



SECRECIÓN DE LA  $\beta$ -GALACTOSIDASA DE  
*Kluyveromyces lactis*

---

Manuel Becerra Fernández

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR  
UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA

SECRECIÓN DE LA  $\beta$ -GALACTOSIDASA DE  
*Kluyveromyces lactis*

Memoria para aspirar al grado de  
Doctor en Biología  
presentada por

**D. Manuel Becerra Fernández**

*Julio de 1999*

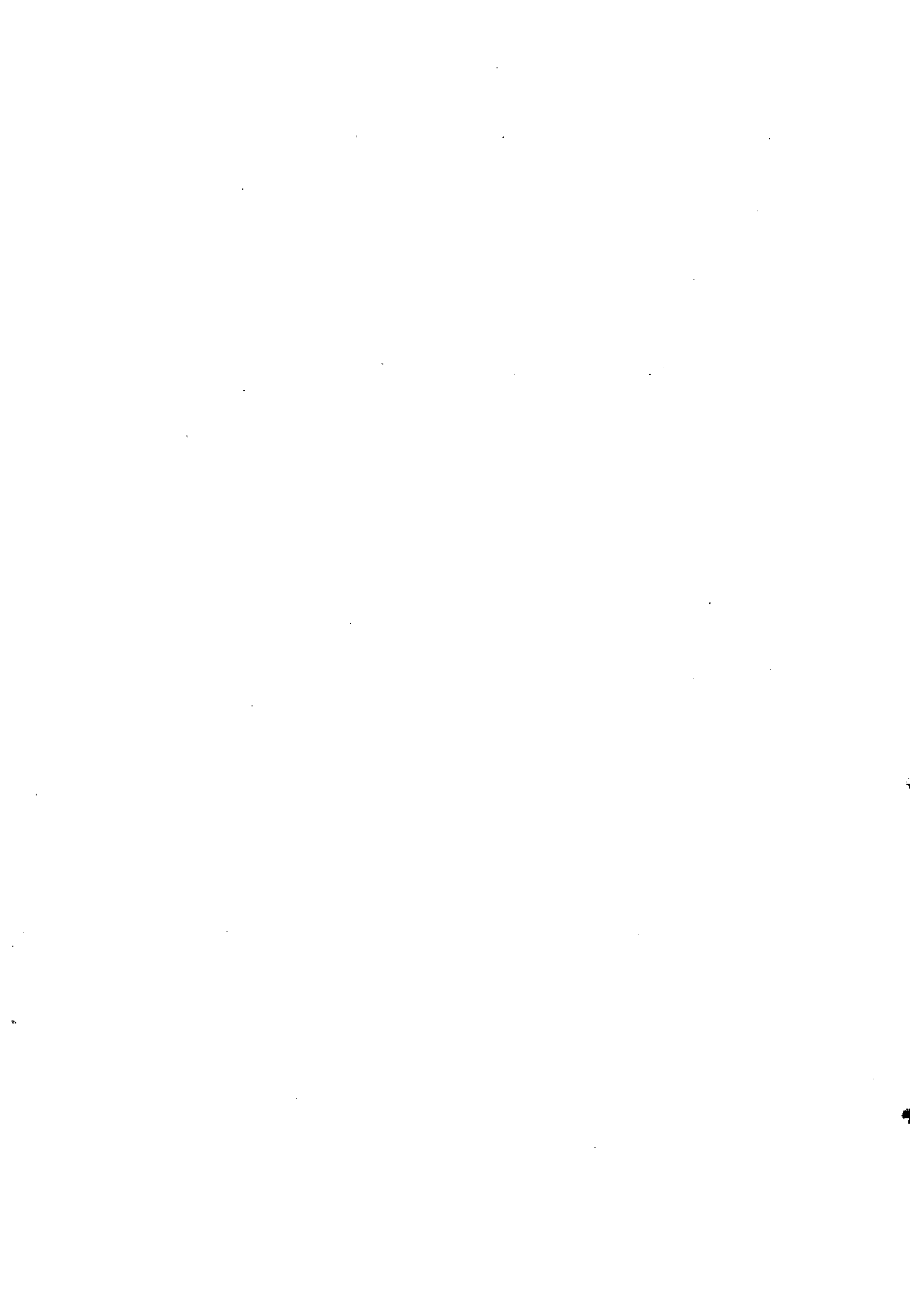
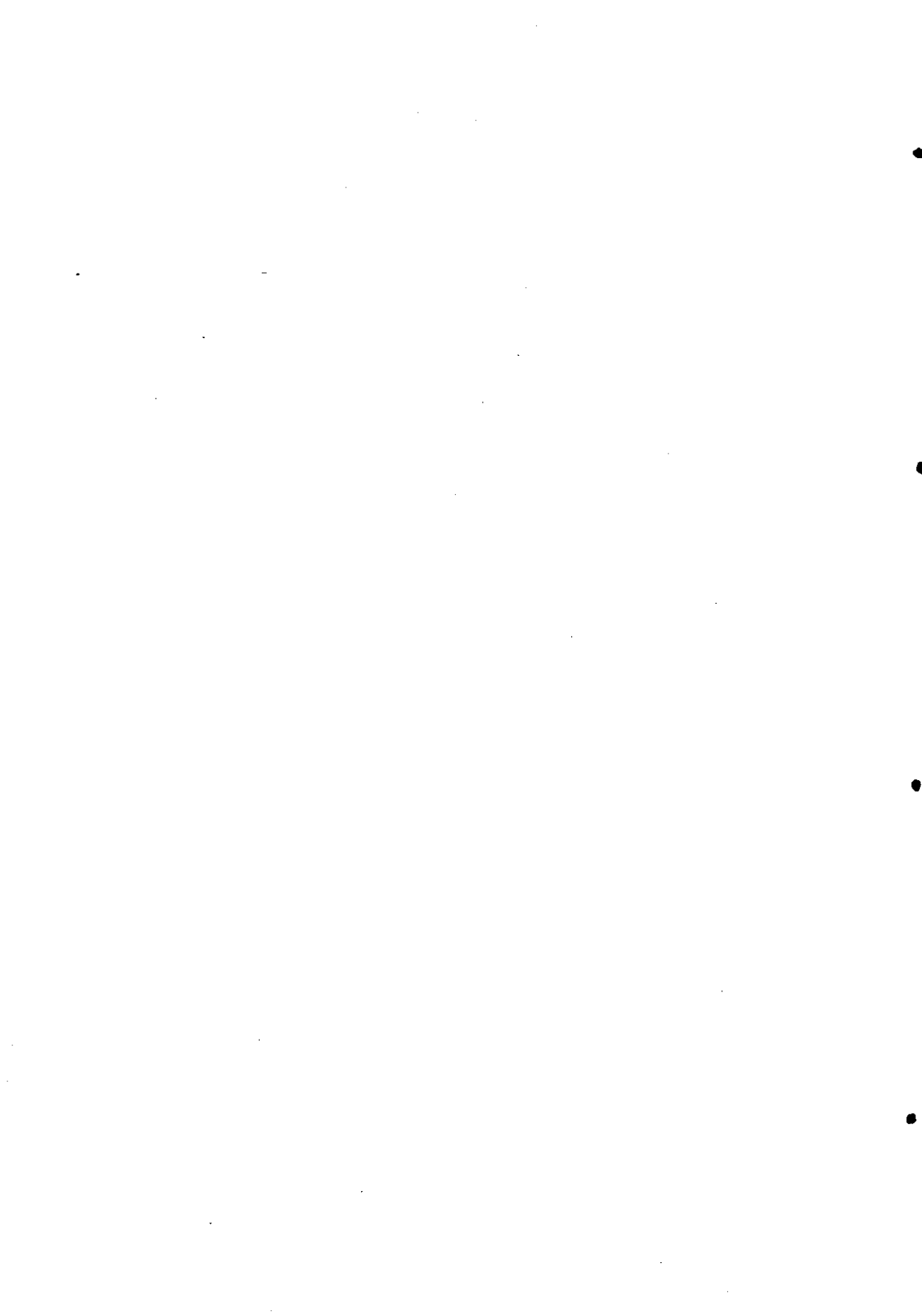


Foto portada:

$\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*.

Imagen obtenida del *Protein Data Bank*.

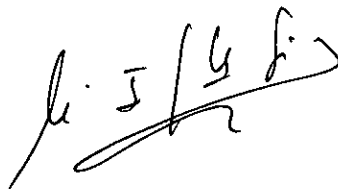
<http://www.rcsb.org/pdb>



El presente trabajo: **SECRECIÓN DE LA  $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces lactis***, presentado por D. Manuel Becerra Fernández para aspirar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de La Coruña.

Revisado el texto, estoy conforme con su presentación para ser juzgado.

A Coruña, 31 de Mayo de 1.999

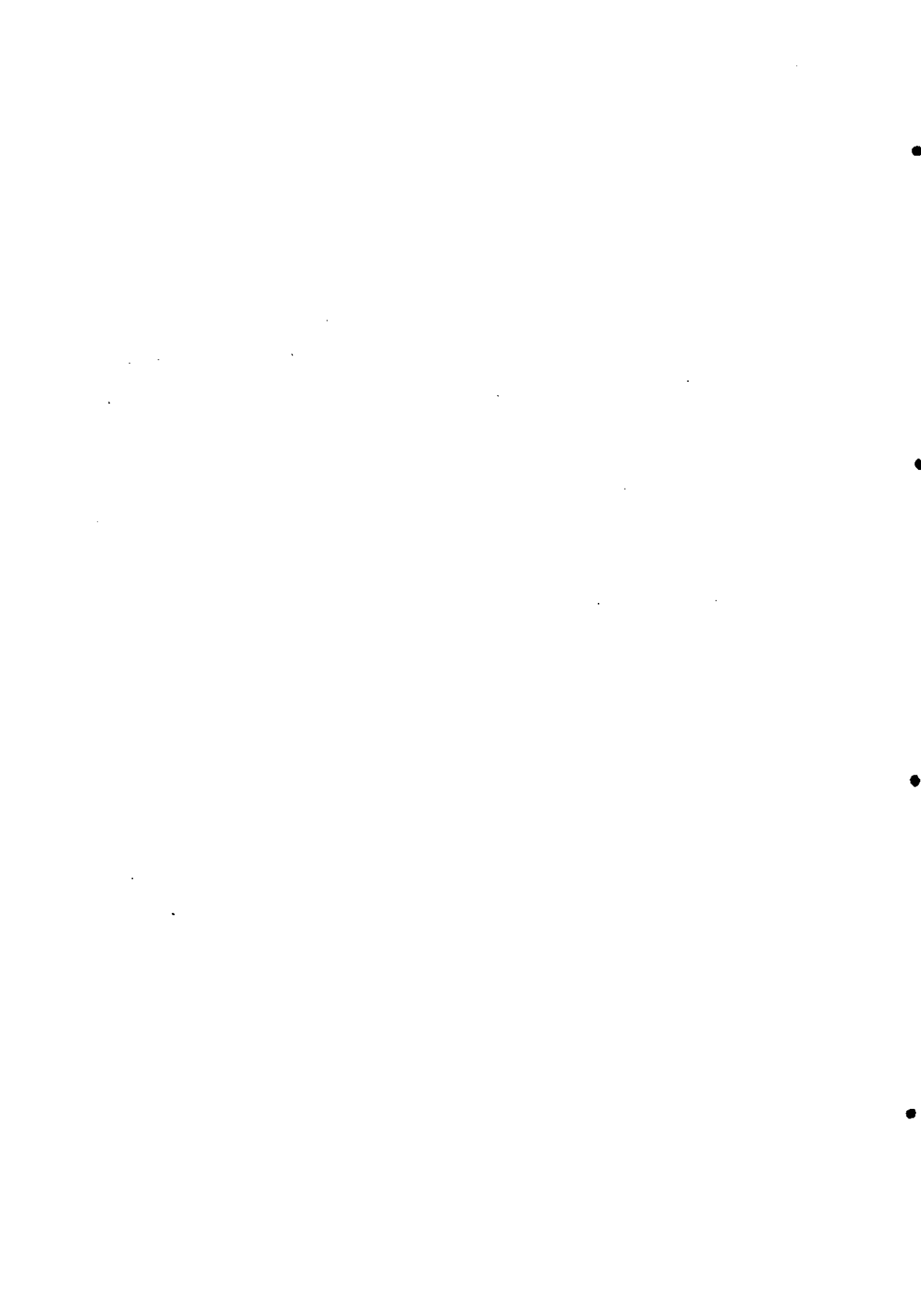


VºBº

LA DIRECTORA DEL TRABAJO

Dra. María Isabel González Siso

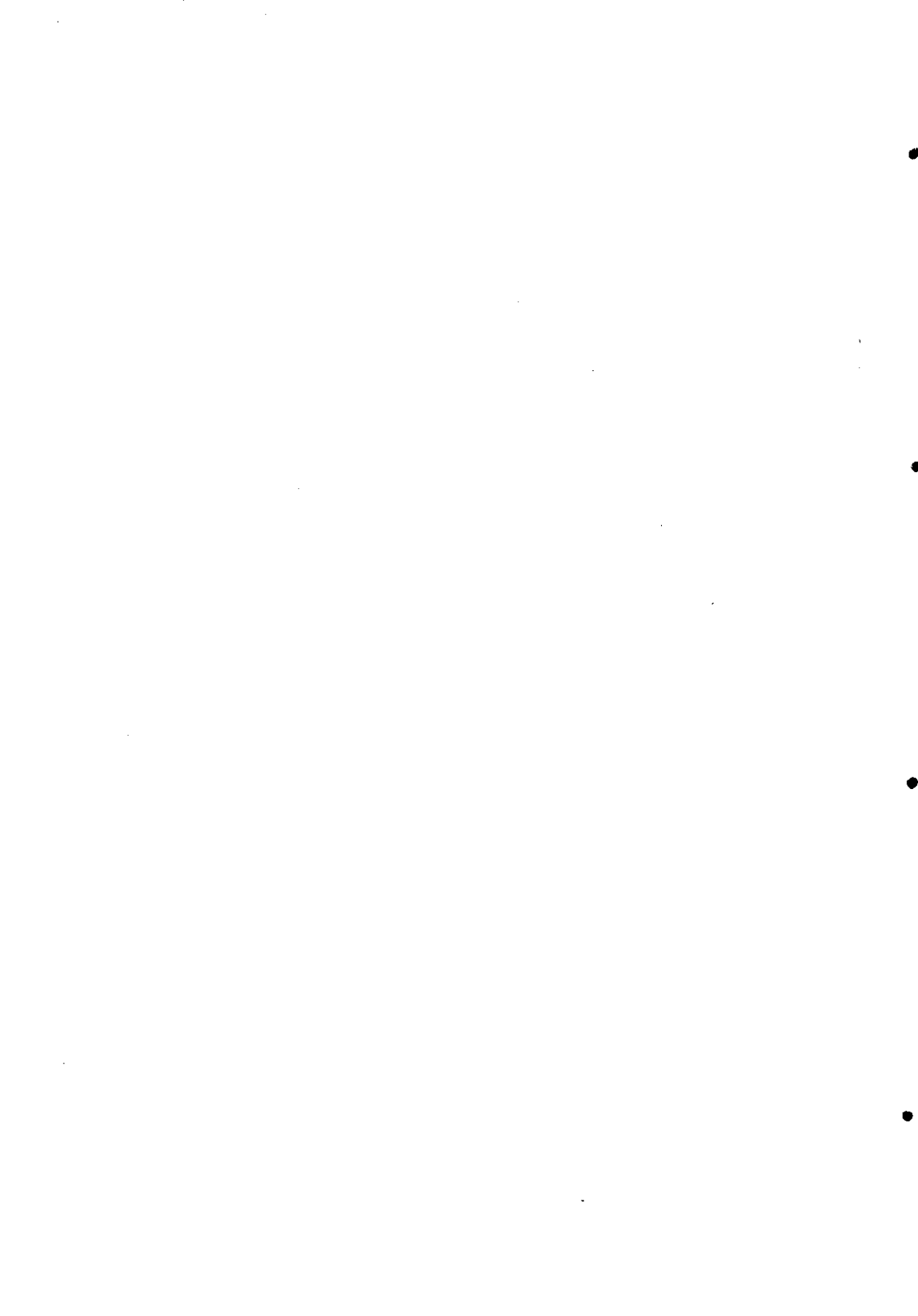
Profesora de Bioquímica y Biología Molecular.



El autor de este trabajo ha disfrutado durante su realización de una beca para cursar estudios de Tercer Ciclo de la Xunta de Galicia de 1.993 a 1.995, de una beca predoctoral de la Xunta de Galicia de 1.995 a 1.997 y de una beca de investigación del Instituto Danone de 1.998 a 1.999.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida a través de los proyectos CICYT (BIO94-0961) y XUGA (10302A98).





UNA PARTE DE LOS RESULTADOS QUE APARECEN EN LA PRESENTE MEMORIA HAN SIDO PUBLICADOS EN LOS SIGUIENTES ARTÍCULOS (VER ANEXO):

**Becerra, M. and Siso, M. I. G. (1996).** Yeast  $\beta$ -galactosidase in solid-state fermentations\*. *Enzyme Microb. Technol.*, **19**: 39-44.

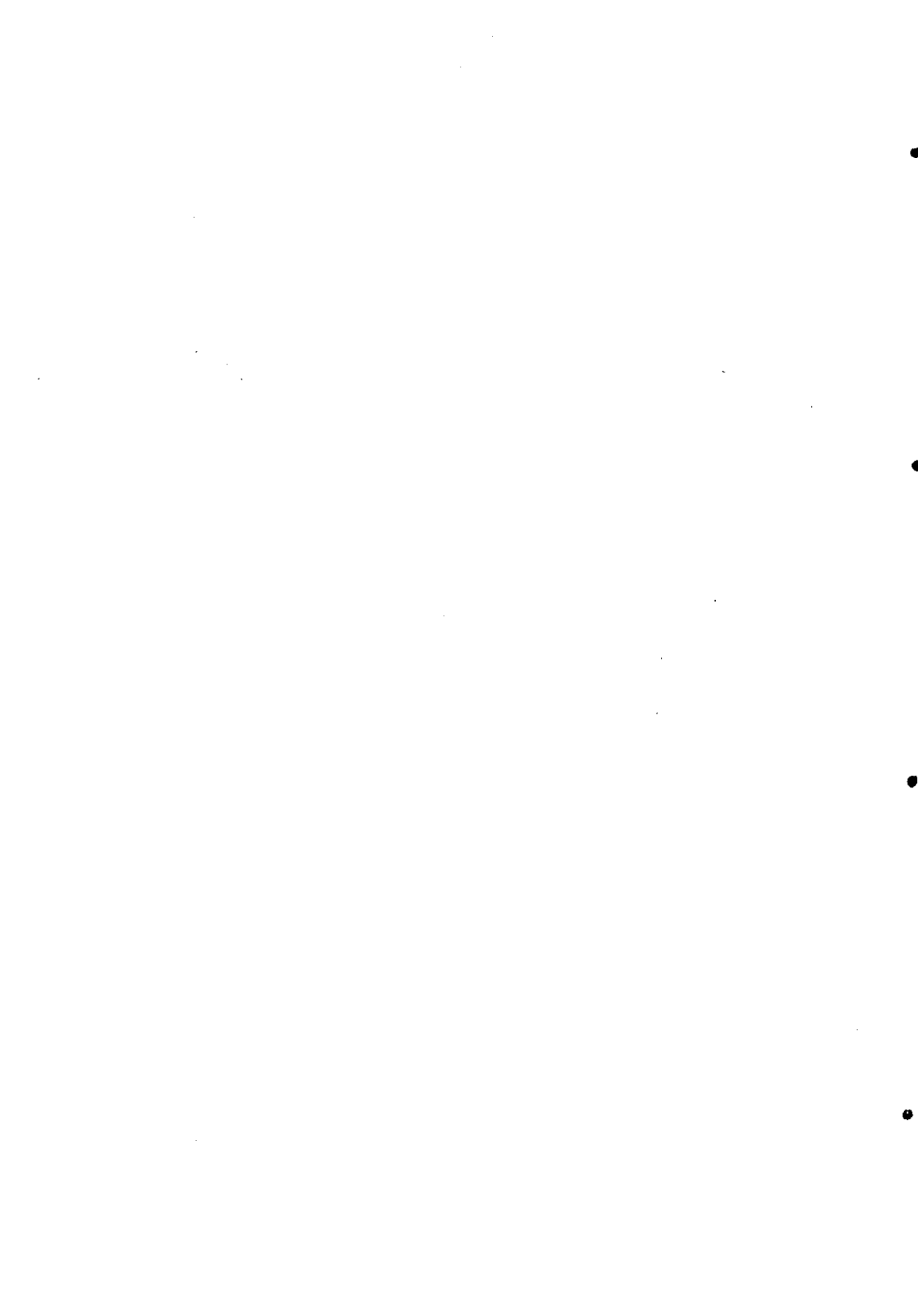
\* Sistema protegido por la patente española N° 2102975.

**Becerra, M., Cerdán, E. and Siso, M. I. G. (1997).** Heterologous *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase production and release by *Saccharomyces cerevisiae* osmotic-remedial thermosensitive autolytic mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1335**: 235-241.

