incrementando la temperatura de selección.

#### **4.6. Cuestiones finales**

A partir de los resultados obtenidos se pueden plantear una serie de cuestiones que podrían ser tratadas en estudios posteriores. Una de las preguntas que surge es conocer cuál es la temperatura límite para la actividad y la estabilidad enzimática. La respuesta a esta pregunta vendrá del descubrimiento de nuevas enzimas hipertermofílicas que son activas por encima de los 125°C.

Otro reto es utilizar esas enzimas hipertermofílicas cuyos sustratos sean estables a altas temperaturas y seleccionar los

mutantes con mayor estabilidad utilizando las herramientas de ingeniería genética. Esta aproximación se ha utilizado para mejorar la termoestabilidad de la  $\alpha$ -amilasa de *Pyrococcus furiosus* mediante evolución dirigida (Dong et ál., 1997).

Otra cuestión es si las enzimas hipertermofílicas pueden usarse como modelos para diseñar enzimas mesofílicas más estables, o si las mismas hipertermófilas pueden modificarse para que su actividad máxima sea a temperaturas moderadas.

Por último, queda por determinar en qué grado la rigidez y la flexibilidad están relacionadas con la termostabilidad y la actividad respectivamente.



## ***V. Conclusiones***



1. Se han clonado y secuenciado los genes que codifican para las  $\beta$ -galactosidasas mbgA de *Bacillus megaterium*, lacA de *Bacillus subtilis* y lacZ de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*.
2. Se han producido las proteínas codificadas por los genes citados mediante dos sistemas heterólogos de expresión, uno en un organismo eucariótico (*Pichia pastoris*) y otro en un organismo procariótico (*Escherichia coli*). En ambos sistemas se han obtenido enzimas activas.  
En *P. pastoris* se ha detectado que una alta proporción de las proteínas expresadas no son capaces de secretarse al medio extracelular.  
Los mejores rendimientos de producción se han obtenido con la  $\beta$ -galactosidasa de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* expresada en *Escherichia coli*.
3. Se ha comprobado mediante cromatografía de filtración en gel que la  $\beta$ -galactosidasa lacA de *Bacillus subtilis* tiene una masa molecular de 80 kDa, lo que, teniendo en cuenta la masa molecular de la proteína deducida por la secuencia del gen, correspondería a una estructura monomérica.
4. Se ha comprobado mediante mutación dirigida que el residuo de ácido glutámico situado en la posición 322 de la  $\beta$ -galactosidasa lacA de *Bacillus subtilis* es indispensable para su actividad hidrolítica y se postula como posible centro nucleofílico. La sustitución de este aminoácido por un residuo de alanina da lugar a una potencial  $\beta$ -galactosintasa.

5. Se ha obtenido una preparación conteniendo un 35% de galacto-oligosacáridos a partir de lactosa utilizando la  $\beta$ -galactosidasa lacZ de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* expresada en *E. coli*.
6. Se han obtenido, mediante evolución dirigida, seis variantes de la  $\beta$ -galactosidasa lacZ de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* que presentan una mayor termoestabilidad que la enzima salvaje.

***VI. Bibliografía***

- Acharya P, Rajakumara E, Sankaranarayanan R, Rao NM (2004) "Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved *Bacillus subtilis* lipase" *J. Mol. Biol.* **27**:1271-81.
- Aguilar CF, Sanderson I, Moracci M, Ciaramella M, Nucci R, Rossi M, Pearl LH (1997) "Crystal structure of the beta-glycosidase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability." *J. Mol. Biol.* **271**:789-802.
- Akiyama K, Takase M, Horikoshi K, Okonogi S (2001) "Production of galactooligosaccharides from lactose using a  $\beta$ -glucosidase from *Thermus* sp. Z-1." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**:438-441.
- Anema PJ (1964) "Purification and some properties of  $\beta$ -galactosidase of *Bacillus subtilis*." *Biochim. Biophys. Acta* **89**:495-502.
- Appel SH, Alpers DH, Tomkins GM (1992) "Multiple molecular forms of  $\beta$ -galactosidase: comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis." *Gene* **118**:55-63.
- Argos P, Rossmann MG, Frau UM, Zuber H, Frank G, Tratschin JD (1979) "Thermal stability and protein structure" *Biochemistry* **18**: 5698-703.
- Arnold FH, Georgiou G (2003) *En Directed Enzyme Evolution: Screening and Selection Methods. Methods in Molecular Biology*; Arnold FH and Georgiou G, Humana Press; Totowa, New Jersey; **230**:v-vi.
- Arrizubieta MJ, Polaina J (2000) "Increased thermal resistance and modification of the catalytic properties of a  $\beta$ -glucosidase by random mutagenesis and *in vitro* recombination" *J. Biol. Chem.* **275**:28843-28848.
- Bahl OP, Agrawal KM (1969) "Glycosidases of *Aspergillus niger*. I. Purification and characterization of alpha- and beta-galactosidases and beta-N-acetylglucosaminidase." *J. Biol. Chem.* **244**:2970-8.