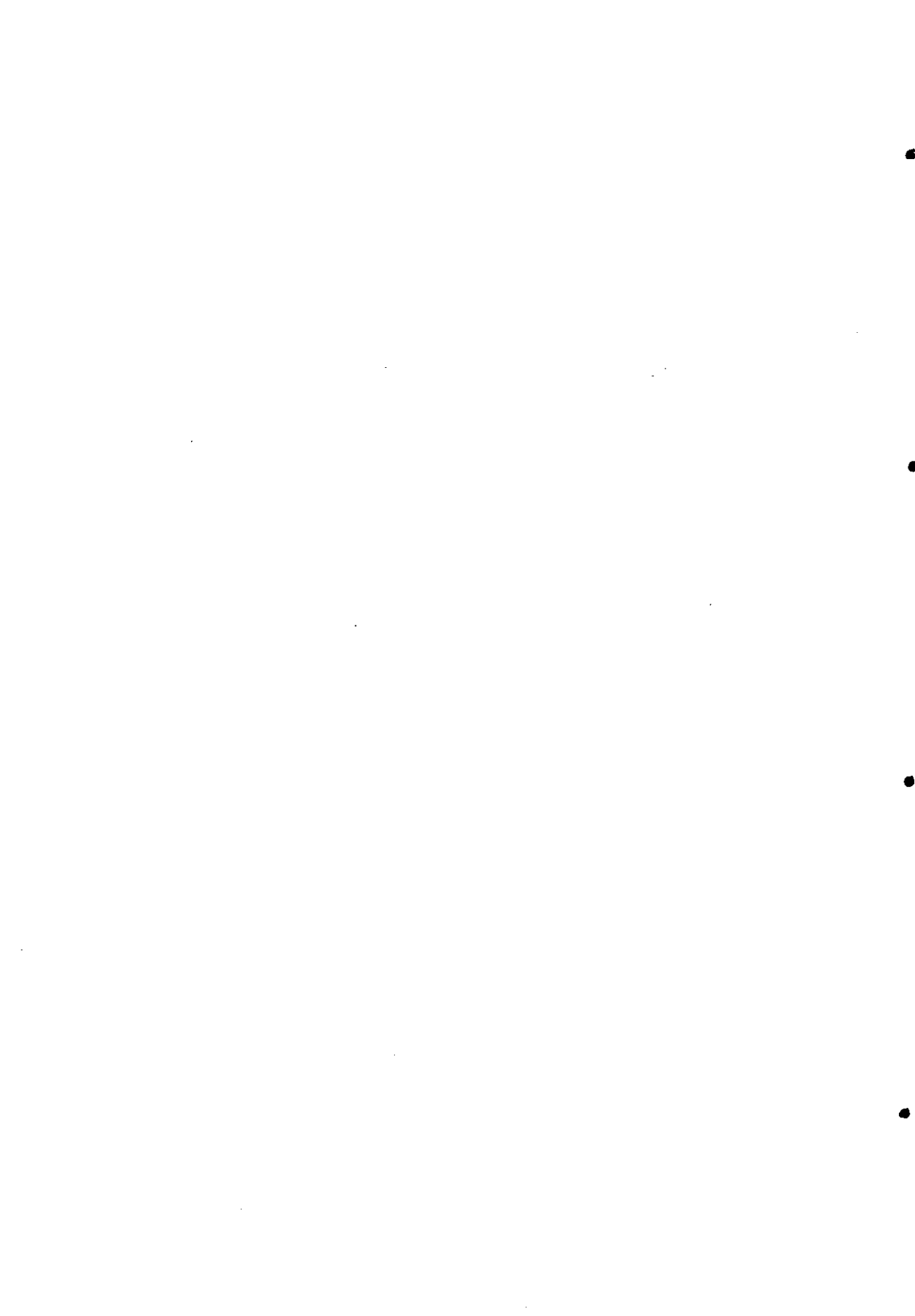
**Becerra, M., Cerdán, E. and Siso, M. I. G. (1998).** Micro-scale purification of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric forms are active. *Biotechnology Techniques*, **12**: 253-256.

**Becerra, M., Cerdán, E. and Siso, M. I. G. (1998).** Dealing with different methods for *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase purification. *Biological Procedures Online*, **1**: 48-58.

**Becerra, M., Rodríguez-Belmonte, E., Cerdán, E. and Siso, M. I. G. (1999).** Extraction of intracellular proteins from *Kluyveromyces lactis*. *Food Technology and Biotechnology* (en prensa).



*A mis padres y hermana*



Llegado este momento (¡por fin!) uno no se encuentra en las mejores condiciones para dar las gracias a todas aquellas personas sin cuya amistad y ayuda a lo largo de estos casi 6 años (¿¿ya??!!) no hubiese sido posible la realización de esta Tesis, sin embargo, vamos a intentarlo.

En primer lugar, debo agradecer a la Dra. M<sup>a</sup> Isabel González Siso, por su confianza, apoyo, ánimo y sus continuas enseñanzas, sin las cuales esto no llegaría a buen puerto.

A la Dra. Esperanza Cerdán Villanueva, por ser la primera en darme una oportunidad en este mundo de la Bioquímica.

Al Dr. José Manuel Leiro Vidal, por su ayuda en la preparación de los anticuerpos.

A la Dra. M. Wésolowski-Louvel por su cesión de la cepa MW190-9B, al Dr. César Nombela por la cesión de las cepas que lisan a temperaturas no permisivas (LD1 y LHDP1), al Dr. H. Fukuhara por la cesión del plásmido pSPGK1, a las empresas Quegalsa, Genome Therapeutics Corporation y Whitbread Biotechnology PLC por el suministro del lactosuero, mutantes super-secretores y plásmido pVK1.1, respectivamente.

A la Dra. Ana María Rodríguez Torres, a los también, ya doctores: Marián, Esther, Elvira, Belén, Luis; a los “quasi-doctores” que están pasando en estos momentos por lo mismo que yo: Mónica, José Luis; a las nuevas adquisiciones que aún les espera un largo y, espero, agradable, camino: Mónica II y Silvia. A todos ellos, compañeros y amigos de

Bioquímica, por mantener un ambiente de trabajo agradable y sobre todo por esos ratos de comentarios y “desbarres” simpáticos de última hora de la tarde que marcaron toda una época.

A todas las Marías de Ferrol que tuvieron en suerte, no sé si buena o mala, de caer en manos de esta panda de desequilibrados de Bioquímica, por su asistencia técnica y por su paciencia preparando ese medio de última hora.

A los compañeros de otros laboratorios: Fisiología Vegetal, Genética y Microbiología, que con sus conversaciones hicieron más llevadera la larga espera del autobús a la Zapateira.

A todos los amigos pertenecientes o no a la pandilla “plumilla” (me es muy difícil numerarlos a todos) que me alejaron del mundo de la probeta para llevarme al mundo real, por todos esos momentos juntos en la montaña que tanto me han ayudado a lo largo de este tiempo.

Y por supuesto, a mis padres y hermana a quienes todo debo.

En fin, a todos, gracias.

## ABREVIATURAS

**A:** absorbancia.

**aa:** aminoácido.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**APS:** persulfato amonico.

**ARN:** ácido ribonucleico.

**ATP:** adenosín-trifosfato.

**BNG:** 6-bromo-2-naftil- $\beta$ -D-galactopiranosido.

**BSA:** seroalbúmina bovina.

**°C:** grados centígrados.

**CIA:** cloroformo-alcohol isoamílico.

**dATP:** desoxiadenosín-trifosfato.

**DBO<sub>5</sub>:** demanda biológica de oxígeno.

**dCTP:** desoxicitosín-trifosfato.

**ddATP:** didesoxiadenosín-trifosfato.

**ddCTP:** didesoxicitosín-trifosfato.

**ddGTP:** didesoxiguanosín-trifosfato.

**ddNTPs:** didesoxirribonucleótidos trifosfato.

**ddTTP:** didesoxitimidí-trifosfato.

**dGTP:** desoxiguanosín-trifosfato.

**DMSO:** dimetil-sulfóxido.

**dNTPs:** desoxirribonucleósidos trifosfato.

**DQO:** Demanda química de Oxígeno.

**DTT:** ditioneitol.

**dTTP:** desoxitimidín-trifosfato.

**EDTA:** ácido etilendiamino tetra-acético.

**EGTA:** ácido etilenglicol-di-( $\beta$ -aminoetiléter) tetra-acético.



**g:** gramo.

**IPTG:** isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido.

**Kb:** kilobase.

**kDa:** kiloDalton.

**Kg:** quilogramo.

**M:** molar.

**MCS:** sitio de clonación múltiple (*multiple cloning site*).

**mg:** miligramo.

**min:** minutos.

**ml:** mililitro.

**MUG:** metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactósido.

**NADH:** nicotinamida adenina dinucleótido.

**nm:** nanómetro.

**NTPs:** nucleósidos trifosfato.

**ONP:** o-nitrofenol.

**ONPG:** o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido.

**P.M. o M.W.:** peso molecular (*molecular weight*).

**PAGE:** gel de poliacrilamida.

**pb:** pares de bases.

**PCIA:** fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.

**PEG:** polietilenglicol.

**PMSF:** fenilmetilsulfonilfluorídrico.

**ppm:** partes por millón.

**r.p.m.:** revoluciones por minuto.

**s:** segundos.

**SDS:** dodecil sulfato sódico.

**TBE:** tampón Tris/Borato/EDTA.

**TBS:** tampón Tris salino.

**TE:** tampón Tris/EDTA.

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina.

**Tm:** Toneladas.

**U:** unidades.

**UDP:** uridin-difosfato.

**U.E.:** unidades enzimáticas.

**UV:** ultravioleta.

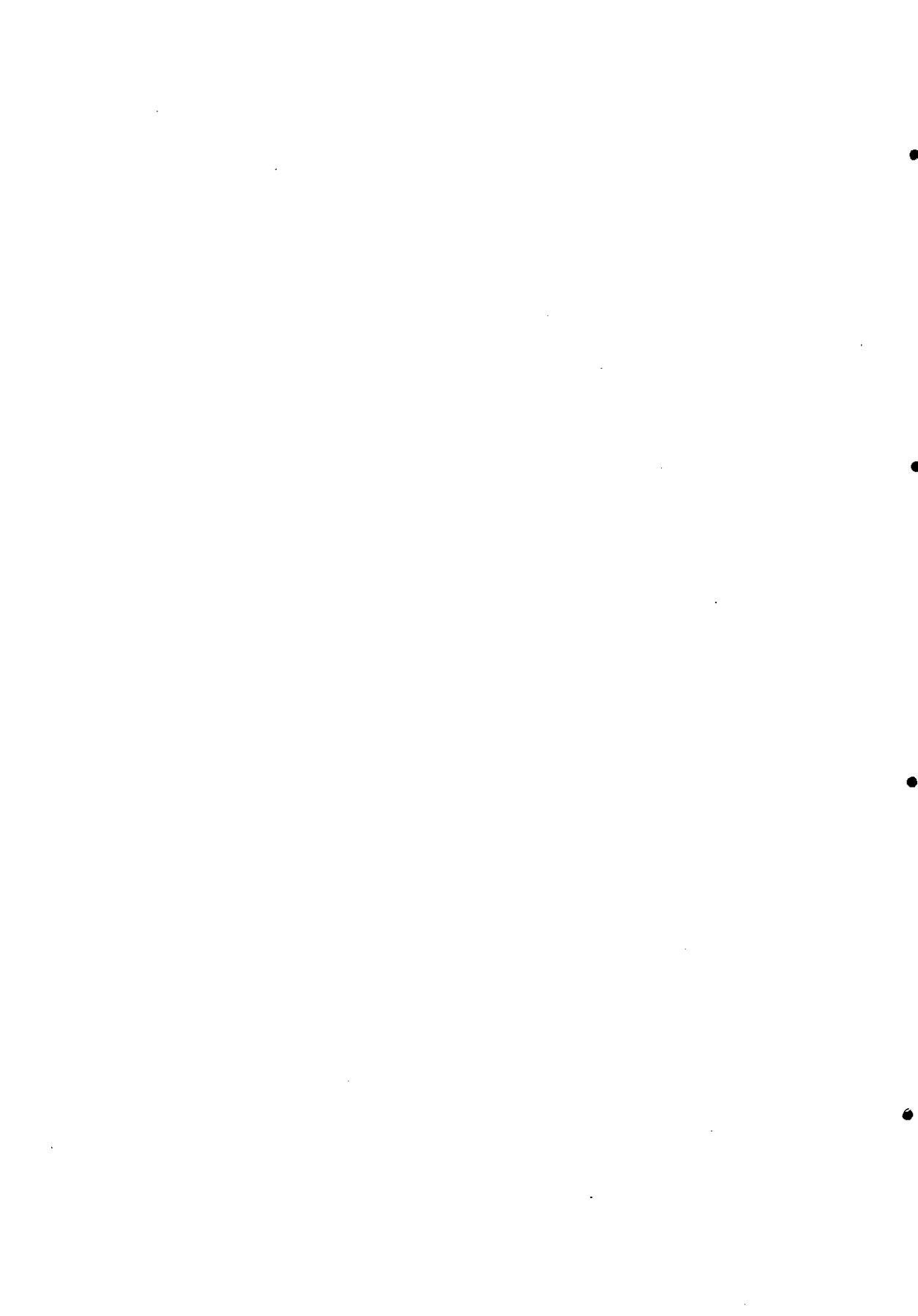
**V:** voltio.

**Ve:** volumen elución.

**W:** watio.

**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido.

**YNB:** base nitrogenada para levaduras (*yeast nitrogen base*).



# ÍNDICE.

## 1.INTRODUCCIÓN.

<b>1.Lactosueo: definición, problemática y utilización.</b>	3
1.1.Definición, composición y variedades.	3
1.2.Problemática.	4
1.3.Utilización.	5
1.3.1.Suero de leche concentrado o en polvo.	6
1.3.2.Concentrado de proteínas del lactosuero ( <i>WPC</i> ).	7
1.3.3.La lactosa y sus derivados.	9
1.3.4.Fermentación alcohólica.	11
1.3.5.Biogás.	13
1.3.6.Producción de proteína de origen celular ( <i>Single-cell protein, SCP</i> ).	13
1.3.7.Hidrólisis de la lactosa.	15
1.3.8.Otras bioproducciones.	19
<b>2.Estrategias para la obtención de una <math>\beta</math>-galactosidasa con un coste reducido.</b>	19
2.1.Cultivos en estado sólido ( <i>Solid State Fermentation, SSF</i> ).	20
2.2.Modificaciones genéticas.	24
2.2.1.Producción de proteínas heterólogas por levaduras.	25
2.2.2.Utilización de cepas mutantes para mejorar la secreción.	30
<b>3.Secreción de proteínas en levaduras.</b>	31
3.1.Mecanismos de translocación.	32
3.1.1.Translocación co-traducciona.	33
3.1.2.Translocación post-traducciona.	37
3.2.Modificaciones en el RE.	39
3.3.Retención de proteínas en el RE.	40
3.4.Vesículas de transporte.	41
3.4.1.Vesículas envueltas por clatrina.	42
3.4.2.Vesículas envueltas por el complejo COP I.	43

3.4.3. Vesículas envueltas por el complejo COP II.	45
3.5. Anclaje y fusión.	46
3.5.1. Familia VAMP.	48
3.5.2. Familia RAB.	49
3.5.3. Familia Syntaxina.	50
3.5.4. Familia SEC1.	50
3.5.5. Familia Velcro.	51
<b>2.OBJETIVOS.</b>	53
<b>3.MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	57
<b>1.Cepas celulares y plásmidos.</b>	59
1.1.Cepas de bacterias.	59
1.2.Cepas de levaduras.	60
1.3.Vectores y plásmidos.	61
<b>2.Medios y condiciones de cultivo.</b>	62
2.1.Medios de cultivo para bacterias.	63
2.2.Medios de cultivo para levaduras.	64
2.3.Condiciones de cultivo.	69
2.3.1.Cultivos en medio líquido.	69
2.3.2.Cultivos en medio sólido.	69
2.3.3.Cultivos en estado sólido.	70
<b>3.Técnicas de Biología Molecular.</b>	71
3.1.Obtención de ácidos nucleicos.	71
3.1.1.Obtención de ADN plasmídico a partir de bacterias.	71
3.1.2.Purificación de ADN para secuenciación.	73
3.1.3.Medida de la concentración del ADN.	73
3.2.Modificación enzimática del ADN.	74
3.2.1.Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.	74
3.2.2.Digestión con nucleasa S1 para eliminar extremos protuberantes.	74

3.2.3.Desfosforilación del ADN.	75
3.2.4.Ligamiento de fragmentos de ADN.	75
3.2.5.Utilización de polimerasas.	76
3.2.6.Amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	77
3.3.Métodos de transformación.	78
3.3.1.Transformación de <i>Escherichia coli</i> .	78
3.3.2.Transformación de levaduras.	80
3.4.Preparación de extractos proteicos de levadura.	83
3.4.1.Extracción con solventes.	83
3.4.2.Extracción por procedimientos mecánicos.	84
3.4.3.Extracción con enzimas.	85
3.5.Técnicas de electroforesis.	85
3.5.1.Electroforesis de ADN en geles de agarosa.	85
3.5.2.Electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida.	87
3.5.3.Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE).	87
3.6.Técnicas de secuenciación de ADN.	91
3.6.1.Preparación del ADN molde.	91
3.6.2.Reacciones de secuenciación.	92
3.6.3.Gel de secuenciación.	93
<b>4.Técnicas analíticas.</b>	95
4.1.Determinación de carbohidratos totales (reacción del fenol-sulfúrico).	95
4.2.Determinación de azúcares reductores (reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico).	95
4.3.Determinación de lactosa/D-galactosa.	96
4.4.Determinación de proteínas (método de Bradford).	97
4.5.Determinación de etanol.	97
4.6.Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa.	98
4.6.1.Determinación cualitativa de la actividad $\beta$ -galactosidasa.	98

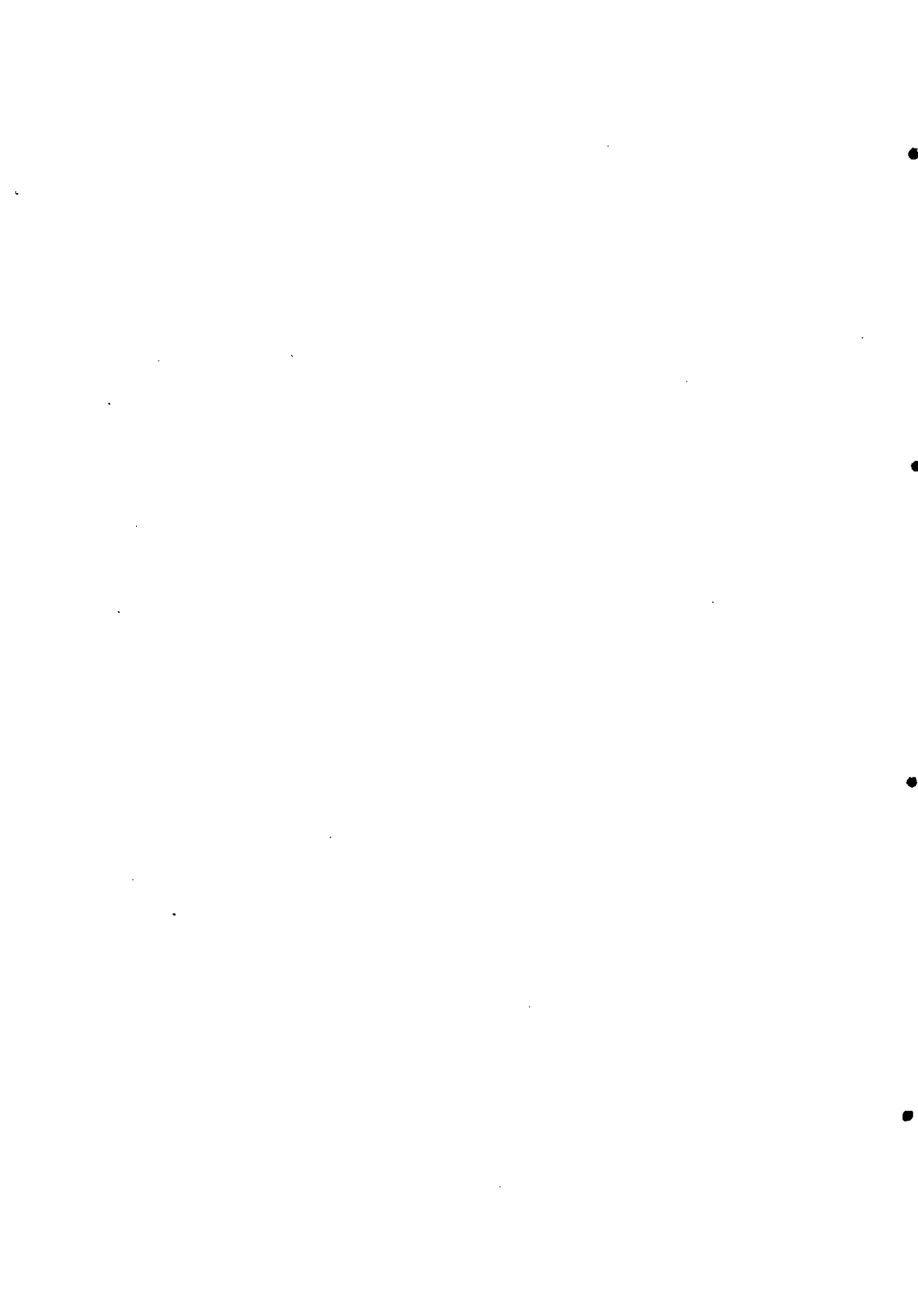
4.6.2.Determinación cuantitativa de la actividad β-galactosidasa.	98
4.7.Determinación de la presencia de proteasas.	100
<b>5.Técnicas cromatográficas.</b>	100
5.1.Cromatografía líquida de rápida resolución (FPLC).	100
5.1.1.Cromatografía de intercambio aniónico.	100
5.1.2.Cromatografía de exclusión en gel.	101
5.2.Cromatografía de afinidad.	102
<b>6.Técnicas inmunológicas.</b>	102
6.1.Producción de suero hiperinmune en ratones y conejos.	102
6.1.1.Obtención de anticuerpos contra la β-galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i> .	102
6.1.2.Obtención de anticuerpos contra la β-galactosidasa de <i>Kluyveromyces fragilis</i> .	104
6.2.Inmunodifusión de Ouchterlony.	104
6.3.Enzimoimmunoensayo ( <i>Enzyme linked immunosorbent assay. ELISA</i> ).	105
6.4.Inmunotransferencia ( <i>Western-blot</i> ).	106
<b>7.Microscopía electrónica.</b>	108
<b>8.Métodos estadísticos.</b>	109
<b>9.Programas informáticos.</b>	109
<b>4.RESULTADOS Y DISCUSION.</b>	111
<b>1.Purificación de la β-galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i>.</b>	113
1.1.Preparación del extracto crudo.	113
1.1.1.Extracción con solventes.	114
1.1.2.Extracción por procedimientos mecánicos.	115
1.1.3.Extracción con enzimas.	117
1.2.Purificación de la β-galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i> .	120
1.2.1.Cromatografía líquida de rápida resolución.	121
1.2.2.Cromatografía de afinidad.	125
1.2.3.Comprobación del grado de pureza.	127

1.2.4.Determinación del peso molecular.	128
1.2.5.Caracterización inmunológica de la β-galactosidasa.	133
<b>2.Producción de β-galactosidasa en cultivos en estado sólido.</b>	137
2.1.Evaluación de la capacidad nutritiva de los soportes.	137
2.2.Cultivos en estado sólido.	139
2.3.Diseño de un plan factorial completo.	141
2.4.Método de la máxima pendiente.	145
2.5.Estudio de la posible secreción de enzimas.	146
2.6.Estudio de otras variables que influyen en los cultivos en estado sólido.	147
<b>3.Construcción de un vector de secreción de β-galactosidasa.</b>	149
3.1.Construcción de un vector de secreción.	149
3.1.1.Diseño del vector.	149
3.1.2.Cinética de crecimiento y secreción.	153
3.1.3.Estudio de la influencia de la composición del medio de cultivo.	155
3.1.4.Localización subcelular de la β-galactosidasa.	157
3.1.5.Observación al microscopio electrónico.	161
3.2.Acortamiento de la proteína.	161
3.2.1.Diseño de la construcción.	162
3.2.2.Cinética de crecimiento y secreción.	167
3.3.Cambios en la estabilidad proteica.	170
3.3.1.Diseño de la construcción.	171
3.3.2.Cinética de crecimiento y secreción.	172
3.4.Construcción de proteínas híbridas.	173
3.4.1.Diseño de la construcción.	175
3.4.2.Cinética de crecimiento y secreción.	176
<b>4.Secreción de β-galactosidasa por mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.</b>	181
4.1.Utilización de mutantes que lisan a temperaturas no permisivas.	182



4.1.1.Liberación de proteínas por choque térmico.	182
4.1.2.Liberación de proteínas por choque osmótico.	187
4.2.Utilización de cepas super-secretoras.	190
4.2.1.Secretión en la cepa CGY1585.	193
<b>5.Construcción de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que utilizan lactosa.</b>	197
5.1.Cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en lactosa.	199
5.2.Cepa de <i>S. cerevisiae</i> BJ3505.	200
5.3.Cepas de <i>S. cerevisiae</i> que lisan a temperaturas no permisivas.	202
5.4.Cepas super-secretoras de <i>S. cerevisiae</i> .	204
5.5.Cepas de <i>S. cerevisiae</i> CGY339 y PEP4-1a.	208
<b>5.CONCLUSIONES.</b>	215
<b>6.BIBLIOGRAFÍA.</b>	221
<b>7.ANEXO.</b>	257

## **1. INTRODUCCIÓN.**



# 1. LACTOSUERO: DEFINICIÓN, PROBLEMÁTICA Y UTILIZACIÓN.

## 1. 1. DEFINICIÓN, COMPOSICIÓN Y VARIEDADES.

Se denomina *suero* al líquido remanente tras la precipitación y separación de la caseína de la leche durante la elaboración del queso.