- Becerra M, Cerdán E, González Siso MI (1998) "Dealing with different methods for *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase purification." *Biol. Proced. Online* **1**:48-58.
- Benson AK, Haldenwang WG (1993) "Regulation of  $\sigma^B$  levels and activity in *Bacillus subtilis*." *J. Bacteriol.* **175**:2347-2356.
- Böhm G, Jaenicke R (1994) "Relevance of sequence statistics for the properties of extremophilic proteins" *Int. J. Pept. Protein Res.* **43**:97-106.
- Boon MA, Janssen AEM, van't Riet K (2000) "Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides" **26**:271-281.
- Bradford MM (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Burstone MS (1962). En *Enzyme Histochemistry*. Academic Press; New York: 375.
- Cacciapouti G, Fusco S, Caiazzo N, Zappia V, Porcelli M (1999) "Heterologous expresión of 5'-metiltioadenosine sossorilase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the recombinant protein and involvement of disulfide bonds in thermophilicity and thermostability" *Protein Expr. Purif.* **16**:125-35.
- Cadwell WPC, Joyce G (1994) "Mutagenic PCR." *PCR Methods Appl.* **3**:S136-S140.
- Cereghino JL, Cregg JM (2000) "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*" *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:45-66.
- Cirino PC, Georgescu R (2003) "Screening for thermostability." *Methods Mol Biol* **230**:117-125.
- Chou PY (1990) "Prediction of protein structural classes from amino acid compositions, prediction of protein structure and the principles of protein conformation" Plenum Press New York; New York:549-586.
- Cohn M, Monod J. (1951) "Purification and properties of the beta-galactosidase (lactase) of *Escherichia coli*." *Biochim. Biophys. Acta* **7**:153-174.

- Conchi J, Hay JA, Strachan I, Levvy GA **(1967)** "Inhibition of glycosidases by aldonolactones of corresponding configuration." *Biochem. J.* **102**:929-941.
- Cupples CG, Miller JH, Huber RE **(1990)** "Determination of the roles of Glu-461 in  $\beta$ -galactosidase (*Escherichia coli*) using site-specific mutagenesis." *J. Biol. Chem.* **265**:5512-5518.
- Daniel RA, Haiech J, Denizot F, Errington J **(1997)** "Isolation and Characterization of the *lacA* Gene Encoding  $\beta$ -Galactosidase in *Bacillus subtilis* and a Regulator Gene, *lacR*." *J. Bacteriol.* **179**:5636-5638.
- Daugherty PS, Chen G, Iverson BL, Georgiou G **(2000)** "Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:2029-2034.
- De Montigny C, Sygusch J **(1996)** "Functional characterization of an extreme thermophilic class II fructose-1, 6-bisphosphate aldolase" *Eur. J. Biochem.* **241**:243-8.
- De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir Jürgen **(2001)** "Probiotics-compensation for lactase insufficiency" *Am J Clin Nutr* **73**:421-9.
- Despreaux CW, Manning RF **(1993)** "The *dacA* gene of *Bacillus stearothermophilus* coding for D-alanine carboxypeptidase: cloning, structure and expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*" *Gene.* **131**:35-41.
- Dill **(1990)** "Dominant forces in protein folding" *Biochemistry* **29**:7133-7155.
- Dong G, Vieille C, Savchenko A, Zeikus JG **1997**
- Dubnau E, Cabane K, Smith I **(1987)** "Regulation of *spo0H*, an Early Sporulation Gene in Bacilli" *J. Bacteriol.* **169**:1182-1191.
- Dubnau E, Ramakrishna N, Cabane K, Smith I **(1981)** "Cloning of an Early Sporulation Gene in *Bacillus subtilis*" *J. Bacteriol.* **147**:622-632.
- Eckert KA, Kunkel TA **(1990)** "High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase." *Nucleic Acids Research* **18**:3739-3744.