Este subproducto representa, aproximadamente el 85-90% del volumen de la leche y retiene el 55% de sus nutrientes. Se encuentran entre los más abundantes las proteínas solubles, cuya proporción oscila entre el 0,6 y el 0,8%, la lactosa en una concentración del 4,5 al 5% y las sales minerales que representan del 8 al 10% del peso seco (Kosikowsky, 1979). Además contiene cantidades apreciables de lípidos (0,4-0,5%), calcio, ácido láctico y cítrico, compuestos nitrogenados no proteicos (urea y ácido úrico) y vitaminas pertenecientes al grupo B (Coton, 1976; Marwaha y Kennedy, 1988).

Industrialmente se producen dos variedades de suero de leche (Robbins y Lehrsch, 1998):

-*Suero ácido*: Se obtiene tras la acidificación de la leche hasta pH entre 2,5 y 3 para la coagulación de la caseína. Presenta un color verde claro y se genera en la fabricación de quesos inmaduros (queso fresco). Un inconveniente para su utilización en productos alimenticios es su sabor ácido, lo que hace disminuir la aceptabilidad de dichos productos (Weetall *et al.*, 1974; Mawson, 1994).

-*Suero dulce*: Su pH oscila entre 6-7. Se obtiene tras la incubación de la leche con fermentos para la fabricación de quesos maduros.

## 1. 2. PROBLEMÁTICA.

Las tendencias actuales del mercado indican un incremento paulatino a nivel mundial de la producción de queso, que genera más de 115 millones de toneladas de suero líquido -cada kg de queso produce aproximadamente 9 kg de suero (Robbins y Lehrsh, 1998)- de los cuales 6 millones de toneladas corresponden a lactosa (Smithers *et al.*, 1996; Berruga *et al.*, 1997). A pesar del gran valor nutritivo y aplicaciones tecnológicas de algunos componentes de este subproducto, así como de las numerosas investigaciones realizadas al respecto, en la actualidad, todavía no se ha desarrollado ningún proceso capaz de rentabilizar el tratamiento de las importantes cantidades de suero que se producen y se vierten cada año, representando un importante problema medioambiental debido a su elevada carga orgánica (DQO= 35.000-68.000 ppm y DBO<sub>5</sub>= 30.000-60.000 ppm según Berruga *et al.*, 1997). Una central quesera que procese 100 Tm de leche por día produce efluentes con aproximadamente la misma carga orgánica que una ciudad de 55.000 habitantes (Sienkiewicz y Riedel, 1990).

La importancia en Galicia del sector lácteo en general y de la industria quesera en particular es evidente. En 1996 se produjeron más de 2.110 millones de litros de leche, suponiendo esta cifra el 32,4% de la producción láctea española y un 1,87% de la producción total europea (Prieto *et al.*, 1997). Debido a la existencia de un volumen muy importante

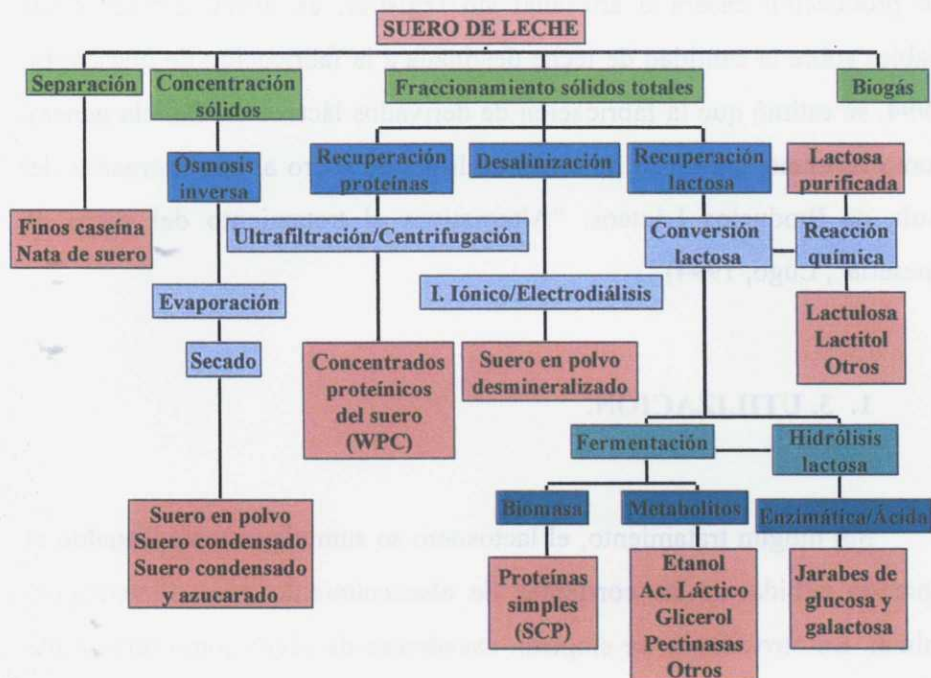
de producción casera o artesanal sin registrar, es difícil ofrecer datos fiables sobre la cantidad de leche destinada a la fabricación de quesos. En 1994, se estimó que la fabricación de derivados lácteos en Galicia genera, como residuos, unos 180 millones de litros de suero al año (Jornadas del Aula de Productos Lácteos: “Alternativas al tratamiento del suero de quesería”, Lugo, 1994).

### 1. 3. UTILIZACIÓN.

Sin ningún tratamiento, el lactosuero se suministra reemplazando el agua de bebida en las corrientes de abastecimiento para alimentación animal. En otros casos, se emplean excedentes de suero como fertilizante agrícola de pastos, para obtener algún beneficio a causa del depósito de sales aunque también puede disminuir la aptitud de la tierra para determinados cultivos (Robins y Lehrsch, 1998).

En la Unión Europea, en los años 80 únicamente un 53% del suero era transformado para su aprovechamiento, utilizándose aproximadamente el 30% como suero de leche en polvo, el 15% como lactosa y productos de su hidrólisis y el resto como concentrados de proteínas de lactosuero (Marwaha y Kennedy, 1988).

A continuación se mencionan varias alternativas posibles para la utilización de los excedentes de suero de leche que requieren algún tratamiento previo del mismo (Figura 1).



**Figura 1:** Tratamientos del suero y productos que pueden obtenerse a partir del mismo (modificado de Vicente, A. M., Resúmenes de las Jornadas del Aula de Productos Lácteos: "Alternativas al tratamiento del suero de quesería", Lugo, 1994).

### 1. 3. 1. Suero de leche concentrado o en polvo.

Al eliminar el agua total o parcialmente, secando o concentrando el suero, se mantiene durante más tiempo la misma calidad del suero líquido y resulta más fácil su manipulación y transporte.

Se pueden preparar diferentes modalidades como: suero completo, desmineralizado, sin lactosa, desproteinizado, enriquecido en grasas (Yves, 1979; Anon, 1983; Hall e Iglesias, 1997).

El mayor mercado para estos productos lo constituye la alimentación animal, sólo pequeñas cantidades se usan en alimentación humana

(industrias de panificación, heladería, derivados de productos lácteos). La dificultad para su utilización en alimentación humana estriba en tener un sabor excesivamente salado así como en la variabilidad de su composición y de los tratamientos a los que es sometido, lo que da lugar a texturas y gustos diferentes en los productos elaborados (Zadow, 1992).

### **1. 3. 2. Concentrado de proteínas del lactosuero (*Whey protein concentrate*, WPC).**

Se entiende como tal, todos aquellos productos derivados del procesado del suero con un contenido proteico del 30-60% (Kosikowski, 1979).

Excepto en los casos en los que el suero completo se deseca, el primer paso en los procedimientos de utilización de este subproducto lo constituye la recuperación de las proteínas, para lo cual se han ensayado diversos procedimientos, como son: la coagulación por calor (Stevenson *et al.*, 1996), la ósmosis inversa, la separación por exclusión molecular y la ultrafiltración (Outinen *et al.*, 1996). Este último es el más generalizado pues presenta varias ventajas (Evans y Gordon, 1980): un menor costo y mayor velocidad, no hay desnaturalización proteica y el concentrado de proteínas carece de sales haciéndolo utilizable en alimentación humana.

Las proteínas del suero constituyen aproximadamente el 20% de las proteínas de la leche. Las más importantes son, la  $\beta$ -lactoglobulina (54%) y la  $\alpha$ -lactoalbúmina (21%) (Smithers *et al.*, 1996). En una menor proporción aparecen las inmunoglobulinas (10%) (Konecny *et al.*, 1994), la seroalbúmina bovina (5%) y proteosa peptonas (0,23%) (Evans y Gordon, 1980). Estas proteínas son globulares y existen como moléculas



discretas. Comparándolas con las caseínas, son más sensibles al calor, menos sensibles al calcio y además pueden formar dímeros o polímeros por medio de enlaces disulfuro (Lorenzo, 1988), su contenido medio en cistina (1,35%) es superior al de las proteínas de la leche en su conjunto (0,36 %) (Yves, 1979).

Entre las características tecnológicas de las proteínas del lactosuero destacan (Evans y Gordon, 1980):

-Del análisis de su contenido en aminoácidos esenciales se deduce que son, de entre las proteínas de la leche, las que poseen la mayor eficacia alimentaria (Smithers *et al.*, 1996).

-Representan un importante aporte de lisina (10,5% frente al 7,75% de las proteínas totales de la leche), lo que las hace idóneas tanto para complementar dietas basadas en cereales (pobres en lisina) como para la elaboración de productos de cocción en los que se deban producir reacciones de Maillard (aroma y coloración).

-Se unen fácilmente a otras proteínas modificando sus características físicas.

-Tienen una importante capacidad de retención de agua, y también de formación de espuma en ausencia de materia grasa.

-Favorecen la formación de emulsiones con el agua y la materia grasa.

Además de las importantes aplicaciones que tiene el WPC y de su alto valor comercial (Perea *et al.*, 1993; Margot *et al.*, 1994; Dalev, 1994; Smithers *et al.*, 1996), su preparación presenta ventajas adicionales ya que facilita el aprovechamiento del permeado pues las proteínas provocan

procesos de floculación de las levaduras cultivadas sobre el suero de leche, lo que ocasiona la inhibición de las fermentaciones. Hoy en día los procesos basados en cultivos microbianos sobre permeado de suero de leche se presentan como las alternativas más rentables en la transformación de los excedentes de este material (Castillo, 1990).

Es importante tener en cuenta que la separación de las proteínas no soluciona el problema de la DQO creada por la lactosa remanente en el permeado (Mawson, 1994), de ahí que resulten de interés las diversas posibilidades para la utilización de dicho azúcar (Coton, 1976; Castillo, 1990; Berruga *et al.*, 1997).

### **1. 3. 3. La lactosa y sus derivados.**

La lactosa es el disacárido (galactosa-glucosa, enlace  $\beta$ -1,4) característico de la leche, siendo ésta su única fuente natural. Constituye la mayor parte del potencial contaminante del suero, ya que es el componente que aporta la mayoría de la carga orgánica (Berruga *et al.*, 1997). Se separa del suero por cristalización.

Es importante fisiológicamente para los mamíferos (Yves, 1979): a nivel estructural, facilita la fijación del calcio y la formación del esqueleto, a nivel intestinal, se hidroliza en sus monosacáridos constituyentes, de los cuales la galactosa es indispensable para la formación de las células cerebrales del sistema nervioso central. Por otro lado, la transformación de la lactosa en ácido láctico contribuye a mantener el grado necesario de acidez intestinal. Sin embargo, existen individuos con incapacidad para metabolizar la lactosa, de ahí el interés en obtener leche o productos

lácteos con bajo contenido en este disacárido (Coughlin y Charles, 1980; Somkuti y Holsinger, 1997; Leis *et al.*, 1997).

Entre sus características tecnológicas destacamos las siguientes (Yves, 1979):

-Posee un débil poder edulcorante (40% del de la sacarosa), lo cual es interesante para su utilización en productos farmacéuticos como excipiente. Además, se plastifica por compresión, lo que facilita su utilización en comprimidos.

-Este poder edulcorante se puede incrementar, hasta el 70% del de la sacarosa, por hidrólisis hasta glucosa y galactosa, y aún más si posteriormente la glucosa se isomeriza a fructosa. La hidrólisis incrementa también la solubilidad de la lactosa y favorece, por tanto, el uso del suero en productos de confitería, helados, etc., así como su utilización como sustrato para numerosas fermentaciones (Gekas y López-Leiva, 1985; Marwaha y Kennedy, 1988).

-Su punto de fusión es relativamente bajo, 202°C, lo que constituye una ventaja si se pretende la formación de reacciones de Maillard.

-Tiene doble capacidad de fijación de aromas que la sacarosa.

Aunque la producción de lactosa de suero de leche se ha incrementado constantemente a escala internacional desde 1940, las cantidades de lactosa purificada que se producen requieren el uso de solamente el 5% del suero disponible (Moulin y Galzy, 1984). Se están investigando usos alternativos, la mayoría de ellos basados en la fermentación directa de la lactosa o la fermentación de la glucosa y galactosa obtenida por hidrólisis de la lactosa (Tin y Mawson, 1993; Nolan

*et al.*, 1994; Berruga *et al.*, 1997). Otras alternativas para la utilización de la lactosa son:

-Reducción a lactitol, no digerible para los humanos, y cuyo poder edulcorante es ligeramente superior al de la lactosa. Se usa como un aditivo en dietas bajas en calorías (Sienkiewicz y Riedel, 1990)

-Isomerización a lactulosa, disacárido utilizado en farmacología. Se sintetiza por isomerización de la lactosa en una solución alcalina (Dendene *et al.*, 1994; Kozempel y Kurantz, 1994 a y b).

-Producción de lactosilurea que es usada como una fuente de nitrógeno no proteico en alimentación animal (Moulin y Galzy, 1984; Sienkiewicz y Riedel, 1990).

#### **1. 3. 4. Fermentación alcohólica.**

Uno de los inconvenientes para utilizar el suero como sustrato de la fermentación alcohólica radica en que el número de microorganismos capaces de metabolizar directamente la lactosa a etanol es muy reducido, y los que hay son de crecimiento lento o se inhiben con moderadas concentraciones de azúcar y de etanol (Moulin y Galzy, 1984). En general, la producción de etanol a partir de suero no concentrado no resulta económica, pues los niveles que se obtienen son del 2-2,5%, lo que implica, por una parte, elevados costes de destilación para separar este alcohol (Tin y Mawson, 1993), y por otra parte, tampoco es suficiente para fabricar vino.

A pesar de que hay diversos trabajos en la bibliografía cuyo objetivo es la búsqueda de microorganismos capaces de producir etanol

directamente sobre lactosa, hasta ahora no se ha encontrado ninguno que mejore los rendimientos logrados con *Kluyveromyces fragilis* (Paul *et al.*, 1998). Recientemente cepas de *Candida pseudotropicalis* han mostrado rendimientos razonables de etanol a partir de lactosa y suero de leche concentrado (Szczo drak *et al.*, 1997). La levadura conocida de mayor capacidad fermentadora y ampliamente utilizada en la industria cervecera, *Saccharomyces cerevisiae*, carece de lactosa permeasa (la función de este transportador de lactosa es controlar la entrada del azúcar en la célula) y de  $\beta$ -galactosidasa intracelular con lo cual es incapaz de fermentar directamente la lactosa a etanol (Russel, 1986; Castillo, 1990). Una alternativa interesante consiste en la hidrólisis de la lactosa por  $\beta$ -galactosidasa de otros microorganismos y posterior fermentación por *S. cerevisiae* (Champagne y Goulet, 1988). Este proceso se puede desarrollar en dos pasos o en uno sólo, con cultivos mixtos o con la enzima y la levadura coinmovilizadas. No obstante, cuando *S. cerevisiae* usa la mezcla de glucosa y galactosa como fuente de carbono, manifiesta un crecimiento diáuxico y baja producción de etanol (Coughlin y Charles, 1980). Otra desventaja de estos procesos es el alto precio de la  $\beta$ -galactosidasa (Sienkiewicz y Riedel, 1990).

Una alternativa, que en la actualidad se está investigando intensamente y a la cual contribuimos con este trabajo (se describirá con más detalle en el capítulo 5 de los resultados y discusión), consiste en la construcción de cepas de *S. cerevisiae* capaces de utilizar la lactosa y, de este modo, conseguir que la levadura se desarrolle directamente sobre el suero de leche, produciendo etanol, biomasa o algún otro producto de interés (Sreekrishna y Dickson, 1985; Russel, 1986; Vanoni *et al.*, 1989;

---

Jeong *et al.*, 1991; Porro *et al.*, 1992 b; Kumar *et al.*, 1992; Compagno *et al.*, 1993; Rubio-Teixeira *et al.*, 1998).

### 1. 3. 5. Biogás.

La digestión anaeróbica produciendo metano que puede ser usado directamente como una fuente de energía *in situ* ha sido abundantemente empleada en el tratamiento de residuos industriales (Patel y Madamwar, 1996).

Varias cepas diferentes de bacterias anaeróbicas convierten primero los componentes individuales del suero (lactosa, proteínas y lípidos) en ácidos volátiles tales como ácido acético, y éstos en metano y dióxido de carbono, formándose biogás (una mezcla de metano:CO<sub>2</sub> en relación 60:40 ó 50:50) (Kemp y Quickenden, 1989; Sienkiewicz y Riedel, 1990). No obstante, aunque se reduce considerablemente la DQO, los efluentes de los procesos anaeróbicos no son adecuados para verter directamente y se requiere algún proceso aeróbico posterior (Mawson, 1994).

### 1. 3. 6. Producción de proteína de origen unicelular (*Single-cell protein, SCP*).

La obtención a escala industrial, a partir de suero de leche, de biomasa microbiana para usar como alimento se realizó por primera vez en Francia, en las industrias *Le Bel* (patente de 1955) (Moulin y Galzi, 1984). Se hacen crecer preferentemente levaduras que utilizan directamente la lactosa (*Kluyveromyces fragilis* y *K. lactis*) sobre permeado de suero de leche, ya que estos microorganismos no pueden utilizar las proteínas, y

además éstas provocan la floculación de las levaduras, lo que inhibe las fermentaciones (Mansour *et al.*, 1993). Los únicos elementos nutritivos indispensables son lactosa, sales minerales y vitaminas del grupo B, aunque puede ser necesario suplementar con N y P, dependiendo del suero usado (Kosikowski, 1979).

Los cultivos tienen lugar en continuo, manteniéndose durante más de 12 meses sin detenciones. Se han definido las condiciones de cultivo para la mayor parte de las levaduras estudiadas encontrándose valores de pH óptimo comprendidos entre 2,4-6,2. Aunque muchas cepas presentan mayores velocidades de crecimiento y rendimiento a 38°C, la mayor parte de los autores usan 30°C. Se recomiendan temperaturas altas y pH bajos, porque reducen el riesgo de contaminaciones (Castillo, 1990).

En el caso de las industrias *Le Bel*, el rendimiento en levadura seca es del 50% del peso de la lactosa utilizada. Las levaduras se recogen por centrifugación y se calientan a 85°C para de este modo plasmolizar las células. Finalmente se secan en unos cilindros y torres de atomización. La biomasa obtenida contiene un 48-52% de proteínas, equilibradas en aminoácidos y ricas en lisina, vitaminas del grupo B, vitamina C y factores biológicos importantes como el glutatión. El producto se comercializa con el nombre de *PROTIBEL* (Yves, 1979).

En 1983 se implantó el primer proceso industrial para la producción de levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) a partir de suero en Kentucky por la *Nutrisearch Company*. El proceso implica la hidrólisis de la lactosa en el permeado de suero de leche por lactasa inmovilizada seguida de la fermentación de la glucosa-galactosa (Castillo, 1990).

### **1. 3. 7. Hidrólisis de la lactosa.**

Debido a que existe un número muy superior de microorganismos, con interés comercial, capaces de metabolizar la glucosa y galactosa que de utilizar directamente la lactosa como fuente de carbono, la hidrólisis previa de este disacárido a sus monosacáridos constituyentes aumenta notablemente el número de bioproducciones que pueden obtenerse a partir del suero de leche (Van Huynh y Declaire, 1982). Por otra parte, según se ha expuesto anteriormente, tanto el poder edulcorante como la solubilidad de la lactosa, aumentan tras la hidrólisis favoreciendo el uso del jarabe glucosa-galactosa obtenido en productos alimenticios. Este proceso también permite la elaboración de leche con reducido contenido en lactosa para paliar el problema de intolerancia a la misma que sufren algunos individuos. Sólo en Estados Unidos, el consumo de derivados lácteos con bajo contenido en lactosa supone unos 78 millones de dólares, siendo un mercado en continua expansión (Somkuti y Holsinger, 1997). Esta hidrólisis puede realizarse por dos vías: ácida y enzimática, siendo esta última la preferida.

La hidrólisis ácida (Gekas y López-Leiva, 1985) se puede producir en fase homogénea (el ácido libre en la disolución) o en fase heterogénea (empleándose una resina de intercambio iónico). Se obtiene un 80% de conversión a pH 1,2 y a 150°C. Es un método sencillo y de bajo coste, pero presenta una serie de inconvenientes: las severas condiciones operacionales provocan la desnaturalización proteica; se necesita realizar una desmineralización previa del suero pues las sales minerales desactivan el ácido; aparición de color marrón por las reacciones de Maillard que hace necesario un proceso de decoloración con carbón activado; y la formación de subproductos no deseados.



La hidrólisis enzimática se produce mediante la enzima lactasa o  $\beta$ -galactosidasa (EC. 3.2.1.23) que se encuentra en organismos animales, plantas, bacterias, hongos y levaduras, si bien los preparados comerciales disponibles y reconocidos como aptos para el consumo humano (*Generally Regarded As Safe*, GRAS) proceden sólo de unas pocas especies de levaduras y microhongos siendo los más importantes *Kluyveromyces lactis* y *K. fragilis*, *Aspergillus niger* y *A. oryzae* (Coughlin y Charles, 1980; Gekas y López-Leiva, 1985; Machado y Linardi, 1990; Barberis y Gentina, 1998). La utilización en industrias alimentarias de  $\beta$ -galactosidasa bacteriana (obtenida fundamentalmente a partir de *Escherichia coli*) se descarta por no cumplir las normas sanitarias requeridas (Gekas y López-Leiva, 1985).

Los microhongos secretan esta enzima extracelularmente lo que facilita su recuperación del medio de cultivo, si bien la producción de enzima es menor que en levaduras. Su pH óptimo es ácido y posee baja actividad a valores superiores al óptimo, con lo cual sólo se puede usar para hidrolizar la lactosa en sueros de tipo ácido. La  $\beta$ -galactosidasa de levaduras es intracelular, siendo su pH óptimo próximo a la neutralidad, lo que la hace adecuada para la sacarificación de la leche y del suero dulce. A pesar de los numerosos estudios realizados, la producción y utilización de esta enzima resulta problemática debido a los elevados costos de extracción así como a su baja estabilidad (Goughlin y Charles, 1980; Gekas y López-Leiva, 1985; Stredánsky *et al.*, 1993). Con el objetivo de mejorar la producción de  $\beta$ -galactosidasa a partir de suero de leche se han propuesto cultivos por lotes o *fed-batch* (Siso, 1994) y cultivos en estado sólido (Becerra y Siso, 1996).

---

Algunas  $\beta$ -galactosidasas pueden ser inactivadas por la presencia de grupos sulfidrilo y por metales pesados. Requieren cofactores catiónicos como  $Mn^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ . Son usualmente inhibidas por galactosa (Portaccio *et al.*, 1998) y algunos galactósidos pero no por glucosa, aunque en *K. fragilis* también se inhibe por glucosa. La lactosa induce la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa en *K. fragilis* y *K. lactis* que están sujetas a represión catabólica (Castillo, 1990; Berruga *et al.*, 1997).

La hidrólisis se puede realizar en fase homogénea, con la enzima libre en el suero de leche, manteniendo la mezcla en condiciones adecuadas de pH y temperatura hasta obtener el grado de hidrólisis deseado. Este sistema resulta poco rentable debido al elevado precio de la  $\beta$ -galactosidasa y a su inestabilidad.

En la hidrólisis en fase heterogénea, la enzima se encuentra inmovilizada sobre diversos soportes o insolubilizada por polimerización. Estos procesos pueden desarrollarse en continuo y ofrecen la posibilidad de reutilizar la enzima con la consiguiente reducción en los costos. El primer preparado de lactasa inmovilizada data de 1968, desde entonces se han desarrollado numerosas variantes (Gekas y López-Leiva, 1985; Bódalo *et al.*, 1991; Illanes *et al.*, 1990; Ortega-López *et al.*, 1993; Irazoqui y Batista-Vieira, 1994; Siso *et al.*, 1994; Mammarella y Rubido, 1996; Ovsejevi *et al.*, 1998; Portaccio *et al.*, 1998), si bien muy pocas se están utilizando en plantas industriales. El método más utilizado es el de la copolimerización con glutaraldehído, compuesto que no plantea problemas desde el punto de vista de la utilización de los productos en alimentación.

En la práctica, un inconveniente de la hidrólisis enzimática de la lactosa radica en que, algunas veces, va seguida de la polimerización de la

galactosa o de la unión de la lactosa para formar oligosacáridos (Guy y Bingham, 1978; Gekas y López-Leiva, 1985; López-Leiva y Guzmán, 1996; Sheu *et al.*, 1998) haciendo difícil obtener más del 75% de hidrólisis.

Una posibilidad, que todavía no se ha desarrollado lo suficiente, consiste en la utilización de las células enteras como catalizadores (Siso, 1996). A este respecto, existen estudios que avalan la viabilidad de este proceso pues citan que es posible obtener similares resultados con células de *K. fragilis* y *K. bulgaricus* que con la enzima extraída de ellas (Declaire *et al.*, 1986). El inconveniente más importante, derivado de la reducida permeabilidad de las membranas celulares para la lactosa así como de la fermentación no deseada de los productos de hidrólisis, puede ser solventado por tratamiento de las células con diversos compuestos químicos (Siso *et al.*, 1992; Somkuti y Holsinger, 1997). La inmovilización de células ofrece ventajas adicionales principalmente cuando la enzima es intracelular e inestable ya que los procesos de extracción y/o purificación de la enzima son innecesarios y por tanto se reducen los costos; además, el rendimiento en actividad enzimática y la estabilidad operacional son superiores y las levaduras pueden ser reutilizadas (Karel *et al.*, 1985; Toldrá y Lequerica, 1986). Se ha desarrollado un procedimiento para la sacarificación del suero de leche usando células enteras de *K. lactis* inmovilizadas en carozo de maíz y permeabilizadas con etanol (Siso y Doval, 1994).

### 1. 3. 8. Otras bioproducciones.

Además de las citadas, también se ha investigado la producción por diversos microorganismos a partir de suero de leche, fundamentalmente hidrolizado, de: ácido láctico (Zayed y Zahran, 1991; Roukas y Kotzekidou, 1991; Chiarini *et al.*, 1992; Norton *et al.*, 1994), ácido propiónico (Blanc y Goma, 1989; Colomban *et al.*, 1993), ácido acético (Yang y Silva, 1995), ácido oxálico (Bohlmann *et al.*, 1998; Cameselle *et al.*, 1998), poligalacturonasa (García-Garibay *et al.*, 1987), giberelinas (Kahlon y Malhotra, 1986), amilasas (Machado y Linardi, 1990), glicerol (Rapin *et al.*, 1994), proteasas (Ali y Mohamed Roushdy, 1998), poli-3-hidroxitirato (Yellore y Desai, 1998), oligosacáridos (Belem y Lee, 1998; Rustom *et al.*, 1998), derivados de ARN (Belem y Lee, 1997; Belem *et al.*, 1997), oligopéptidos (Belem *et al.*, 1999), lisozima (Maullu *et al.*, 1999), otras enzimas (Friend y Shahani, 1979; Foda, 1981; Méndez *et al.*, 1989), etc.

## 2. ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCIÓN DE UNA $\beta$ -GALACTOSIDASA CON UN COSTE REDUCIDO.

Como se ha comentado en el apartado anterior, la hidrólisis enzimática de la lactosa con  $\beta$ -galactosidasa constituye la base de los procesos biotecnológicos más prometedores que están siendo desarrollados actualmente para aprovechar el azúcar del suero de leche. La  $\beta$ -galactosidasa de levaduras, en concreto del género *Kluyveromyces*, es la

fuelle más importante de esta enzima. No obstante, como se ha mencionado, la producción y el uso industrial de esta enzima intracelular son problemáticas.

En este trabajo se han estudiado dos planteamientos diferentes para conseguir una reducción en el coste de la preparación enzimática, por una parte, mediante cultivos en estado sólido, que presentan una serie de ventajas frente a los cultivos líquidos tradicionales y, por otra, mediante modificaciones genéticas para conseguir que la enzima sea liberada al medio de cultivo.

## **2. 1. CULTIVOS EN ESTADO SÓLIDO (*SOLID STATE FERMENTATIONS, SSF*).**

El término fermentaciones en estado sólido se refiere al crecimiento de microorganismos sobre materiales sólidos en ausencia de agua libre (Cannel y Moo-Young, 1980 a; Pandey, 1992). El soporte, no obstante, debe contener absorbida la suficiente humedad, puesto que por debajo del 12% cesa la actividad biológica de los microorganismos (Cannel y Moo-Young, 1980 a). La baja cantidad de agua disponible en las SSF limita el número de microorganismos empleados, siendo los hongos los más usados, seguidos de las levaduras y en menor número las bacterias (en el caso del *composting*). Los microorganismos responden a una cantidad de agua reducida en el medio de crecimiento incrementando la concentración de uno o varios componentes intracelulares que actúan como osmorreguladores, protectores de actividades enzimáticas, o como una reserva alimenticia (Hahn-Hägerdal, 1986). En algunos casos se produce la

---

excreción de proteínas intracelulares al medio, como ocurre con la  $\alpha$ -galactosidasa (Pandey, 1991; Shankaranand *et al.*, 1992).

En general, se distinguen dos clases de cultivos en estado sólido (Pastrana, 1996): la primera se refiere a aquellos cultivos en los que el material sólido, insoluble en agua y humedecido, actúa al mismo tiempo como principal fuente de nutrientes y como soporte físico para el microorganismo. En ocasiones, además, el sustrato se enriquece con nutrientes adicionales a fin de mejorar la producción. En la segunda clase, se consideran los cultivos en los que el soporte es un sólido nutricionalmente inerte que actúa únicamente como lugar de anclaje del microorganismo, y que, para el cultivo, se embebe en una solución nutritiva.

Como soporte se pueden emplear muy diversos materiales como granos de cereales (o alguna parte de ellos), semillas oleaginosas, residuos agrícolas o forestales (Muniswaran *et al.*, 1994; Muniswaran y Charyulu, 1994; Castillo *et al.*, 1994). También se encuentra descrito el uso de materiales inorgánicos como la vermiculita, la perlita, o la amberlita (Aidoo *et al.*, 1982; Zhu *et al.*, 1994).

Originariamente, la técnica procede de formas tradicionales de producción de bebidas y alimentos fermentados (pan y queso son los ejemplos clásicos), pero fue sobre todo en los países orientales donde experimentó un mayor desarrollo. La introducción de la aplicación industrial de esta modalidad de cultivo en el mundo occidental a finales del siglo pasado, se debió a la utilización del proceso *koji* para la obtención de amilasas (Aidoo *et al.*, 1982). Actualmente persisten tres procesos tradicionales de SSF que aún están en funcionamiento: la producción de

comidas orientales como el *shoyu* (salsa picante de soja), *miso* (pasta usada en el desayuno o como sopa) o bebidas alcohólicas como el *sake*; la producción de quesos tipo *Roquefort* o *Camembert*; y las fermentaciones de residuos agrícolas y forestales para producir abonos (*composting*).

Las SSF presentan una serie de ventajas frente a otros procedimientos de fermentación que las hacen especialmente atractivas y con grandes expectativas futuras (Hesseltine, 1972; Ralph, 1976; Cannel y Moo-Young, 1980 a; Aidoo *et al.*, 1982; Kumar y Lonsane, 1989; Pastrana, 1996):

1.-Simplicidad de los medios de cultivo, ya que generalmente un único sustrato proporciona casi todos los nutrientes necesarios.

2.-Fermentadores con menores requerimientos espaciales, ya que los sustratos se utilizan más concentrados y no se necesitan grandes volúmenes de agua.

3.-Mayor simplicidad en el diseño de los fermentadores y de los sistemas de control.

4.-Mayores facilidades para la obtención y aplicación del inóculo, pudiendo utilizarse las esporas directamente en la mayor parte de las situaciones.

5.-Facilidad para el escalado de los procesos.

6.-Necesidades reducidas de disolventes para la extracción de los productos.

7.-Rendimientos comparables, e incluso superiores, a los correspondientes procesos en cultivo sumergido (Lonsane *et al.*, 1985; Becerra y Siso, 1996).

8.-Reducido riesgo de contaminaciones bacterianas, menos aptas para soportar la baja actividad de agua que caracteriza a estos sistemas. Posibilidad, en ocasiones, de trabajar incluso en condiciones no asépticas.

9.-Elevada aireación del sistema, lo que hace a esta modalidad de cultivo especialmente adecuada a aquellos procesos que impliquen un metabolismo oxidativo intenso.

10.-Bajos requerimientos energéticos. A menudo no es preciso autoclavar, airear ni agitar.

11.-Ambiente similar al de los hábitats naturales de los microorganismos utilizados.

12.-Reducido volumen de efluentes.

Complementariamente, entre los inconvenientes inherentes al sistema deben mencionarse (Hesseltine, 1972; Ralph, 1976; Cannel y Moo-Young, 1980 a; Aidoo *et al.*, 1982; Kumar y Lonsane, 1989; Pastrana, 1996):

1.-Frecuente necesidad de pretratamiento de los sustratos (molienda, prehidrólisis parciales).

2.-Dificultad para mantener los niveles óptimos de humedad durante la fermentación (Dorta *et al.*, 1994).

3.-Ausencia de métodos analíticos simples para determinar el crecimiento microbiano.

4.-Dificultad de control y regulación de variables del cultivo como temperatura, humedad, pH y oxígeno libre durante el proceso (Auria *et al.*, 1992).



5.-Dificultad para la agitación en aquellos procesos que así lo requieran.

6.-Frecuente necesidad de inóculo voluminoso (Roussos *et al.*, 1991).

7.-Escasez de diseños y desarrollos de ingeniería para la construcción de los fermentadores, así como para ciertas operaciones (inoculación, extracción de los productos) (Cannel y Moo-Young, 1980 b; Lonsane *et al.*, 1985; Gowthaman *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 1996).

Hoy en día, entre muchas de las aplicaciones industriales de los cultivos en estado sólido, se encuentran la producción de: amilasas (Ramesh y Lonsane, 1987; Murado, 1997; Torrado *et al.*, 1998), lipasas (Bhushan *et al.*, 1994), celulasas (Muniswaran *et al.*, 1994; Muniswaran y Charyulu, 1994), xilanasas (Wiacek-Zychlinska *et al.*, 1994; Castillo *et al.*, 1994), ácido giberélico (Kumar y Lonsane, 1987; Pastrana *et al.*, 1995), ácido cítrico (Shankaranand *et al.*, 1992; Pintado *et al.*, 1998), toxinas (Hesseltine, 1972), antibióticos y otros metabolitos de interés (Pandey, 1992), SCP (Jwanny *et al.*, 1995), etanol (Kumar *et al.*, 1998), etc.

## 2. 2. MODIFICACIONES GENÉTICAS.

Dentro del campo de las modificaciones genéticas para promover la secreción de proteínas intracelulares existen varias vías. Una de ellas se basa en fusionar al gen la secuencia de un péptido señal de secreción heterólogo. Otra posibilidad consiste en la utilización de mutantes con un fenotipo supersecretor o autolítico. Ambas son analizadas a continuación.

---

### 2. 2. 1. Producción de proteínas heterólogas por levaduras.

La secreción de proteínas heterólogas en el medio de cultivo puede ser una manera conveniente de obtener grandes cantidades de estas proteínas heterólogas en una forma relativamente pura, sin contaminantes de proteínas celulares y abaratando los costos asociados a la extracción y purificación de la proteína (Romanos et al., 1992).

Las levaduras son hospedadores atractivos para la producción de proteínas heterólogas. Presentan una serie de características favorables (Buckholz y Gleeson, 1991): por una parte, al ser microorganismos unicelulares, presentan las ventajas de los sistemas bacterianos en cuanto a la facilidad de su manipulación y rapidez de crecimiento; por otra, presentan una organización subcelular eucariótica capaz de llevar a cabo los procesos de modificación post-traducciona l de muchas proteínas de mamíferos. Además, las levaduras se han utilizado durante siglos en la elaboración del pan y de la cerveza y sus propiedades de crecimiento y metabolismo han sido bien estudiadas.

La mayoría de las proteínas recombinantes producidas por levaduras se han expresado usando *Saccharomyces cerevisiae* como sistema hospedador. La elección de este organismo se ha basado en los conocimientos adquiridos durante años de su genética y fisiología. Además se considera un organismo GRAS permitiendo su uso en la industria de la alimentación.

No obstante, presenta ciertas limitaciones como hospedador para la expresión de proteínas heterólogas (Buckholz y Gleeson, 1991; Müller *et al.*, 1998): las producciones son generalmente bajas, alcanzando un máximo de 1-5% de proteína total, incluso con promotores fuertes;

también la estabilidad plasmídica es baja, reduciendo el crecimiento y la productividad; se produce una considerable hiperglicosilación de las proteínas secretadas, generando propiedades inmunológicas inadecuadas para usos farmacéuticos (Karine *et al.*, 1994). Por todas estas razones y porque permite obtener mayores concentraciones de proteína heteróloga, *K. lactis* ha recibido una atención considerable para desarrollar sistemas recombinantes eficientes. Así, por ejemplo, si se comparan las productividades de estos dos hospedadores para el caso de la proquimosina, *K. lactis* produce hasta 20 veces más de proteína (Van der Berg *et al.*, 1990) que *S. cerevisiae* (Smith *et al.*, 1985).

Además, la mayoría de las proteínas heterólogas en *S. cerevisiae* no son secretadas directamente al medio de cultivo, sino que permanecen retenidas en el interior celular o en el espacio periplásmico, entre la membrana plasmática y la pared celular, requiriendo manipulaciones de tipo bioquímico o físico para ser liberadas. Recientemente se ha descubierto en *S. cerevisiae* un octapéptido (N-FPTALVPR-C) en el extremo N-terminal que parece facilitar la excreción al medio de crecimiento de proteínas periplasmáticas (Venturini *et al.*, 1997). Muchas de las proteínas heterólogas expresadas en levaduras diferentes a *S. cerevisiae* han sido secretadas y en numerosos casos se han excretado en el medio de cultivo. Así, la proquimosina es secretada por *K. lactis* con una eficiencia de más del 95% (Van der Berg *et al.*, 1990) comparada con sólo el 1% alcanzado con cepas de *S. cerevisiae* (Smith *et al.*, 1985) (Tabla 1).

Para conseguir una expresión estable y continua de la proteína heteróloga son importantes tanto el promotor usado como el vector (Da Silva y Bailey, 1991; Nacken *et al.*, 1996). De hecho, la síntesis de un producto génico es dependiente de la estabilidad del vector recombinante y

de la dosis del gen clonado. Se suelen utilizar promotores constitutivos fuertes para la expresión de proteínas heterólogas, pero las células que sintetizan altos niveles de estas proteínas crecen lentamente y pueden degradar dichas proteínas durante el crecimiento. Los promotores inducibles pueden solventar este problema; se puede emplear una fermentación en dos pasos para obtener, primero, crecimiento abundante de la biomasa y después de un período corto de inducción, la síntesis de la proteína (Porro *et al.*, 1991).

Un vector de secreción de levadura debe cumplir los siguientes atributos (Castelli *et al.*, 1994): un promotor fuerte capaz de expresarse en diferentes células, ser de alto número de copias y estable durante el crecimiento de la levadura (sin selección) en un fermentador y debe permitir producir, en los mínimos pasos intermedios posibles, vectores recombinantes que posibiliten la secreción de un producto específico.

La producción de proteínas heterólogas con éxito depende tanto de las características genéticas como de las condiciones fisiológicas (Rossini *et al.*, 1993). La optimización de los parámetros ambientales ayuda a la excreción de proteínas heterólogas, ofreciendo ventajas para su purificación (Chen *et al.*, 1993; Wittrup y Benig, 1994; Chang *et al.*, 1998).

En la tabla 1 se recogen algunas de las proteínas que se han conseguido secretar en estas dos últimas décadas empleando diferentes levaduras y distintas señales de secreción.