- Errington J, Vogt CH (1990) "Isolation and Characterization of Mutations in the Gene Encoding an Endogenous *Bacillus subtilis*  $\beta$ -Galactosidase and Its Regulator." *J. Bacteriol.* **172**:488-490.
- Fowler A, Zabin VI (1978) "Amino acid sequence of  $\beta$ -galactosidase. XI. Peptide ordering procedures and the complete sequence." *J. Biol. Chem.* **258**:10204-10207.
- Germond J-E, Lapierre L, Delley M, Mollet B, Felis GE, Dellaglio F (2003) "Evolution of the bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a partial genomic study with reflections on prokaryotic species concept" *Mol. Biol. Evol.* **20**: 93-104.
- Gershenson A, Schauerte JA, Giver L, Arnold FH (2000) "Tryptophan phosphorescence study of enzyme flexibility and unfolding in laboratory-evolved thermostable esterases" *Biochemistry* **39**:4658-65.
- Gibson G, Angus F (2000) "Prebiotics and probiotics". En *LFRA Ingredients Handbook*. Leatherhead Publishing; Surrey; Reino Unido.
- Giver L, Gershenson A, Freskgard P, Arnold FH (1998) "Directed evolution of a thermostable esterase" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12809-12813.
- Greenberg NA, Mahoney RR (1984) "The activity of lactose (*Streptococcus thermophilus*) in milk and sweet whey." *Food chem.* **15**:307-313.
- Guy E J, Bingham EW (1978) "Properties of  $\beta$ -galactosidase of *Saccharomyces lactis* in milk and milk products." *J. Dairy Sci.* **61**:147-151.
- Hao J, Berry A (2004) "A thermostable variant of fructose bisphosphate aldolase constructed by directed evolution also shows increased stability in organic solvents" *Protein Eng. Des. Sel.* **17**:689-97.
- Hardy F, Vriend G, Veltman OR, Van Der Vinne B, Venema G, Eijsink VG (1993) "Stabilization of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease by introduction of prolines" *FEBS Lett.* **317**:89-92.
- Hess D, Kruger K, Knappik A, Palm P, Hensel R (1995) "Dimeric 3-phosphoglycerate kinases from hyperthermophilic

- Archaea. Cloning, sequencing and expression of the 3-phosphoglycerate kinase gene of *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and characterization of the protein. Structural and functional comparison with the 3-phosphoglycerate kinase of *Methanothermus fervidus*" *Eur. J. Biochem.* **233**:227-37.
- Hibbert EG, Baganz F, Hiles HC, Ward JM, Lye GJ, Woodley JM, Dalby PA **(2005)** "Directed evolution of biocatalytic processes" *Biomol. Eng.* **22**:11-19.
  - Hidaka M, Fushinobu S, Ohtsu N, Motoshima H, Matsuzawa H, Shoun H, Wakagi T **(2002)** "Trimeric Crystal Structure of the Glycoside Hydrolase Family 42  $\beta$ -Galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the Structure of its Complex with Galactose" *J. Mol. Biol.* **232**:79-91.
  - Higgins DG, Sharp PM. **(1989)** "Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer." *Cabios* **5**:151-153.
  - Hu ASL, Wolfe RG, Reithel FJ **(1959)** "The preparation and purification of beta-galactosidase from *Escherichia coli*, ML 308." *Arch. Biochem. Biophys.* **81**: 500-7.
  - Ichikawa JK, Clarke S **(1998)** "A highly active protein repair enzyme from an extreme thermophile: the L-isoaspartyl methyltransferase from *Thermotoga maritima*" *Arch. Biochem. Biophys.* **358**:222-31.
  - Jacob F, Monod J **(1961)** "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." *J. Mol. Biol.* **3**:318-56.
  - Jacobson RH **(1993)** *The dimensional structure of  $\beta$ -galactosidase*. PhD thesis, University of Oregon, Corvallis, OR.
  - Jaenicke R **(1998)** "What ultrastable globular proteins teach us about protein stabilization" *Biochemistry (Mosc)* **63**:312-21.
  - Jaenicke R, Bohm G **(1998)** "The stability of proteins in extreme environments." *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**:738-748.
  - Janecek J, Rickenberg HV **(1964)** *Biochim. Biophys. Acta.* **81**:108.
  - Juers DH, Heightman TD, Vasella A, McCarter JD, Mackenzie L, Withers SG, Matthews BW **(2001)** "A Structural View of

the Action of *Escherichia coli* (lacZ)  $\beta$ -Galactosidase" *Biochemistry* **2001**:14781-14794.