Proteína	Origen <sup>a</sup>	Tamaño (kDa)	Señal secreción	Levadura secretora	% Secreción <sup>b</sup>	Referencia
Factor de crecimiento epidérmico	Humano (E)	20	Factor $\alpha$ mating de <i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	95%	Brake <i>et al.</i> , 1984
Lisozima	Humana (E)	20	Lisozima de pollo	<i>S. cerevisiae</i>	60%	Jigami <i>et al.</i> , 1986
Seroalbúmina	Humana (E)	66,5	Nativa	<i>S. cerevisiae</i>	90%	Sleep <i>et al.</i> , 1990
Proquimosina	Bovina (E)	46	Nativa	<i>K. lactis</i>	95%	Van der Berg <i>et al.</i> , 1990
Glucoamilasa	Arxula adenivorans (E)	67,4	Nativa	<i>S. cerevisiae</i>	1%	Smith <i>et al.</i> , 1985
Interleuquina 2	Humana (E)	19	Inulina de <i>K. marxianus</i>	<i>K. lactis</i>	90%	Bui <i>et al.</i> , 1996
Interleuquina 1 $\beta$	Humana (E)	17	Toxina killer de <i>K. lactis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	90%	Chung <i>et al.</i> , 1996 a y b
Xilanasa	Dictyoglomus thermophilum (I)	35	Toxina killer de <i>K. lactis</i>	<i>K. lactis</i>	90%	Walsh y Bergquist, 1997
Hormona paratiroidea	Humana (E)	9	Factor $\alpha$ mating de <i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	30%	Vad <i>et al.</i> , 1998
Hormona crecimiento	Trucha (E)	22	Fosfatasa ácida de <i>K. lactis</i>	<i>K. lactis</i>	20%	Ferriñan y Domínguez, 1998
Factor estimulador de formación de colonias de granulocitos	Humano (E)	18,7	Toxina killer de <i>K. lactis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	45%	Bae <i>et al.</i> , 1998

<b>Invertasa</b>	<i>S. cerevisiae</i> (P)	90	Nativa	<i>P. pastoris</i>	80-90%	Tschopp <i>et al.</i> , 1987
				<i>S. cerevisiae</i>	9%	Nam <i>et al.</i> , 1993
<b>Endoglucanasa A</b>	Clostridium thermocellum (E)	56	Nativa	<i>H. polymorpha</i>	85% (P)	Rodríguez <i>et al.</i> , 1996
		69	Factor $\alpha$ mating de <i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	10-30%	Wang y Da Silva, 1993
<b>Endo-<math>\beta</math>-glucanasa</b>	Trichoderma reesei (E)	30	Glucoamilasa II de <i>S. diastaticus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	10-60%	Chung <i>et al.</i> , 1997
		30	Invertasa de <i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	99%	Penttilä <i>et al.</i> , 1987
<b><math>\alpha</math>-galactosidasa</b>	Saccharomyces carlsbergensis (E)	30	Invertasa de <i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	41%	Rossini <i>et al.</i> , 1993
		30	Cyamopsis tetragonoloba (E)	<i>S. cerevisiae</i>	92%	Harmsen <i>et al.</i> , 1993
<b><math>\alpha</math>-amilasa</b>	Bacillus licheniformis (E)	60	Invertasa de <i>S. cerevisiae</i>	<i>K. lactis</i>	95%	Hensing <i>et al.</i> , 1995
		68	Aspergillus niger (E)	<i>P. pastoris</i>	95%	Paifer <i>et al.</i> , 1994
<b>Glucosa oxidasa</b>			Factor $\alpha$ mating de <i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	80%	Dé Baetselier <i>et al.</i> , 1991

**Tabla 1:** Secreción de proteínas heterólogas por levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*) empleando diferentes señales de secreción.

<sup>a</sup> Se indica entre paréntesis la localización natural de la proteína. (E) extracelular, (I) intracelular, (P) periplasmática.

<sup>b</sup> Porcentaje de secreción al medio extracelular. (P) Localización periplasmática de la proteína expresada.

### 2. 2. 2. Utilización de cepas mutantes para mejorar la secreción.

El uso de cepas que presentan un fenotipo super-secretor constituye una herramienta de investigación muy útil para estudiar los mecanismos de secreción proteica en levaduras y para incrementar la producción de proteínas heterólogas (Kotylak y El-Gewely, 1991).

Estudiando mutantes que presentan una secreción aumentada de un producto particular, se han aislado varias cepas de *S. cerevisiae* con un fenotipo super-secretor (Romanos *et al.*, 1992). Smith *et al.*, (1985), al encontrar que menos de un 1% de la proquimosina de ternera producida heterológamente por *S. cerevisiae* era secretada, diseñó un ensayo para aislar colonias super-secretoras. Este ensayo se basó en el hecho de que una colonia de levadura que secreta proquimosina deja una *huella* del material secretado en la superficie de la placa de agar sobre la que crece. Así, se consiguieron hasta 39 cepas de levadura super-secretoras, de ellas dos fueron identificadas y denominadas *ssc1* y *ssc2* (*supersecreting*, *ssc*). La mutación *ssc1* incrementa de cinco a cincuenta veces los niveles de proquimosina, de hormona de crecimiento bovino y de pro-uroquinasa secretada (Smith *et al.*, 1985; Melnick *et al.*, 1990). Los efectos fueron aditivos en el doble mutante *ssc1-ssc2*. El gen *SSC1* es idéntico al *PMR1* (*BSD1*), que codifica para una ATPasa dependiente de calcio (Rudolph *et al.*, 1989).

Mediante aproximaciones similares se han identificado diferentes cepas super-secretoras (Sakai *et al.*, 1988; Barr *et al.*, 1989; Ruohonen *et al.*, 1997).

Un nuevo sistema para liberar proteínas producidas intracelularmente se basa en la utilización de cepas de levaduras que lisan

a temperaturas no permisivas, debido a la expresión de mutaciones que traen consigo la formación de una pared celular alterada, como la mutación *lyt2-1* que determina la autólisis de las células cuando crecen a la temperatura no permisiva de 37°C (Torres *et al.*, 1991). Este nuevo sistema constituye una alternativa para la producción industrial de proteínas tanto homólogas como heterólogas (Fuente *et al.*, 1993; Álvarez *et al.*, 1994; Álvarez *et al.*, 1995; Becerra *et al.*, 1997).

### **3. SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN LEVADURAS.**

La secreción de proteínas es un proceso universal, constituyendo uno de los capítulos más importantes de la producción de proteínas en el campo de la biotecnología, así como un mecanismo fundamental en las células vivas. La comprensión de las propiedades bioquímicas que hacen que una proteína sea más fácilmente secretable, así como un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares que rigen los procesos de secreción proteica, ayuda a la hora de construir sistemas de secreción de levaduras más eficientes para la excreción de proteínas heterólogas.

La secreción proteica consta de varios pasos: primero, translocación a través de la membrana del retículo endoplasmático (RE); segundo, glicosilación y plegamiento en la luz del RE; tercero, salida del RE a través de vesículas de transferencia; cuarto, modificaciones en el aparato de Golgi; y finalmente, liberación de las vesículas de secreción al espacio extracelular.



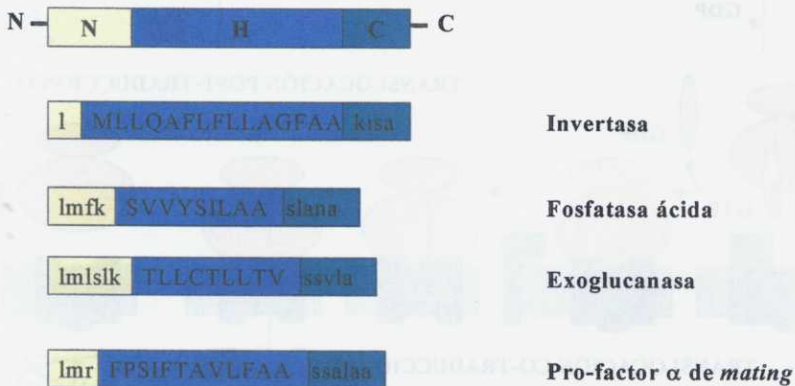
### 3. 1. MECANISMOS DE TRANSLOCACIÓN.

La translocación de proteínas constituye el primer paso en el proceso que dirige una proteína a la vía secretora y, por lo tanto, inicia el viaje hacia el exterior celular, a la membrana plasmática, o a los orgánulos intracelulares que constituyen el sistema endomembranoso (Walter y Johnson, 1994).

En procariotas, las proteínas de secreción son transferidas directamente a través de la membrana plasmática, mientras que en eucariotas, son translocadas, en un proceso similar, a través de la membrana del RE, y posteriormente son transportadas en vesículas hasta la membrana plasmática. Las proteínas de membrana siguen procesos similares. En todos los organismos, la translocación de proteínas a través de la membrana plasmática y su integración dentro de ella son conducidas por secuencias señal hidrofóbicas que son intercambiables: las secuencias señal de procariotas pueden funcionar en eucariotas y viceversa (Jungnickel *et al.*, 1994). Mientras las secuencias señal de las proteínas de secreción son, a menudo, escindidas, las de las proteínas de membrana pueden servir como un anclaje permanente a la misma. El anclaje implica secuencias hidrofóbicas adicionales.

La señal que dirige una proteína hacia la membrana del RE (péptido señal) es una secuencia de pocos aminoácidos, alrededor de 20, situada en el extremo amino terminal de la proteína. Presenta una estructura tripartita común a todos los organismos (Haguenauer-Tsapis, 1992; Larriba, 1993; Sakaguchi, 1997; Morosoli *et al.*, 1997; Stephens, 1998; Lammertyn y Anné, 1998): un extremo amino terminal polar muy variable (región n)

seguido por una región larga altamente hidrofóbica (región h), flanqueada en su extremo carboxilo terminal por una corta cadena ligeramente hidrofílica de unos 5 a 7 aminoácidos que incluye el punto de hidrólisis del péptido señal (región c) (Figura 2). La región n suele tener una carga neta positiva que parece ser importante para la correcta orientación de la proteína dentro de la membrana del RE (Boyd y Beckwith, 1990). La hidrofobicidad de la región h es fundamental en la función del péptido señal.



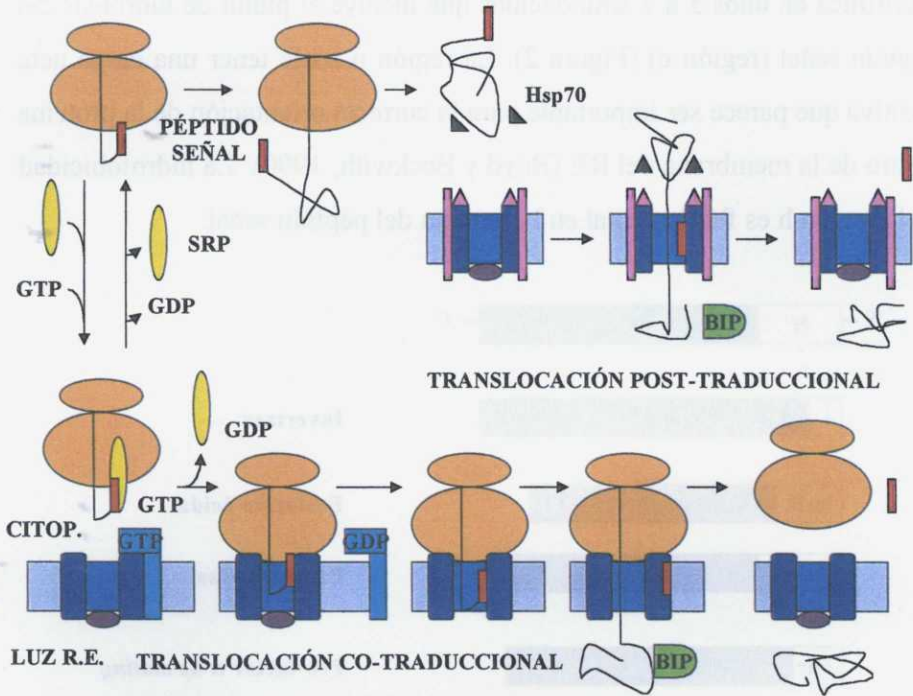
**Figura 2:** Péptidos señal de algunas proteínas de levadura (Modificado de Larriba, 1993).

El transporte de una proteína a través de la membrana del RE puede ocurrir durante su síntesis (translocación co-traducciona) o después de su traducción (post-traducciona) (Figura 3).

### 3. 1. 1. Translocación co-traducciona.

Ocurre en toda clase de organismos, aunque su importancia puede variar. En mamíferos parece ser el modo predominante, mientras que en

procariotas y levaduras muchas proteínas pueden transportarse después de su traducción.



**Figura 3:** Translocación co-traduccion y post-traduccion en levaduras (adaptado de Johnson, 1997). En la primera, una vez que el péptido señal de la cadena polipeptídica naciente emerge del ribosoma, es reconocido por la SRP, dirigiendo el complejo ribosoma-polipéptido naciente hacia la membrana del R.E. mediante interacción con el receptor de la SRP. El intercambio de GTP por GDP libera la SRP que puede iniciar un nuevo ciclo. El ribosoma se une a la maquinaria de translocación y comienza la translocación. En la segunda, el polipéptido se une a chaperones para mantener una conformación compatible con la translocación. El complejo se une a la maquinaria de la translocación de la membrana del R.E. y comienza la translocación. Más información en el texto.

En la translocación co-traduccion, el péptido señal de la cadena polipeptídica naciente es reconocido por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP). La SRP eucariótica es una ribonucleoproteína de coeficiente sedimentación de 11S. En mamíferos, la SRP está compuesta por 6 proteínas de peso molecular 9, 14, 19, 54, 68 y 72 kDa formando un

---

complejo con un ARN de 300 nucleótidos (Rapoport, 1992; Sánchez *et al.*, 1997). La subunidad de 54 kDa, SRP54, se une directamente al péptido señal (Sandra, 1994). Esta proteína es una proteína de unión a GTP. Se han encontrado proteínas homólogas a SRP54 en levaduras y varios procariotas. Los ARNs de la SRP de especies tan divergentes como mamíferos, levaduras y arqueobacterias pueden plegarse en estructuras secundarias similares (Althoff *et al.*, 1994). La SRP tendría dos funciones básicas: primero, dirigir la cadena polipeptídica a la membrana del RE por interaccionar con el péptido señal y con el aparato de translocación; segundo, prevenir plegamientos aberrantes incompatibles con la translocación.

Se ha propuesto el siguiente modelo en levaduras (Johnson, 1997) (Figura 3): la traducción de las proteínas de secreción comienza en los ribosomas que están libres en el citoplasma. La SRP se une al péptido señal cuando emerge de la subunidad mayor del ribosoma y detiene la traducción de la cadena polipeptídica naciente. La SRP, además de unirse al péptido señal, interactúa directamente con el ribosoma, y esta interacción incrementa la afinidad de la SRP54 por el GTP (Rapoport *et al.*, 1996). La SRP dirige el complejo ribosoma-cadena naciente a la membrana del RE a través de una interacción con el receptor de la SRP. El complejo cadena naciente-ribosoma es liberado de la SRP y contacta con el aparato de translocación en un proceso dependiente de GTP. La separación de la SRP del receptor requiere la hidrólisis del GTP. El ribosoma se une al aparato de translocación emplazando el péptido señal y la cadena polipeptídica naciente en una especie de poro acuoso que está inicialmente sellado tanto del lado del interior del RE como del citoplasma. Cuando la cadena polipeptídica naciente alcanza una longitud de unos 70 residuos, el

poro acuoso se abre hacia la luz del RE. A medida que la traducción y translocación continua, el péptido señal sufre una primera hidrólisis, el polipéptido en crecimiento puede ser glicosilado y puede interaccionar con proteínas del interior del RE como BiP, calnexina, calreticulina (Sakaguchi, 1997). Cuando la translocación se completa, el extremo del poro que da a la luz del RE posiblemente se sella de nuevo y el péptido señal es hidrolizado una segunda vez y liberado al citoplasma.

La maquinaria básica de translocación parece consistir en sólo tres componentes (Jungnickel *et al.*, 1994): el receptor de la partícula de reconocimiento de la señal (SRP receptor), el complejo Sec61, y la proteína TRAM. El hecho estructural más importante del translocón es su poro acuoso a través de la membrana.

El **receptor de la SRP** de mamíferos consiste en dos subunidades que pueden unir GTP. La subunidad  $\alpha$  (72 kDa) contacta con el complejo SRP-cadena nascente-ribosoma, su sitio de unión a GTP es necesario para la transferencia de la cadena nascente dentro de la membrana. La translocación es dependiente de la presencia de GTP, pero no de su hidrólisis. La unión del GTP a la subunidad  $\alpha$  del receptor incrementa la afinidad de éste por SRP54, la asociación de ambos conlleva la liberación del péptido nascente, la hidrólisis del GTP a GDP disminuye la afinidad del receptor por la SRP, la cual se separa de la membrana y puede iniciar un nuevo ciclo. La subunidad  $\beta$  (30 kDa) es una proteína de membrana que parece anclar a la membrana del RE la subunidad  $\alpha$  (Rapoport *et al.*, 1996). En levaduras hay homólogos de las dos subunidades.

El **complejo Sec61** de mamíferos consiste en tres subunidades. La subunidad  $\alpha$  es homóloga a la Sec61p de levaduras, atraviesa la membrana

---

10 veces, y contacta con la cadena polipeptídica. Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  son pequeñas proteínas de membrana ancladas por el extremo hidrofóbico C-terminal. La subunidad  $\gamma$  es homóloga a la Sss1p de levaduras y la  $\beta$  a Sbh1p.

En mamíferos, el complejo Sec61 juega un papel esencial en la unión del ribosoma durante la translocación co-traducciona. El ribosoma forma un sello fuerte con la membrana del RE, probablemente por establecer numerosos contactos con los bucles citosólicos de la Sec61 $\alpha$  (Matlack *et al.*, 1998). La observación al microscopio electrónico usando proteínas Sec purificadas de levadura demostró que de 3 a 4 copias del complejo Sec61 se ensamblan en un complejo oligomérico en forma de anillo con un poro central de 20 Å (Sakaguchi, 1997). Este canal se debe abrir cuando llega el sustrato y cerrarse después de que haya pasado a través de él.

La función del tercer componente del aparato de translocación en mamíferos, la **proteína TRAM**, se desconoce. TRAM se encuentra adyacente a proteínas de membrana nascentes. Esto sugiere que podría jugar un papel activo en facilitar y/o regular la integración de proteínas de membrana (Zheng y Gierasch, 1996; Johnson, 1997; Mothes *et al.*, 1998).

### 3. 1. 2. Translocación post-traducciona.

La SRP de levadura parece estar implicada *in vivo* en el importe de proteínas en el RE y en la mitocondria. No obstante, no todas las proteínas de secreción muestran la misma dependencia de la SRP. Aquellas que pueden ser importadas post-traduccionalmente *in vitro* se encuentran menos afectadas por la deficiencia de la SRP. La eficiencia de importación

de estas proteínas es dependiente de proteínas citoplasmáticas, como hsp70, que mantienen el polipéptido en un estado sin plegar o parcialmente plegado, considerado compatible con la translocación (Figura 3). En este caso, el ribosoma no juega ningún papel en el proceso de translocación (Johnson, 1997).

La translocación post-traducciona en levaduras requiere el complejo Sec61 (Sec61p, Sbh1p y Sssl1p). Además de estos componentes, la translocación post-traducciona depende del complejo Sec63 que se localiza en las proximidades del complejo Sec61 (Jungnickel *et al.*, 1994). El complejo Sec63 de levaduras consiste en las proteínas Sec62p, Sec63p, Sec71p y Sec72p. Las proteínas Sec63p, Sec71p y Sec62p atraviesan la membrana 3, 1 y 2 veces, respectivamente, Sec72p es una proteína periférica de membrana. La proteína BiP de levaduras es una ATPasa localizada en el lumen del RE que contacta con Sec63p. Sec62p, Sec72p, Sec73p forman un subcomplejo que funciona como un receptor del péptido señal, mientras que BiP interactuando con Sec63p, juega un papel clave en transferir el polipéptido asociado con el complejo Sec62p-Sec72p-Sec73p al canal de translocación del complejo trimérico Sec61. BiP se une a la cadena polipeptídica cuando emerge en la luz del RE y la empuja a través de la membrana (Hijarrubia *et al.*, 1997).

En levaduras, una interacción de baja afinidad entre la SRP y el péptido señal conlleva la disociación de la SRP del ribosoma e incrementa la posibilidad de que la proteína sea translocada via translocación post-traducciona. La hidrofobicidad del péptido señal especifica el camino a seguir. Un péptido señal con una región h muy hidrofóbica tiende a depender de la función de la SRP.

---

### 3. 2. MODIFICACIONES EN EL RE.

Además del complejo Sec61 y de la proteína TRAM, el sitio de translocación en mamíferos contiene otros componentes que incluyen el complejo de la peptidasa de la señal y la oligosacaryltransferasa (Dalvey *et al.*, 1997); enzimas implicadas en la modificación de la cadena polipeptídica naciente, así como otras proteínas que actúan como chaperones inhibiendo un plegamiento prematuro y/o una agregación de la cadena polipeptídica.

Los polipeptidos nacientes que están cruzando la membrana del RE son N-glicosilados cotraduccionalmente en el motivo de glicosilación (Asn-X-Thr/Ser) por el complejo de la oligosacaryltransferasa (OST) que consiste en varias subunidades. OST se encuentra próximo al canal de translocación. La prolina en posición X inhibe la glicosilación y tanto el ácido aspártico como el glutámico no son favorables para un reconocimiento de la OST (Shelikoff *et al.*, 1996).

Los oligosacáridos incrementan la solubilidad y estabilidad de muchas proteínas, contribuyendo a un adecuado plegamiento de las mismas (Chrispeels y Faye, 1998).

La proteína disulfuro isomerasa (PDI) promueve la formación de puentes disulfuro correctos y la peptidil prolil cis/trans isomerasa modula la conformación alrededor de los residuos de prolina. La calnexina y la calreticulina se encuentran asociadas transitoriamente con la cadena polipeptídica (Johnson, 1997).

Las proteínas mal plegadas son degradadas en el RE o translocadas al citoplasma donde son degradadas en una manera dependiente del



proteosoma, después de un proceso de unión a cadenas de ubiquitina (Sakaguchi, 1997; Bonifacino y Weissman, 1998; Hershko y Ciechanover, 1998).

### **3. 3. RETENCIÓN DE PROTEÍNAS EN EL RE.**

Cada orgánulo de la vía secretora necesita permitir el tránsito selectivo de proteínas de secreción y de membrana plasmática, así como mantener una única clase de proteínas residentes que definen sus propiedades funcionales y estructurales. En el caso del retículo endoplasmático, el mantenimiento de proteínas residentes se alcanza de dos maneras: primero, evitando que las proteínas residentes entren a formar parte de vesículas de transporte recién formadas y segundo, recuperando aquellas proteínas que se hayan escapado. La existencia de un transporte retrógrado, del aparato de Golgi al RE, es necesaria para mantener el tamaño del RE y para la recuperación de proteínas del aparato de Golgi (Pelham y Munro, 1993).