- Kjeldsen T, Pettersson AF, Hach M **(1999)** "Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*" *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**:79-86.
- Kim Y-W, Choi J-H, Kim J-W, Park C, Kim J-W, Cha H, Lee S-B, Oh B-H, Moon T-W, Park K-H **(2003)** "Directed evolution of *Thermus* maltogenic amilase toward enhanced thermal resistance" *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4866-4874.
- Karplus PA, Schulz GE **(1985)** "Prediction of chain flexibility" *Naturwissenschaften* **72**:212-213.
- Kim CS, Ji E-S, Oh D-K **(2004)** "Characterization of a thermostable recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Thermotoga maritime*" *J. Appl. Microbiol.* **97**:1006-1014.
- Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Turchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MW, Stiekema W, Lankhorst RM, Bron PA, Hoffer SM, Groot MN, Kerhoven R, de Vries M, Ursing B, de Vos WM, Siezen RJ **(2003)** "Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:1990-5.
- Kyte J, Doolittle RF **(1982)** "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein" *J. Mol. Biol.* **157**:105-132.
- Kulikova AK, Tikhomirova AS, Feniksova RV **(1972)** "Purification and properties of  $\beta$ -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*" *Biokhimiia* **37**:405-9.
- Kunkel TA **(1985)** "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:488-492.
- Kunst F, Ogasawara N, Moszar I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V. **(1997)** "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*." *Nature* **390**:249-256.
- Laemmli UK **(1970)** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**:680-685.

- Landman OE **(1957)** "Properties and induction of  $\beta$ -galactosidase in *Bacillus megaterium*" *Biochim. Biophys. Acta.* **23**:558-569.
- Lederberg J **(1950)** "The Beta-d-galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12." *J. Bacteriol.* **4**:381-92.
- Leong-Morgenthaler P, Zwahlen MC, Hottinger H **(1991)** "Lactose Metabolism in *Lactobacillus bulgaricus*: Analysis of the Primary Structure and Expression of the Genes Involved" *J. Bacteriol.* **173**:1951-1957.
- Mackenzie LF, Wang Q, Warren RAJ, Withers SG **(1998)** "Glycosynthases: mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis" *J. Am. Chem. Soc.* **120**:5583-5584.
- Mahoney RR **(1998)** "Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis-a review". *Food Chem.* **63**:147-154.
- Mahoney RR **(2003)** " $\beta$ -Galactosidase" En *Handbook of food enzymology*; Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS, Marcel Dekker, Inc; New York; 823-828.
- Mahoney RR, Whitaker JR **(1977)** "Stability and enzymatic properties of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*." *J. Food Biochem.* **1**:327-350.
- Mahoney RR, Adamchuk C **(1980)** "Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*." *J. Food Sci.* **45**:962-969.
- Manco G, Giosuè E, D'Auria S, Herman P, Carrea G, Rossi M **(2000)** "Cloning, overexpression, and properties of a new thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*" *Arch. Biochem. Biophys.* **373**:182-92.
- Marchesi SL, Steers Jr E, Shifrin S **(1969)** "Purification and characterization of the multiple forms of  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli*." *Biochim. Biophys. Acta* **181**:20-34.
- Martison FAO, Hartley D **(1990)** "Solubilization of Protein Aggregates" En *Guide to Protein Purification*; Deutscher MP, Academic Press, Inc.: San Diego, CA; **182**:264-276.

- Matsumura M, Signor G, Matthews BW (1989) "Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds" *Nature* **342**:291-3.
- Matthews BW, Nicholson H, Becktel WJ (1987) "Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:6663-6667.
- Mbuyi-Kalala A, Schnek AG, Leonis J (1988) "Separation and characterization of four enzyme forms of beta-galactosidase from *Saccharomyces lactis*" *Eur. J. Biochem.* **178**:437-43.
- Minami Y, Yazawa K, Tamura Z, Tanaka T, Yamamoto T (1983) "Selectivity of utilization of galactosil-oligosaccharides by bifidobacteria" *Chem. Pharm. Bull.* **31**:1688-91.
- Miyazaki K, Wintrode PL, Grayling RA, Rubingh DN, Arnold FH (2000) "Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme." *J. Mol. Biol.* **297**:1015-26.
- Mozaffar Z, Nakanishi K, Matsuno R, Kamikubo T (1984) "Purification and Properties of  $\beta$ -Galactosidases from *Bacillus circulans*" *Agric. Biol. Chem.* **48**:3053-3061.
- Neylon C (2004) "Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution" *Nucleic Acids Research* **32**:1448-1459.
- Ohmiya K, Ohashi H, Kobayashi T, Shimizu S (1977) "Hydrolysis of Lactose by Immobilized Microorganisms" *Appl Environ Microbiol* **33**:137-146.
- Pace CN, Shirley BA, McNutt M, Gajiwala K (1996) "Forces contributing to the conformational stability of proteins" *FASEB J* **10**:75-83.
- Paifer E, Margolles E, Cremata J, Montesino R, Herrera L, Delgado JM (1994) "Efficient expresión and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences" *Yeast* **10**:1415-9.
- Pardee AB, Jacob F, Monod J (1958) "The role of the inducible alleles and the constitutive alleles in the synthesis