Las proteínas solubles del RE de células animales presentan un motivo KDEL en su extremo carboxilo terminal esencial para su retención en el RE. *Saccharomyces cerevisiae* presenta el motivo HDEL en el extremo carboxilo terminal de proteínas del RE, mientras que *Kluyveromyces lactis* reconoce tanto el motivo HDEL como el DDEL. La eliminación de este motivo C-terminal implica la secreción de proteínas del RE mientras que la unión de este tetrapéptido a proteínas que normalmente son secretadas trae consigo su retención en el RE (Reid, 1991; Elrod-Erickson y Kaiser, 1996). Existe un receptor en el aparato de Golgi para

---

proteínas que presentan el motivo HDEL. En levaduras, la proteína de membrana Erd2p funciona como un receptor para proteínas que contienen este motivo uniéndose a ellas, el complejo receptor-ligando experimenta un cambio conformacional que desencadena el transporte retrógrado del complejo al RE (Lewis *et al.*, 1990; Nothwehr y Stevens, 1994).

Las proteínas de membrana del RE presentan un motivo dibásico, di-lisina (KKXX) o di-arginina (XXRR), localizados cerca del término de su dominio citoplasmático. Los motivos di-lisina se unen al complejo de proteínas envolventes citosólicas COP I (*coat proteins*), y esta interacción funciona en la recuperación de proteínas del aparato de Golgi al RE (Teasdale *et al.*, 1996).

### 3. 4. VESÍCULAS DE TRANSPORTE.

Una vez que la proteína de secreción se encuentra dentro del RE, deja este compartimento encerrada en una vesícula de unos 50 nm de diámetro (Haguenauer-Tsapis, 1992) formada por la membrana del RE y dirigida por señales moleculares al próximo destino: el aparato de Golgi, ahí la vesícula se fusiona con la membrana del aparato de Golgi y la proteína se descarga en su interior, donde puede sufrir procesos de modificación o continuar los iniciados en el RE (Julius *et al.*, 1984 a y b). Otra vesícula de unos 80-100 nm de diámetro dirige la proteína del aparato de Golgi a la superficie celular donde es liberada. Este transporte vesicular tan específico implica componentes proteicos localizados en la vesícula de transporte y la membrana diana así como factores solubles (Rothman y Orci, 1992). Aunque algunos componentes son específicos de un paso de

transporte particular, otros son comunes a varios pasos. El citoesqueleto juega un papel importante, pero no bien conocido, en el tráfico vesicular intracelular (Torralba *et al.*, 1996; Tooze *et al.*, 1998; Novick *et al.*, 1999). En levaduras, mutaciones tanto en la actina como en proteínas de unión a actina afectan tanto a la secreción como a la endocitosis (De Camilli *et al.*, 1996).

Las vesículas de transporte necesitan proteínas envolventes para formarse. Las proteínas envolventes son reclutadas del citosol sobre una membrana particular, conduciendo a la gemación. El reclutamiento de las proteínas que van a ser secretadas en la vesícula parece estar mediado por una interacción entre las proteínas envolventes y un determinante peptídico expuesto sobre el lado citosólico del orgánulo donador (Schekman y Orci, 1996). La unión específica se puede ver facilitada por la acción de proteínas de unión a GTP. Se han purificado y caracterizado tres tipos de vesículas de transporte envueltas (Robinson, 1997): vesículas envueltas por clatrina, vesículas envueltas por el complejo COP I y vesículas envueltas por el complejo COP II.

#### **3. 4. 1. Vesículas envueltas por clatrina.**

La clatrina fue la primera proteína envolvente caracterizada (Aridor y Balch, 1996). Estudios de vesículas envueltas en clatrina suministraron la primera indicación de que la envuelta sirve para dos propósitos: deformar la membrana formando una vesícula gemante y seleccionar los contenidos de la vesícula. La clatrina actúa como un armazón, autoensamblándose en estructuras similares a jaulas mientras se fija a la membrana y permitiendo que la membrana vesicule. Complejos proteicos llamados adaptadores

---

unen la clatrina a la membrana. Hay dos tipos distintos de complejos adaptadores: AP-1, que está asociado al lado *trans* del aparato de Golgi (TGN); y AP-2, asociado a la membrana plasmática. El complejo AP-1 necesita para asociarse a la membrana del TGN la unión de la proteína de unión a GTP Arf. Otra proteína de unión a GTP, la dinamina, es necesaria para la liberación de la vesícula formada, actúa como un garrote que constriñe el punto de fisión de la membrana liberando la vesícula (Bednarek *et al.*, 1996).

### 3. 4. 2. Vesículas envueltas por el complejo COP I.

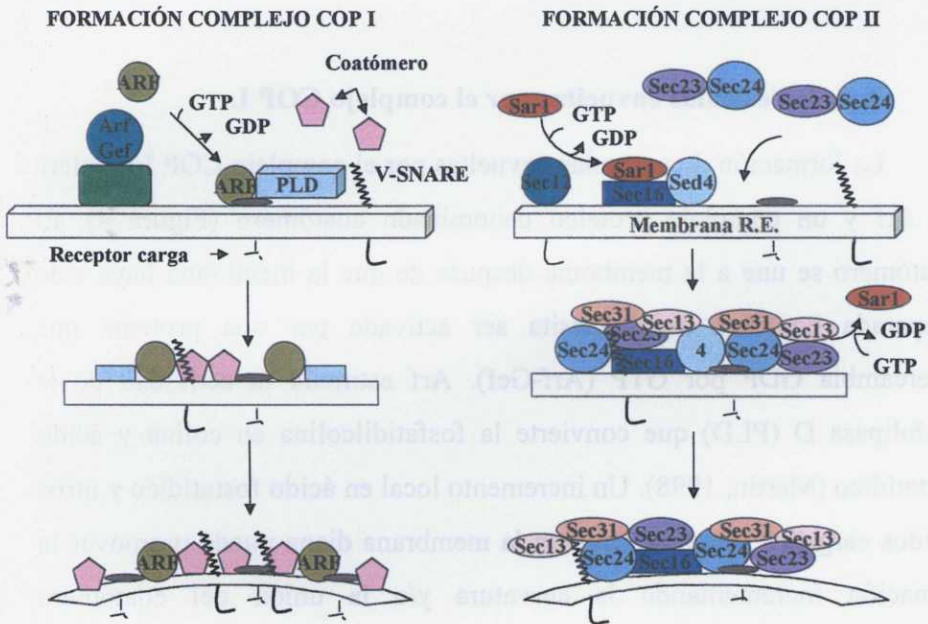
La formación de vesículas envueltas por el complejo COP I requiere de Arf y un complejo proteico denominado coatómero (Figura 4). El coatómero se une a la membrana después de que la membrana haya sido preparada por Arf. Arf necesita ser activada por una proteína que intercambia GDP por GTP (Arf-Gef). Arf estimula la actividad de la fosfolipasa D (PLD) que convierte la fosfatidilcolina en colina y ácido fosfatídico (Martin, 1998). Un incremento local en ácido fosfatídico y otros lípidos cargados negativamente en la membrana diana puede promover la gemación incrementando la curvatura y/o la unión del coatómero (Bednarek *et al.*, 1996; De Camilli *et al.*, 1996).

El complejo del coatómero contiene 7 subunidades cuyos homólogos en levadura son: RET1, SEC26, SEC27, SEC21, RET2 y RET3.

Las vesículas envueltas por el complejo COP I parecen estar implicadas en el tráfico retrógrado selectivo del aparato de Golgi al RE, aunque podría ser requerido en el tráfico anterógrado.

Como se ha mencionado previamente el coatómero se puede unir a motivos di-lisina presentes en proteínas del RE y recuperarlas del aparato de Golgi al RE.

La escisión de vesículas envueltas por el complejo COP I del aparato de Golgi requiere del factor palmitoil-CoA, que actuaría de una manera similar a la dinamina en las vesículas envueltas por clatrina.



**Figura 4:** Ensamblaje del complejo COP I y COP II (adaptado de Bednarek *et al.*, 1996). La formación del complejo COP I comienza con el reclutamiento y activación de la proteína Arf1. Arf1-GTP estimula la modificación de los lípidos del entorno al actuar sobre la fosfolipasa D, induciendo la formación de un sitio de unión de alta afinidad del coatómero. La formación del complejo COP II comienza con el reclutamiento y activación de Sar1. Sar1-GTP se une al complejo Sec23-Sec24 e inicia la formación del complejo. Más información en el texto.

### 3. 4. 3. Vesículas envueltas por el complejo COP II.

Aunque las vesículas envueltas por el complejo COP I al microscopio electrónico son parecidas a las envueltas por el complejo COP II, sus envueltas están constituidas por diferentes clases de proteínas. Sar1p, una pequeña proteína de unión a GTP relacionada con la Arf1p, prepara la membrana del RE para la unión del resto de proteínas del complejo COP II; el complejo Sec23, compuesto de Sec23p y Sec24p, y el complejo Sec13, que contiene Sec13p y Sec31p, ambas proteínas ricas en motivos WD (Shaywitz *et al.*, 1997). Sec24p es necesario para la unión del complejo Sec13 a la membrana. Las vesículas envueltas por el complejo COP II geman del RE y liberan su contenido en el aparato de Golgi.

Un modelo para la formación de vesículas envueltas por el complejo COP II podría ser el siguiente (Schekman y Orci, 1996; Bednarek *et al.*, 1996) (Figura 4): Sar1p es reclutada directamente a la membrana del RE por una interacción con una proteína residente del RE, Sec12p, que activa el intercambio de GDP por GTP. Sar1p-GTP se une a Sec23p-Sec24p formando un complejo que puede reconocer proteínas que van a ser trasladadas o proteínas diana, marcándolas para su inclusión en las vesículas. Sar1p hidroliza el GTP bajo la influencia de la subunidad Sec23p, haciendo que se disocie de la membrana permitiendo un nuevo ciclo. El complejo Sec23 se une al complejo Sec13. La unión adicional de nuevos complejos Sec23-Sec13 induce una curvatura en la membrana que trae consigo la liberación de la vesícula.

Parece que no son necesarios otros factores para la liberación de las vesículas envueltas por COP II. La composición lipídica del RE, Golgi y membrana plasmática explica los diferentes requisitos en la liberación de

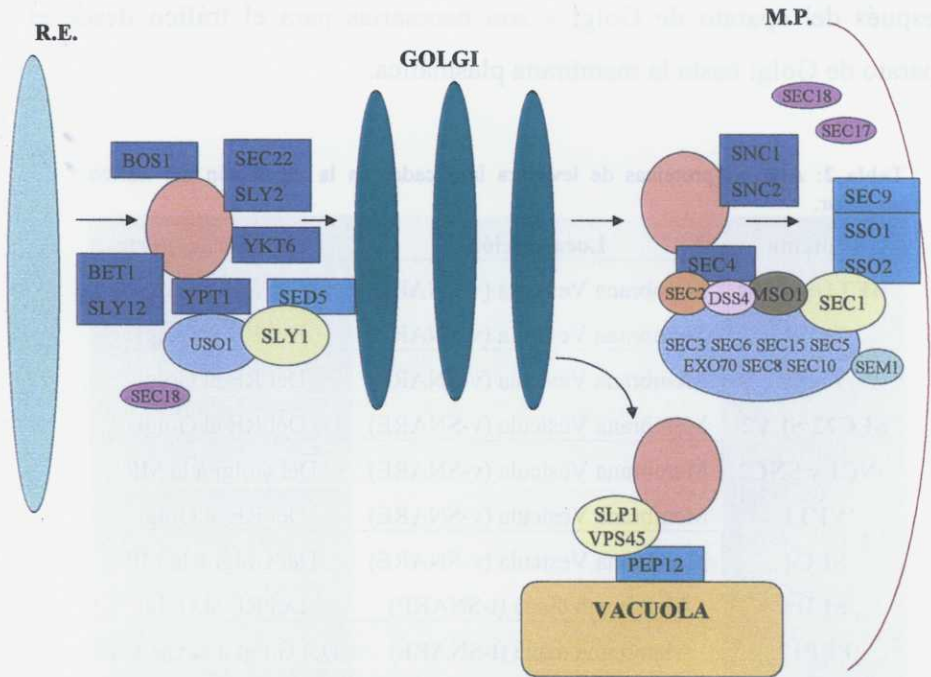
las vesículas. En mamíferos, un incremento gradual en el contenido de colesterol incrementa la rigidez de las membranas posteriores al RE (Bednarek *et al.*, 1996).

### 3. 5. ANCLAJE Y FUSIÓN.

Tras el transporte, la vesícula necesita liberarse de la cubierta antes de la fusión para permitir que la vesícula y la membrana diana o receptora entren en contacto. En las vesículas envueltas por clatrina esto ocurre antes de anclarse en la membrana receptora en una reacción dependiente de ATP, mediante la acción de una proteína perteneciente a la familia de proteínas de choque térmico (Rothman y Orci, 1992). El anclaje de la vesícula con la membrana receptora se realiza a través de una cascada de interacciones moleculares, incluyendo factores generales como el factor sensible a la N-etilmaleimida (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*, NSF), proteínas solubles de fijación a NSF (*soluble NSF attachment protein*, SNAP), junto con proteínas específicas (Ruohonen *et al.*, 1997). La hipótesis SNARE (receptor de proteínas SNAP, *SNAP receptor*) (Söllner *et al.*, 1993; Rothman, 1994) propone que el anclaje de la vesícula a la membrana receptora adecuada se realiza a través de proteínas de membrana, que se encuentran tanto en la membrana de la vesícula (*vesicle-SNARE*, v-SNARE) como en la membrana receptora (*target-SNARE*, t-SNARE). La formación del complejo v- y t-SNARE va seguido por un evento de fusión que completa la reacción de transporte. Son necesarias proteínas accesorias adicionales para proteger las proteínas SNARE de una

unión promiscua y para desprotegerlas cuando el anclaje de la vesícula vaya a ocurrir (Pfeffer, 1996) (Figura 5).

Se han identificado un gran número de proteínas y varias familias de proteínas de membrana que están implicadas en el tráfico vesicular, como por ejemplo el ya comentado NSF (en mamíferos) o sec18 (en levaduras), una proteína soluble necesaria para la fusión de membranas en varios pasos a lo largo de la vía endocítica y exocítica (Barinaga, 1993). Algunas de estas proteínas pueden verse en la tabla 2, que no pretende ser exhaustiva.



**Figura 5:** Algunos miembros de las diferentes familias de proteínas implicados en la vía secretora de levaduras.



### 3. 5. 1. Familia VAMP.

La proteína VAMP (proteína de membrana asociada a vesículas) o sinaptobrevina, es una proteína de 18 kDa anclada a la superficie citoplasmática de la vesícula por un dominio transmembrana en el extremo carboxilo terminal. La proteína de levadura más parecida a VAMP es SNC1 que presenta un 40% de identidad de secuencia con VAMP. La disrupción del locus *SNC1* no presenta un fenotipo aparente. Se ha identificado otra proteína homóloga a VAMP en levaduras, SNC2 (Protopopov *et al.*, 1993). Las proteínas SNC están localizadas en vesículas después del aparato de Golgi y son necesarias para el tráfico desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática.

**Tabla 2:** Algunas proteínas de levadura implicadas en la regulación del tráfico vesicular.

Proteína	Localización	Paso de transporte
BET1/SLY12	Membrana Vesícula (v-SNARE)	Del RE al Golgi
BOS1	Membrana Vesícula (v-SNARE)	Del RE al Golgi
YKT6	Membrana Vesícula (v-SNARE)	Del RE al Golgi
SEC22/SLY2	Membrana Vesícula (v-SNARE)	Del RE al Golgi
SNC1 y SNC2	Membrana Vesícula (v-SNARE)	Del Golgi a la MP
YPT1	Membrana Vesícula (v-SNARE)	Del RE al Golgi
SEC4	Membrana Vesícula (v-SNARE)	Del Golgi a la MP
SED5	Membrana diana (t-SNARE)	Del RE al Golgi
PEP12	Membrana diana (t-SNARE)	Del Golgi a la vacuola
SSO1 y SSO2	Membrana diana (t-SNARE)	Del Golgi a la MP
SEC9	Membrana diana (t-SNARE)	Del Golgi a la MP
SEC18	Citoplasma	
SEC17( $\alpha$ )	Citoplasma	

### 3. 5. 2. Familia RAB.

Forma parte de la superfamilia de las proteínas RAS. Algunos miembros de la familia rab, de proteínas de unión a GTP, están implicados en la regulación del tráfico vesicular en levaduras y eucariotas superiores (Ferro-Novick *et al.*, 1993; Harsay y Bretscher, 1995). La familia rab contiene más de 20 miembros. En levaduras son necesarios algunos miembros de la familia rab, como YPT1 y SEC4, para el transporte vesicular del RE al aparato de Golgi y del aparato de Golgi a la membrana plasmática, respectivamente. La proteína DSS4 estimula la disociación de GDP de SEC4 (Ferro-Novick y Novick, 1993; Collins *et al.*, 1997) y parece tener un papel en el transporte del RE al aparato de Golgi (Jiang *et al.*, 1998). Otras proteínas, implicadas en la regulación del tráfico vesicular en una fase temprana de la vía secretora en levaduras, interaccionan genéticamente con YPT1. Dos de estas proteínas, SLY12/BET1 y SLY2/SEC22, tienen un dominio estructural similar y una secuencia limitada de homología con VAMP.

Estas observaciones sugieren que miembros de las familias VAMP y rab están implicados en el tráfico de membranas en dos fases de la vía secretora de levaduras y en las terminaciones nerviosas (Bennett y Scheller 1993). La colocalización de estas familias de proteínas (SEC4 y SNC sobre las vesículas post-Golgi, rab3 y VAMP sobre las vesículas sinápticas) y su potencial interacción (detectada genéticamente para YPT1 y SLY12/SLY2 en el transporte del RE al Golgi) sugiere que una proteína rab interactuando tanto directamente o indirectamente con una proteína parecida a VAMP pueden ser componentes de una maquinaria, conservada sobre la superficie, de intermediarios del transporte vesicular que participan en el anclaje o la fusión.

### 3. 5. 3. Familia syntaxina.

Los componentes de la maquinaria de fijación y fusión localizados sobre la membrana receptora son más difíciles de identificar. Una proteína candidata para el anclaje de las vesículas, la syntaxina se ha identificado en las terminaciones nerviosas. Es una proteína de 35 kDa, anclada a la membrana por su extremo carboxilo terminal, que fue identificada por su habilidad para interactuar con la proteína de las vesículas sinápticas, la sinaptotagmina (p65) (Bennett y Scheller, 1993).

Se han identificado varios genes en levaduras que codifican proteínas ancladas a la membrana por su extremo carboxilo terminal y que guardan una homología significativa con la syntaxina. El primero de estos genes es *SED5*, un supresor de la pérdida de función del *ERD2*. *SED5* interactúa con Sec24p y es independiente de la presencia de Sec23p y de Sar1p-GTP, proteínas todas ellas necesarias para la formación del complejo COP II (Peng *et al.*, 1999). Otra proteína de levadura con homología a la syntaxina es PEP12 que es necesaria para el adecuado direccionamiento de las proteínas a la vacuola en levaduras, el equivalente funcional del lisosoma en la vía secretora de eucariotas superiores. La proteína de levadura con el nivel más alto de homología a la syntaxina, corresponde a uno de los dos genes, *SSO1* y *SSO2*, que son capaces de actuar como supresores de un alelo sensible a la temperatura de *SEC1* (Aalto *et al.*, 1993; Harsay y Bretscher, 1995).

### 3. 5. 4. Familia SEC1.

*SEC1* es una proteína hidrofílica necesaria para el transporte adecuado del aparato de Golgi a la membrana plasmática en levaduras

---

(Egerton *et al.*, 1993; Brummer *et al.*, 1999). SEC1 es asimismo una familia de proteínas implicadas en el tráfico de membranas. SLY1 y SLP1, dos proteínas con una secuencia similar a SEC1, son necesarias para el transporte del RE al aparato de Golgi y de éste a la vacuola, respectivamente. SEC1 parece estar implicado en proteger o activar las proteínas t-SNARE (SSO1, SSO2) hasta que una proteína v-SNARE (SNC1, SNC2, SEC4) interacciona con la proteína t-SNARE para formar el complejo de anclaje (Pfeffer, 1996). Se ha descrito un tercer supresor de la mutación *sec1*, además de SSO1 y SSO2, el gen *MSO1* (Aalto *et al.*, 1997), que codifica una proteína pequeña rica en residuos de serina.