- of beta-galactosidase in zygotes of *Escherichia coli*." *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1**:165.
- Planas A, Faijes M (2002) "Glycosidases and Glycosynthases in enzymatic synthesis of oligosaccharides. An overview" *AFINIDAD LIX* **500**:295-313.
  - Poch O, Hote HL, Dallery V, Debeaux F, Fleer R, Sodoyer R. (1992) "Sequence of the *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase: comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis." *Gene* **118**:55-63.
  - Polaina J (2004) "Estructura, función e ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos" En *Mensaje Bioquímico XXVIII*; Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Universidad Nacional Autónoma de México; México DF;61-76.
  - Poulsen PB, Buchholz K (2003) "History of Enzymology with Emphasis on Food Production" En *Handbook of food enzymology*; Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS, Marcel Dekker, Inc; New York; 823-828.
  - Revel HR, Luria SE, Young NL (1961) "Biosynthesis of  $\beta$ -D-galactosidase controlled by phage-carried genes. III: derepression of  $\beta$ -D-galactosidase synthesis following induction of phage development in lysogenic bacteria." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **47**:1974-1980.
  - Roth NJ, Penner RM, Hubber RE (2003) "Beta-galactosidases (*Escherichia coli*) with double substitutions show that Tyr-503 acts independently of Glu-461 but cooperatively with Glu-537" *J. Protein Chem.* **22**:663-8.
  - Sako T, Matsumoto K, Tanaka R (1999) "Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides" *International Dairy Journal* **9**:69-80.
  - Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*; Chris Nolan, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  - Schallmeyer M, Singh A, Ward OP (2004) "Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production" *Can. J. Microbiol.* **50**:1-17.
  - Schmidt BF, Adams RM, Requadt C, Power S, Mainzer SE (1989) "Expression and Nucleotide Sequence of the

*Lactobacillus bulgaricus*  $\beta$ -Galactosidase Gene Cloned in *Escherichia coli*" *J. Bacteriol.* **171**:625-635.

- Schultes V, Deutzmann R, Jeanicke R (1990) "Complete amino-acid sequence of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritime*" *Eur. J. Biochem.* **192**:25-31.
- Shafikhani S, Siegel RA, Ferrari E, Schellenberger V (1997) "Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization." *Biotechniques* **23**:304-10.
- Shaw GC, Chiou CY, Chou YH, Li JM (2002) "*mbgA*-Dependent Lactose Utilization by *Bacillus megaterium*" *Curr. Microbiol.* **44**:102-105.
- Shaw GC, Kao HS, Chiou CY (2002) "Cloning, Expression, and Catabolite Repression of a Gene Encoding  $\beta$ -galactosidase of *Bacillus megaterium* ATCC 14581" *J. Bacteriol.* **180**:4734-4738.
- Shuman S (1992) "Vaccinia virus RNA helicase: An essential enzyme related to the DE-H family of RNA-dependent NTPases" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:10935-10939.
- Smith LA (1998) "Development of recombinant vaccines for botulinum neurotoxin" *Toxicon* **36**:1539-1548.
- Sinnott ML (1978) "Ions, ion pairs and catalysis by the lacZ  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli*." *FEBS Lett* **94**:1-9.
- Song JK, Rhee JS (2000) "Simultaneous enhancement of thermostability and catalytic activity of phospholipase A(1) by evolutionary molecular engineering." *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:890-894.
- Spizizen J (1959) "Genetic activity of deoxyribonucleic acid in the reconstituted biosynthetic pathways." *Fed. Proc.* **18**:957-65.
- Sreerikshna K, Bankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD, Subramaniam A, Birkenberger LA (1997) "Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*" *Gene* **190**:55-62.

- Sriprapundh D, Vieille C, Aeikus JG **(2000)** "Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity : analysis by site-directed mutagenesis" *Protein Eng.* **13**:259-265.
- Steers Jr E, Cuatrecasas P, Pollard HB **(1971)** "The purification of  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* by affinity chromatography." *J. Biol. Chem.* **246**:196-200.
- Strey J, Wittchen KD, Meinhardt F **(1999)** "Regulation of  $\beta$ -Galactosidase Expresión in *Bacillus megaterium* DSM319 by XylS/AraC-Type Transcriptional Activator" *J. Bacteriol.* **181**:328-3292.
- Strub C, Alies C, Lougarre A, Ladurantie C, Czaplicki J, Fournier D **(2004)** "Mutation of exposed hydrophobic amino acids to arginine to increase protein stability" *BMC Biochemistry* **5**:9.
- Takasaki Y, Kamibayashi A **(1969)** "Method of converting glucose into fructose" US Patent 3753858.
- Tanaka Y, Kagamiishi A, Kiuchi A, Horiuchi T **(1975)** "Purification and properties of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*" *J. Biochem. (Tokyo)* **77**:241-7.
- Teplyakov AV, Kuranova IP, Harutyunyan EH, Vainshtein BK, Frommel C, Hohne WE, Wilson KS **(1990)** "Crystal structure of thermitase at 1.4 Å resolution" *J. Mol. Biol.* **214**:261-79.
- Thorne CB **(1961)** "Transduction in *Bacillus subtilis*." *J. Bacteriol.* **83**:106-111.
- Trucksis M, Conn TL, Fasano A, Kaper JB **(1997)** "Production of *Vibrio cholerae* accessory cholera enterotoxin (Ace) in the yeast *Pichia pastoris*" *Infect. Immun.* **65**:4984-4988.
- Vieille C, Zeikus GJ **(2001)** "Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability" *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**:1-43.
- Vieille C, Burdette DS, Zeikus JG **(1996)** "Thermozyemes" *Biotechnol Annu Rev* **2**:1-83.
- Vikha IV, Vorobyev AA, Zholudeva SI, Kasyanova TA, Kudryavtsev SI **(1987)** "Obtainment of a high active preparation of  $\beta$ -D-galactosidase" *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **23**:291-8 (en ruso).

- Wallenfels K, Malhotra OP (1960) "β-Galactosidase." En *The Enzymes*; PD Boyer, H Lardy, K Myrback, eds., Academic Press (2<sup>nd</sup> ed): New York; **4**:409.
- Wallenfels K, Weil R (1972) "β-Galactosidase". En *The Enzymes*; PD Boyer ed., Academic Press (3<sup>rd</sup> ed): New York; **7**: 617-663.
- Wallenfels K, Zarnitz ML, Laule G, Bender H, Keser M (1959) "Studies on lactic acid splitting enzyme. III. Purification, crystallization and features of beta-galctosidase of *Escherichia coli* ML 309." *Biochem. Z.* **331**:459-85.
- Wan L, Twitchett MB, Eltis LD, Grant Mauk A, Smith M (1998) "In vitro evolution of horse heart myoglobin to increase peroxidase activity." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12825-12831.
- Watanabe K, Kitamura K, Suzucki Y (1996) "Análisis of the Critical Sites for Protein Thermostabilization by Proline Sustitution in Oligo-1,6-Glucosidase from *Bacillus coagulans* ATCC 7050 and the Evolutionary Consideration of Proline Residues" *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2066-2073.
- Widmer F, Leuba JL. (1979) "β-Galactosidase from *Aspergillus niger*. Separation and characterization of three multiple forms." *Eur. J. Biochem.* **100**:559-567.
- Wintrode PL Arnold FH (2001) Temperature adaptation of enzymes: lessons from laboratory evolution in: *Evolutionary Protein Design*; Arnold FH ed., Academic Press: San Diego, CA, USA; **55**:161-225.
- Woolen JW, Walker PG (1965) "Fluorimetric estimation of N-acetyl beta-glucosaminidase and beta-galactosidase in blood plasma." *Clin. Chem. Acta* **12**:647-665.
- Yao QZ, Tian M, Tsou CL (1984) "Comparison of the rates of inactivation and conformational changes of creatine kinase during urea denaturation" *Biochemistry* **23**:2740-4.
- Zeikus JG, Vieille C, Savchenko A (1998) "Thermozymes: biotechnology and structure-function relationships" *Extremophiles* **2**:179-83.
- Zhao H, Arnold FH (1999) "Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase." *Protein Eng.* **12**:47-53.