### 3. 5. 5. Familia Velcro.

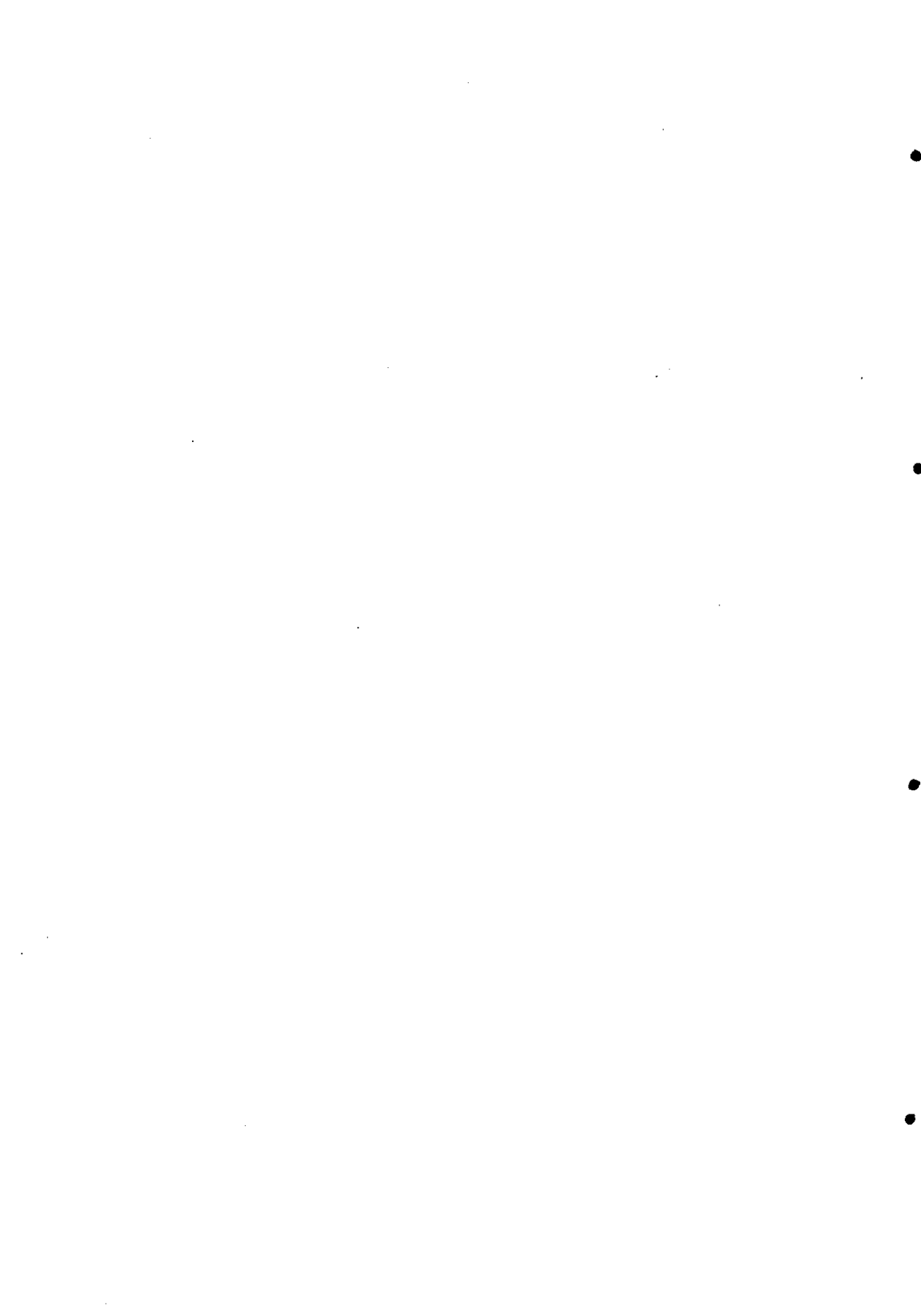
Los genes t-SNARE *SSO1* y *SSO2*, además de suprimir mutaciones en el gen *SEC1*, suprimen mutaciones en los genes *SEC3*, *SEC5*, *SEC9* y *SEC15* (Pfeffer, 1996). *SEC9* interactúa con los homólogos a syntaxina *SSO1* y *SSO2*. *SEC15* forma parte de un complejo de coeficiente sedimentación de 19,5S que incluye *SEC6* y requiere de *SEC3*, *SEC5*, *SEC8*, *SEC10*, *EXO70* para su ensamblaje, denominado complejo exocístico (Aalto *et al.*, 1997). *SEC15* se puede asociar con las vesículas de secreción y se une a *SEC4* cuando está unido a GTP (Novick *et al.*, 1999).

La proteína *USO1* de levadura es necesaria para el transporte del RE al aparato de Golgi (Pfeffer, 1996; Barlowe, 1997). *USO1* parece actuar como un miembro de la familia Velcro que ayuda a las proteínas v-SNARE y t-SNARE a que se encuentren, de una manera similar al papel que puede ejercer el complejo exocístico en el transporte del aparato de Golgi a la

membrana plasmática (Pfeffer, 1996). En el anclaje y fusión de las vesículas derivadas del RE al aparato de Golgi parece ser necesario, además de USO1 y SEC18, el complejo proteico denominado LMA1, un complejo heterodimérico formado de tiorredoxina y de IB2 (Barlowe, 1997) y las proteínas BET5 y BET3 (Jiang *et al.*, 1998).

En resumen, se han identificado un gran número de proteínas de levadura implicadas en el anclaje de las vesículas de transporte a la membrana plasmática. En primer lugar, el complejo SNARE, que en levaduras está compuesto por las proteínas SSO1/2, SNC1/2 y SEC9 (Aalto *et al.*, 1997). Estas proteínas forman un complejo que participa en el anclaje de la vesícula y en el reclutamiento de factores generales como SEC17 y SEC18 que son necesarios tanto para el ensamblaje del complejo SNARE como para la fusión (Aalto *et al.*, 1997). Un segundo grupo de proteínas comprende el complejo exocístico. Al tercer grupo de proteínas pertenecen los productos de los genes SEC: SEC1, SEC2, SEC4 y MSO1 (Aalto *et al.*, 1997).

## **2. OBJETIVOS.**



Una de las perspectivas más prometedoras para el aprovechamiento industrial del suero de leche se basa en la hidrólisis enzimática de la lactosa. La mezcla de glucosa y galactosa así obtenida puede utilizarse en industrias de alimentación como edulcorante y en preparados dietéticos destinados a individuos con intolerancia a la lactosa. En industrias de biotecnología puede emplearse como medio de cultivo para el crecimiento de numerosas especies de microorganismos incapaces de utilizar la lactosa, ampliando así el horizonte de productos obtenibles por fermentación. La mayor limitación para la utilización de la  $\beta$ -galactosidasa de levaduras en el desarrollo de este tipo de procesos deriva de los elevados costos asociados a la extracción y purificación, por ser intracelular, y por su baja estabilidad.

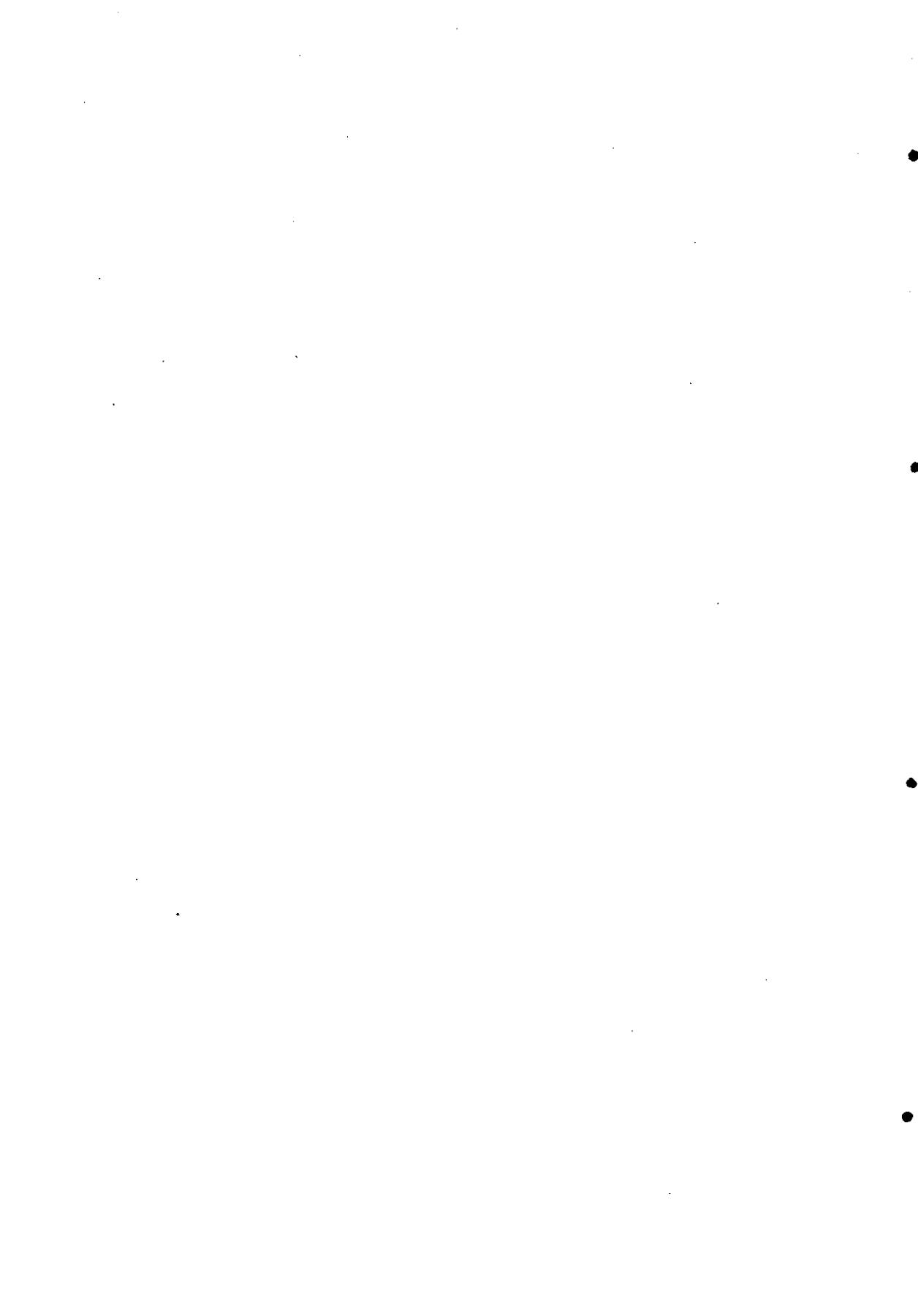
En el presente trabajo se proponen los siguientes objetivos:

- I. Puesta a punto de un método eficaz y reproducible de purificación e inmunodetección de la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.
- II. Reducción del costo de la preparación:
  - a) Evaluación de los cultivos en estado sólido para producir la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* y promover su secreción.
  - b) Desarrollo de un sistema recombinante eficiente que permita la secreción de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*.
  - c) Estudio de la utilización de dos tipos de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, super-secretorios y que lisan a temperaturas no permisivas, para secretar dicha enzima.



III. Inducción mediante ingeniería genética de la capacidad de crecimiento en lactosa de cepas de *S. cerevisiae* como una alternativa para el tratamiento del suero de leche.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**



# 1. CEPAS CELULARES Y PLÁSMIDOS.

## 1. 1. CEPAS DE BACTERIAS.

Para la construcción y propagación de los plásmidos se utilizaron las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA/ PROCEDENCIA
HB101	<i>supE44, hsdS20 (rB mB) recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1</i>	Bolívar y Backman, 1979
JM101	<i>supE, thiΔ (lac-proAB), F'[traΔ36 proAB<sup>+</sup> lacIq lacZΔM15]</i>	Messing, 1979
JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thiΔ (lac-proAB)</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
MC1061	<i>hsdR, mcrB, araΔ139, Δ(araABC-leu), 7679Δlac X 74 galU, galK, rpsL thi</i>	Huynh <i>et al.</i> , 1985
DH5α	<i>endA1, hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, thi-1, recA1, gyrA(Nal<sup>+</sup>), relA1, Δ(lacZYA-argF) U169, (φ80 d lacZ ΔM15)</i>	Hanahan <i>et al.</i> , 1991

Las cepas bacterianas se conservaron habitualmente sembradas en estría en placas LB (apartado 2.1), a 4°C, tras haber sido cultivadas a 37°C durante uno o dos días. Se resembraron periódicamente cada dos meses. Las cepas transformadas con plásmidos que contenían genes marcadores de resistencia a ampicilina se conservaron en placas de medio LB suplementado con ampicilina.

Para el mantenimiento de las cepas a largo plazo, las bacterias se inocularon en los mismos medios y se dejaron crecer en agitación a 37°C, añadiéndose al día siguiente glicerol estéril hasta el 15% y congelando inmediatamente las muestras en tubos de polipropileno de 1,5 ml a -80°C.

## 1. 2. CEPAS DE LEVADURAS.

Las cepas de levadura utilizadas fueron las siguientes:

### *Kluyveromyces lactis* :

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA/ PROCEDENCIA
NRRL-Y1140	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	Jong y Edwards, 1990
MW190-9B	<i>MAT<math>\alpha</math>, lac 4-8, uraA, Rag+</i>	Wésolowski-Louvel, M.

### *Saccharomyces cerevisiae* :

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA/ PROCEDENCIA
BJ3505	<i>pep4::HIS3, prb-<math>\Delta</math>1.6R HIS3, lys2-208, trp1-<math>\Delta</math>101, ura3-52, gal2, can1</i>	Eastman Kodak Company
CGY339*	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, his4-29, pep4-3, GAL<sup>+</sup></i>	Melnick <i>et al.</i> , 1990
CGY1463*	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, leu2-3.112, pep4-3, ssc1-1, ssc2-1, GAL<sup>+</sup></i>	Melnick <i>et al.</i> , 1990
CGY1465*	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, leu2-3.112, ssc1-1, GAL<sup>+</sup></i>	Melnick <i>et al.</i> , 1990
CGY1468*	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, leu2-3.112, pep4-3, ssc2-1, GAL<sup>+</sup></i>	Melnick <i>et al.</i> , 1990
CGY1585*	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, leu2-3.112, ssc1-1, gal<sup>-</sup></i>	Melnick <i>et al.</i> , 1990
LD1	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math>, lyt2-1/lyt2-1, leu2-3.112/leu2-3.112, his4<math>\Delta</math>34/his4<math>\Delta</math>34</i>	Álvarez <i>et al.</i> , 1994
LHDP1	<i>MAT<math>\alpha</math>, lyt2-1, ade2, leu2-3.112, pep4::HIS3, prb1<math>\Delta</math>1.6R</i>	Álvarez <i>et al.</i> , 1994
PEP4-1a	<i>MAT<math>\alpha</math>, leu2, ura3, pep4-3</i>	Hollenberg, C. P.

\* Cepas cedidas por la empresa: Genome Therapeutics Corporation.

Las cepas de levadura se conservaron habitualmente sembradas en placas YPD al 0,5% de glucosa (apartado 2.2), a 4°C, tras haber sido cultivadas a 30°C durante dos o tres días. Se resembraron periódicamente cada dos o tres meses.

Para el mantenimiento de las cepas de levaduras a largo plazo se inocularon en medio YPD al 0,5% o CM (apartado 2.2), se dejaron crecer en agitación a 30°C, se les añadió glicerol estéril hasta un 50% y se congelaron a -80°C.

### 1. 3. VECTORES Y PLÁSMIDOS.

Se utilizaron los siguientes vectores lanzadera de *Escherichia coli* y levaduras:

**YE<sub>p</sub>FLAG-1.** (*Eastman Kodak Company*). Vector de expresión de levaduras que contiene el promotor de la alcohol deshidrogenasa (*ADH2*), reprimido por glucosa, la señal de secreción del factor  $\alpha$  de levaduras, 24 pares de bases que codifican el péptido FLAG para la detección inmunológica, el 2 *micron* (2 $\mu$ m) para la replicación en *S. cerevisiae*, el gen de resistencia a la ampicilina (*amp<sup>r</sup>*), el marcador de selección *TRP1* y el origen de replicación bacteriano (*ori*) (Figura 3.9).

**YE<sub>p</sub>lac112.** (Gietz y Sugino, 1988). Presenta el promotor y 438 pb del gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (*LACZ*) (Sambrook *et al.*, 1989), *amp<sup>r</sup>*, *TRP1*, 2 $\mu$ m de levadura y el *ori* bacteriano.

**YE<sub>p</sub>lac181.** (Gietz y Sugino, 1988). Igual que el anterior, pero con el marcador de selección *LEU2*.

**pGEM-T Easy.** (*Promega*). Contiene el promotor y parte del gen *LACZ*, *amp<sup>r</sup>* y el *ori* bacteriano. Está cortado con la enzima de restricción

*EcoRV* y presenta una timidina en ambos extremos 3', resultando útil en la clonación de productos procedentes de PCR amplificados por la ADN polimerasa *Taq*, ya que esta polimerasa añade una adenina al extremo 3' del fragmento amplificado.

**pSPGK1.** (X. J. Chen. Institut Curie. Orsay. Francia). Presenta el promotor constitutivo y el terminador de la fosfoglicerato quinasa de *S. cerevisiae* (*PGK*), la señal de secreción de la subunidad  $\alpha$  de la toxina *killer* de *K. lactis*, el *S11* para la replicación en *K. lactis*, *amp<sup>r</sup>*, *URA3* y el *ori* bacteriano (Figura 3.1).

**pLX8.** (Das y Hollenberg, 1982). Presenta un fragmento *XbaI-XbaI* de 7,8 kb conteniendo los genes de la  $\beta$ -galactosidasa (*LAC4*) y la lactosa permeasa (*LAC12*) de *K. lactis* clonados en el plásmido pUC12 (Figura 3.2).

**pVK1.1.** (Kumar *et al.*, 1992). Presenta un fragmento de 4,1 kb que contiene el gen de la  $\beta$ -galactosidasa (*LACA*) de *Aspergillus niger* flanqueado por el promotor y el terminador de la alcohol deshidrogenasa de levadura (*ADHI*) insertado en el sitio de restricción *SphI* del vector Yep24 (Figura 3.15) (Permitido su uso por *Whitbread Biotechnology PLC. England*).

## 2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

A continuación se describen los medios utilizados para los cultivos de bacterias y levaduras. Los medios de cultivo se prepararon en agua destilada, con un suplemento de un 1,5% de agar bacteriológico en el caso de los medios sólidos en placas *Petri*. Se esterilizaron en un autoclave durante 20 minutos a 121°C y 2Ba de presión.

## 2. 1. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS.

### Medio LB (Luria-Bertani):

Es un medio general de crecimiento de bacterias

Bactotripton	1%
Extracto de levadura	0,5%
Cloruro sódico	0,5%
D-glucosa	0,1%

### Medio LBA:

Medio LB suplementado con 40-80  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina (a partir de una disolución *stock* de 40 mg/ml en agua estéril). El antibiótico se añadió una vez esterilizado el medio, tras alcanzar una temperatura de 60-65°C. Se utilizó para la selección de bacterias que habían sido transformadas con un plásmido conteniendo el gen de resistencia a la ampicilina.

### Placas LBA/X-Gal+IPTG:

Son placas de medio LBA suplementadas con el sustrato cromogénico X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) y el inductor del gen *lacZ* que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa en *E. coli*, IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido). Se utilizaron para discriminar en placas entre colonias bacterianas blancas y azules (productoras de  $\beta$ -Galactosidasa), a fin de identificar aquellos plásmidos recombinantes que habían insertado el gen *LAC4* de *K. lactis* o bien, aquellos plásmidos recombinantes cuyo *lacZ* había sido interrumpido por un inserto de ADN.



Antes de proceder a la siembra se extendieron sobre cada placa, 50  $\mu$ l de una disolución de X-Gal al 20% en dimetilformamida y 10  $\mu$ l de una solución 0,1 M de IPTG.

### **Medio YT:**

Se utilizó para el crecimiento de cepas de bacterias y para la preparación de células competentes. La composición es la siguiente:

Bactotripton	1%
Extracto de levadura	0,5%
Cloruro sódico	0,5%

### **Medio SOC:**

Se utilizó para la preparación de células competentes

Bactotripton	2%
Extracto de levadura	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

## **2. 2. MEDIOS DE CULTIVO PARA LEVADURAS.**

### **Suero de leche:**

El suero de leche se recogió en la fábrica de quesos denominada *QUEGALSA (LEYMA)*. Una vez traídos de la fábrica, en nuestro laboratorio, los sueros se almacenan congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de un litro. Como paso previo a su utilización, inmediatamente tras ser descongelados se esterilizan en autoclave ( $121^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos), provocando la coagulación de la mayor parte de las proteínas. Para separar dichas proteínas, el suero se centrifuga en condiciones estériles (15

minutos a 10.000 r.p.m.). El sobrenadante así obtenido se usa como medio de cultivo. Su composición es la siguiente: 50 mg/ml de azúcares totales, 7,5 mg/ml de proteínas, 5 mg/ml de lípidos totales (Doval, 1992). Cuando se necesitaron niveles iniciales de lactosa elevados, como ocurrió con los cultivos en estado sólido, el suero de leche se concentró hasta cinco veces mediante liofilización.

También fue utilizado el permeado de la ultrafiltración del suero de leche como medio de cultivo microbiológico, en algunos casos con la adición de suplementos nutritivos.

#### **YPD:**

Medio para el crecimiento de levaduras, su composición es la siguiente:

Bactopeptona	0,5%
Extracto de levadura	1%
D-Glucosa	0,5%

#### **YPL:**

Similar al anterior pero con lactosa al 4% o al 6% en vez de glucosa.

#### **YPHSM:**

Medio de expresión de alta estabilidad recomendado por el proveedor (*Eastman Kodak Company*) para el cultivo de la cepa de *S. cerevisiae* BJ3505:

D-Glucosa	1%
Glicerol	3%
Extracto de levadura	1%
Peptona	8%
CaCl <sub>2</sub>	20 mM

**CM ( medio completo):**

También llamado SC (*Synthetic Complete*). Se preparó según Zitomer y Hall, (1976).

Para un litro:	
D-glucosa	20 g
Mezcla de aminoácidos (200X)	5 ml
YNB*	67 ml
Aminoácidos**:	
Histidina, Leucina, Uracilo, Adenina, Tirosina	40 mg (cada aminoácido)
Triptófano	30 mg

\* Se añade después de la esterilización del resto de los componentes, a una temperatura de 60°C y en condiciones estériles.

\*\* Se omitió el aminoácido utilizado como marcador auxotrófico.

*Mezcla de aminoácidos 200X:*

Para un litro:	
Arginina, Metionina, Treonina.	2 g (cada aminoácido)
Isoleucina, Fenil-alanina	12 g (cada aminoácido)
Lisina	8 g

*YNB:*

Para un litro:	
Mezcla de vitaminas 300X	50 ml
Sales traza 150X	100 ml
Sulfato amónico*	75 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
MgSO <sub>4</sub>	7,5 g
NaCl	1,5 g
CaCl <sub>2</sub>	1,5 g

\*Se añadió después de disolver el resto de los componentes para evitar que precipite.

**Mezcla de vitaminas 300X:**

Para un litro:	
Biotina	0,6 mg
Pantotenato cálcico	120 mg
Ácido fólico	0,6 mg
Inositol	600 mg
Niacina	120 mg
p-Aminobenzoico	60 mg
Piridoxina	120 mg
Riboflavina	60 mg
Tiamina	120 mg

**Sales traza 150X:**

Para un litro:	
Ácido bórico	75 mg
Sulfato cúprico	6 mg
Ioduro potásico	15 mg
Cloruro férrico	30 mg
Sulfato manganoso	60 mg
Molibdato sódico	30 mg
Sulfato de zinc	60 mg

**Placas X-Gal ( Rose *et al.*, 1990):**

Se utilizaron para la selección de colonias de levaduras transformadas con plásmidos portadores del gen *LAC4* que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* y que por tanto dan una coloración azul en presencia del sustrato cromogénico X-Gal.

**10XPBSS (Phosphate-buffer stock solution):**

Para un litro:		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 M	136,1 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,15 M	19,8 g
KOH	0,75 M	42,1 g

Se ajustó el pH a 7 (importante para que el X-Gal pueda ser utilizado por las levaduras como sustrato) y se esterilizó. Se almacenó a temperatura ambiente.

*1000XMSS (Mineral stock solution):*

		Para 100 ml:
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,8 M	19,72 g
FeCl <sub>3</sub>	2 mM	32 mg

Se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente. Se forma un precipitado naranja muy fino que es necesario redissolver antes de usar.

*300X Vitaminas (ver placas CM).*

*aa-DM (Drop Mix) (Modificación del descrito por Sherman, 1979):*

		Para 6l ml:
Adenina		40 mg
Arginina, Histidina, Triptófano, Metionina, Uracilo	20 mg (cada aminoácido)	
Leucina		60 mg
Lisina, Tirosina	30 mg (cada aminoácido)	
Fenilalanina		50 mg
Treonina		100 mg

Se omitió el aminoácido utilizado como marcador auxotrófico. Se esterilizó y se almacenó a 4°C.

500 ml de placas X-Gal contienen:

250 ml de SOL 1:		250 ml de SOL 2:	
PBSS	50 ml	Agar	7,5 g
MSS	0,5 ml	D-Glucosa	10 g
300xVit	2 ml	Agua destilada	250 ml
aa-DP	12,5 ml		
Agua destilada	185 ml		

Se esterilizaron las soluciones 1 y 2 por separado, se esperó a que la temperatura fuese inferior a 65°C y se añadieron 0,02 g del sustrato

cromogénico X-Gal en 1ml de DMF (Dimetilformamida) a la solución 1. Se mezclaron las dos soluciones y se vertieron las placas.

## **2. 3. CONDICIONES DE CULTIVO.**

### **2. 3. 1. Cultivos en medio líquido.**

Se realizaron cultivos discontinuos en medio líquido en *Erlenmeyer*, utilizando 1:5 de su volumen con una agitación orbital de 250 r.p.m. y una temperatura de 37°C, en el caso de bacterias, o de 30°C si se trataba de levaduras. Se recogieron muestras a diferentes intervalos de tiempo y se determinó, según el caso, actividad  $\beta$ -galactosidasa intracelular y extracelular, absorbancia, consumo de azúcares totales o reductores, lactosa, etanol (apartado 4).

En algunos casos se realizaron cultivos en 2 litros de medio en fermentadores de tipo *Biostat-MD (Braun-Biotech)* monitorizando la aireación (2 l/min), temperatura (30°C), pH, agitación (250 r.p.m.). El crecimiento se siguió mediante una sonda de turbidez (*Braun-Biotech*). Se recogieron muestras a diferentes intervalos de tiempo y se analizaron los parámetros mencionados anteriormente.

### **2. 3. 2. Cultivos en medio sólido.**

Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de *Petri*, tras la resiembra del microorganismo en estría se cultivó durante toda la noche a 37°C (bacterias) o de dos a tres días a 30°C (levaduras).

### 2. 3. 3. Cultivos en estado sólido.

Se emplearon dos tipos de soporte sólido: carozo de maíz triturado y salvado de trigo. El carozo de maíz utilizado forma parte de la gama denominada *EUGRITS* producida por la sociedad *EURAMA* (Maubourguet, Francia). Se emplearon partículas de carozo de maíz de dos diámetros distintos, 0,2 mm y 0,8 mm. El salvado de trigo se obtuvo en panaderías.

Un gramo de soporte se esterilizó en autoclave en un matraz *Erlenmeyer* de 100 ml de capacidad, a continuación, se humedeció con 3 ml de fase líquida (agua destilada estéril o suero de leche concentrado). Como inóculo se empleó 1 ml de un precultivo en suero de leche, crecido toda la noche a 30°C y 250 r.p.m. Cuando se necesitaron inóculos mayores, las células se concentraron hasta 10 veces por centrifugación. Los cultivos en estado sólido se incubaron a 30°C y 250 r.p.m. La toma de muestras se realizó a diferentes intervalos de tiempo, para ello se procedió a lavar 5 veces el soporte de cada matraz con 2 ml de agua destilada para extraer las células y disolver el azúcar remanente. Las fases líquidas obtenidas de cada *Erlenmeyer* se centrifugaron a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos. En el botón celular se determinó actividad  $\beta$ -galactosidasa y biomasa. En el sobrenadante, se analizaron los azúcares totales y reductores y la  $\beta$ -galactosidasa extracelular.

La biomasa se determinó secando a 60°C durante toda la noche el sedimento celular obtenido tras la extracción con agua y centrifugación. En el caso del salvado de trigo, como los componentes que no son metabolizados por la levadura se extraen también unidos a la biomasa, se realizó un control de soporte sin células procediendo a realizar la extracción y posterior secado de una manera similar al soporte con células. El valor obtenido se restó de los datos de biomasa conseguidos para el

salvado de trigo. Los valores de biomasa y azúcares se dan en mg/g de soporte.

### 3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

#### 3. 1. OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

##### 3. 1. 1. Obtención de ADN plasmídico a partir de bacterias.

El aislamiento de los plásmidos, a pequeña (1 ml de cultivo) y mediana escala (25 ml), se realizó según el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.* 1989), extracción con fenol y precipitación del ADN con etanol al 95% a -20°C.

Para realizar el aislamiento a pequeña escala (miniprep) se inocularon las células en 1 ml de LBA. Tras su crecimiento durante toda la noche a 37°C y en agitación orbital, se centrifugaron las células durante 3 minutos a 8.000 r.p.m. El sedimento se resuspendió en 100 µl de solución 1 (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-ClH 25 mM, pH 8,0) previamente enfriada en hielo y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se añadieron 200 µl de la solución 2 preparada en el momento (NaOH 0,2 N y SDS al 1%), se mezcló por inversión 2 ó 3 veces hasta conseguir una viscosidad homogénea y se mantuvo en hielo durante 5 minutos; transcurrido este tiempo se añadieron 150 µl de solución 3 (60 ml de acetato potásico 5M, 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de agua destilada) que se mezcló por inversión suave del tubo, incubando otros 5 minutos en hielo. Los tubos se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos. Para eliminar restos de proteínas que podrían dificultar posteriores manipulaciones del ADN, el sobrenadante se sometió a una



extracción con igual volumen de PCIA, se mezcló la muestra en *vortex* y se centrifugó 5 minutos a 8.000 r.p.m. Se transfirió la fase superior acuosa a un tubo limpio y se le añadieron dos volúmenes de etanol al 95%, se incubó 5 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  y, posteriormente, los plásmidos se precipitaron por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos. Para eliminar restos de sales, el sedimento se lavó con un volumen de etanol al 70% y se precipitó como en el paso anterior. Las muestras se secaron a vacío por espacio de 5 minutos y posteriormente se resuspendieron en 20-30  $\mu\text{l}$  de 1xTE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y EDTA 1mM) o en agua bidestilada dependiendo de su uso posterior. Las preparaciones se conservaron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Con este procedimiento, además del ADN se obtiene una considerable cantidad de ARN que se elimina con un tratamiento con RNasa A a una concentración final de 1  $\mu\text{g/ml}$ , durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .

En las preparaciones a mediana escala (maxiprep) se procedió de igual modo que en el mencionado en este apartado, pero partiendo de 25 ml de cultivo y variando el volumen de las soluciones en la proporción correspondiente.

#### *PCIA (Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico)*

Se mezclaron un volumen de fenol fundido a  $65^{\circ}\text{C}$  con un volumen de cloroformo y con dos volúmenes de tampón 1xTE para equilibrar el pH. Se agitó vigorosamente durante varios minutos, tras los cuales se dejó la mezcla a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que se separó completamente la fase acuosa que se retiró por aspiración. Se repitió este proceso dos o tres veces. Tras el último equilibrado se añadieron 1/25

volúmenes de alcohol isoamílico a la mezcla. Se conservó en oscuridad a 4°C.

#### *Disolución de RNAsa A*

Se preparó una disolución de 5 mg/ml en agua bidestilada estéril que se calentó a 100°C durante 10 minutos para eliminar restos de DNAsas. Se dejó enfriar lentamente y se conservó congelada en alícuotas.

#### **3. 1. 2. Purificación de ADN para secuenciación.**

En el caso de la obtención de plásmidos para la secuenciación se partió de una preparación de ADN obtenida mediante lisis alcalina, se trató con RNAsa A, a una concentración final de 0,03 mg/ml, a 37°C durante 30 minutos. Se extrajo la RNAsa con PCIA y se precipitó el ADN con dos volúmenes de etanol al 95% y 1/10 del volumen de acetato sódico 3M. Se lavaron los restos de sales con etanol al 70% y se secó el ADN al vacío. Se resuspendió en 80 µl de agua estéril y se añadieron 100 µl de PEG 6.000 al 13% y 16 µl de NaCl 5M, se incubó en hielo durante 20 minutos y se centrifugó a 13.000 r.p.m., el precipitado se lavó con etanol al 70%, y se secó al vacío. El ADN así purificado se resuspendió en unos 20 µl de agua destilada y se midió su concentración según se indica en el apartado siguiente.

#### **3. 1. 3. Medida de la concentración del ADN.**

Se tomaron 5 µl de la preparación de ADN, libre de ARN, y se llevaron a un volumen final de 1 ml con agua bidestilada. Las mediciones se efectuaron en un espectrofotómetro *Cary (Varian)* utilizando cubetas de cuarzo de 1 ml. Se midió la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm.

La concentración real se calculó sabiendo que una unidad de  $A_{260}$  corresponde a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  de ADN. La relación  $A_{260}/A_{280}$  indica la calidad de la muestra, para una preparación de ADN sin impurezas este cociente toma un valor de 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989).

El conocimiento de la concentración de ADN es importante en las técnicas de amplificación por PCR o secuenciación .

### **3. 2. MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ADN.**

#### **3. 2. 1. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.**

El ADN fue digerido con endonucleasas de restricción de *Boehringer-Manheim* siguiendo las recomendaciones del proveedor en cuanto al tampón y a la temperatura requeridas. Los tiempos de digestión variaron, según la cantidad de ADN a digerir, entre 2 y 4 horas.

#### **3. 2. 2. Digestión con nucleasa *S1* para eliminar extremos protuberantes.**

La nucleasa *S1* digiere específicamente ADN monocatenario, se empleó para eliminar los extremos protuberantes que se producen tras corte con la correspondiente endonucleasa de restricción. Se utilizó la nucleasa *S1* del *kit Erase-a-Base System* de *Promega*. El ADN una vez digerido con la enzima de restricción y purificado, se trató con una dilución 1/100 en agua destilada de la nucleasa *S1* (25U/ $\mu\text{l}$ ) y su correspondiente tampón (suministrado en el *kit*) en un volumen final de unos 15-20  $\mu\text{l}$ . La reacción transcurrió a temperatura ambiente recogiendo alicuotas de 2  $\mu\text{l}$  cada 15 segundos y parándola con la

solución de parada suministrada por el proveedor. La muestra se calentó a 70°C durante 10 minutos y se purificó.

### 3. 2. 3. Desfosforilación del ADN.

Esta técnica se empleó para eliminar los grupos fosfato 5' en vectores digeridos con endonucleasas de restricción, para evitar el autoligamiento. Para ello se trató el ADN con la enzima fosfatasa alcalina.

La fosfatasa cataliza la eliminación de los extremos 5'-fosfato del ADN, ARN, rNTP, dNTP. En el tratamiento se utilizó 1U de fosfatasa alcalina (*Boehringer Mannheim*) junto con 1 µl del tampón 10x suministrado, para un volumen final de digestión de 10 µl. Se incubó la mezcla durante una hora a 37°C y, transcurrido ese tiempo, la fosfatasa se inactivó por calor a 75°C durante 10 minutos, añadiéndole, previamente, 10 µl de EGTA 0,1 mM.

Tras la inactivación, se realizó una extracción con un volumen de PCIA, tras lo cual el ADN se precipitó con dos volúmenes de etanol al 95% y 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y se lavó con etanol al 70%. Se secó al vacío y se resuspendió en agua bidestilada.

### 3. 2. 4. Ligamiento de fragmentos de ADN.

Se empleó la ADN ligasa *T4* de *Boehringer Mannheim* con el tampón suministrado con la enzima. Los ligamientos se realizaron en un volumen de 10 µl añadiendo un volumen variable de ADN (generalmente una proporción 1:10 de vector e inserto a clonar) y 1 U de ligasa. Se incubó 2-4 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C cuando el ligamiento era de extremos cohesivos. Cuando el ligamiento era de extremos romos se incubó a 18°C toda la noche.

### 3. 2. 5. Utilización de polimerasas.

#### ADN polimerasa de T4 y fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Boehringer Mannheim).

Presentan actividad polimerasa 5'→3', actividad exonucleasa 3'→5' y carecen de actividad exonucleasa 5'→3'. Se usaron, tanto para rellenar extremos recesivos 3' como para eliminar extremos protuberantes 3' en la construcción de plásmidos recombinantes. En el caso de la eliminación de extremos protuberantes 3' se prefirió emplear la ADN polimerasa del bacteriófago T4 debido a su mayor actividad exonucleasa 3'→5'.

Las reacciones de relleno se llevaron a cabo en un volumen final de 15-20  $\mu$ l. Se añadieron al ADN, 1U de la enzima elegida, 1/10 del volumen final del tampón correspondiente a dicha enzima y 3  $\mu$ l de una disolución de nucleótidos 0,125 mM, incubando la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, las muestras se llevaron a un volumen de 100  $\mu$ l y se sometieron a extracción con PCIA, precipitación en doble volumen de etanol y 1/10 de volumen de acetato sódico 3M y lavado con etanol al 70%. El ADN se resuspendió en agua estéril y generalmente se utilizó en reacciones de ligamiento con otros fragmentos de extremos romos.

#### ADN polimerasa del bacteriófago T7.

Se utilizó una forma obtenida por manipulación genética *in vitro*, la *Sequenase*<sup>TM</sup> version 2.0. Esta polimerasa carece completamente de actividad exonucleasa 3'→5' y posee baja actividad exonucleasa 5'→3', lo que la hace adecuada para la secuenciación del ADN.

### ADN Polimerasa de *Taq* (Boehringer Mannheim).

Se aisló originalmente de *Thermus aquaticus*. Tiene una actividad polimerasa 5'→3' muy alta y carece de actividad exonucleasa 5'→3'. Esta polimerasa es estable en incubaciones prolongadas a elevadas temperaturas y puede, por tanto, ser empleada para amplificar fragmentos de ADN mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR).

### ADN Polimerasa de *Pwo* (Boehringer Mannheim).

Aislada de *Pyrococcus woesei*. Se utilizó para la amplificación de fragmentos de ADN de un tamaño de 3 Kb con un riesgo de error razonablemente bajo. Esta polimerasa presenta actividad ADN polimerasa 5'→3' y actividad exonucleasa 3'→5', careciendo de actividad exonucleasa 5'→3'. Además de ofrecer una alta fiabilidad, pues es unas 10 veces más fiable en la síntesis de ADN que la ADN polimerasa de *Taq*, deja extremos romos en los productos de PCR, lo cual resulta muy útil a la hora de clonar dichos productos en un sitio de restricción romo.

### **3. 2. 6. Amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La amplificación del ADN por PCR fue realizada en un termociclador. 20 ng de ADN molde se incubaron con 30 pmoles de cebador-1 y otros tantos de cebador-2 (suministrados por *Pharmacia*) en presencia de dNTPs 0,25 mM (*Boehringer-Mannheim*), tampón 1x de la *Taq* polimerasa o de la *Pwo* polimerasa y 2U de la correspondiente polimerasa. Se desnaturalizó el ADN molde antes de añadir la polimerasa incubando durante 2 minutos a 94°C. La polimerasa, se añadió rápidamente, iniciándose una serie de 30 ciclos de: 1 minuto de

desnaturalización a 94°C, 2 minutos de anillamiento a 50-57°C (dependiendo de la temperatura de anillamiento de los cebadores) y 2 minutos de extensión a 72°C. Se realizó un último ciclo de 10 minutos a 72°C para que se terminasen todas las reacciones.

Tras la finalización de la PCR, se comprobó el ADN obtenido en un gel de agarosa al 0,7% (apartado 3.5.1)

### **3. 3. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN.**

#### **3. 3. 1. Transformación de *E. coli*.**

*3. 3. 1. 1. Método de transformación con cloruro cálcico (Cohen et al., 1972).*

##### *Preparación de células competentes.*

Con este procedimiento se prepararon las células competentes de las cepas HB101, JM101 y JM109. Se partió de un cultivo de 100 ml de YT inoculado con 1 ml de un cultivo fresco previo. Se dejó crecer hasta alcanzar una  $A_{600}$  de 0,6 (2-3 horas). Se recolectaron las células centrifugando a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Se lavaron en 50 ml de NaCl 10 mM frío. Se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en 50 ml de  $Cl_2Ca$  100 mM frío. Se incubaron en hielo durante 20 minutos. Este tratamiento las induce a un estado de “competencia” transitorio, durante el cual las células son capaces de captar ADN. Tras una centrifugación a 5.000 r.p.m. se resuspendieron en 3 ml de  $Cl_2Ca$  100 mM. Para conservar las células congeladas a -80°C se añadió igual volumen de una disolución de glicerol al 30% en  $Cl_2Ca$  100 mM y se repartieron en alicuotas.

*Transformación.*

En el momento de la transformación, 100  $\mu$ l de células competentes recién descongeladas se incubaron en hielo con 400  $\mu$ l de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  100 mM y 1-2  $\mu$ g del ADN transformante. Al cabo de 30 minutos, las células fueron sometidas a un choque térmico a 42°C durante 2 minutos, tras lo cual se añadió 1 ml de medio LB y se incubaron a 37°C durante 60 minutos antes de sembrarlas en placas selectivas con ampicilina para obtener colonias aisladas.

3. 3. 1. 2. *Método de transformación con cloruro de rubidio (Kushner, 1978).*

*Preparación de células competentes.*

Se utilizó este protocolo para la cepa DH5 $\alpha$ . Las células se cultivaron en 100 ml de medio SOC hasta que alcanzaron una  $A_{600}$  de 0,6, momento en el que se paró el crecimiento enfriando el matraz en hielo durante unos 10 minutos. A continuación, se centrifugaron a 4°C a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos. Al sedimento celular se le añadieron 30 ml de tampón Tfb-1 ( $\text{Cl}_2\text{Rb}$  100 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  50 mM, acetato potásico 30 mM,  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  10 mM y glicerol 15%, pH 5,8) en frío. Se volvió a centrifugar, se resuspendieron las células en 4 ml de tampón Tfb-2 (MOPS 10 mM pH 7,  $\text{Cl}_2\text{Rb}$  10 mM,  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  75 mM y glicerol 15%) y se repartieron en alícuotas para congelarlas a -80°C.

*Transformación.*

Se descongeló una alícuota de 100  $\mu$ l de células competentes y se le añadió el ADN plasmídico. Se incubó 20 minutos en hielo y se le dió un choque térmico a 42°C durante 90 segundos, tras los cuales se incubó 3



minutos en hielo. A continuación se añadieron 400  $\mu$ l de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37°C. Las células transformadas se centrifugaron a 3.000 r.p.m. y se sembraron en placas selectivas.

### **3. 3. 2. Transformación de levaduras.**

*3. 3. 2. 1. Transformación de levaduras por el método de Klebe (Klebe et al., 1983).*

Este método se basa en la inducción de la transformación por tratamiento con polietilenglicol. 10 ml de células de levadura de un cultivo a una  $A_{600}$  de aproximadamente 0,6 se sedimentaron por centrifugación durante cinco minutos a 4.000 r.p.m., lavando el precipitado con 5 ml de solución A (Sorbitol 1M, bicina 10 mM, etilenglicol 3%, KCl 1,25 M,  $Cl_2Ca$  30 mM, pH 8,35 y dimetilsulfóxido 5%). Las células se resuspendieron en 0,2 ml de esta solución, a continuación se congelaron en nieve carbónica por espacio de 10-15 minutos, en este tiempo se les añadió el ADN plasmídico transformante en un volumen de 50  $\mu$ l; posteriormente fueron sometidas durante 5 minutos a un choque térmico a 37°C con agitación intensa. Pasado este tiempo, se añadieron 1,5 ml de solución B (Polietilenglicol-1000 40%, Bicina 200 mM, pH 8,35) y se incubaron en este medio a 30°C durante 1 hora, tras lo cual se centrifugaron y lavaron en 1,5 ml de solución C (NaCl 0,15 M, Bicina 10 mM, pH 8,35). Las células se sembraron en placas selectivas adecuadas.

3. 3. 2. 2. *Transformación de levaduras por el método de Ito (Ito et al., 1983).*

Se basa en el tratamiento de las células con sales de litio. 10 ml de células de levadura de un cultivo a una  $A_{600}$  de aproximadamente 0,6 se precipitaron por centrifugación durante cinco minutos a 4.000 r.p.m., se lavó el botón celular con 5 ml de acetato de litio 0,1 M. Tras una nueva centrifugación se resuspendieron las células en 100  $\mu$ l de acetato de litio 0,1 M y se incubó a 30°C durante 1 hora. Se añadieron 5 ml de ADN de salmón 10 mg/ml desnaturalizado (*carrier*) junto con el ADN transformante y se incubó la mezcla a 30°C durante 30 minutos. Se añadieron 0,7 ml de una mezcla con PEG al 44% y 1/10 de acetato de litio 0,1 M y se realizó una nueva incubación durante 1 hora a 30°C. El próximo paso fue la inducción de un choque térmico sometiendo las células a 42°C durante 10 minutos. Tras el choque térmico se centrifugó y se lavó con 1 ml de 1xTE (pH 7,5). Se volvió a centrifugar, se resuspendió el botón celular en 400  $\mu$ l de 1xTE (pH 7,5) y se sembró en placas selectivas adecuadas.

3. 3. 2. 3. *Transformación de levaduras por electroporación (Ausubel et al., 1995).*

*Preparación de células competentes.*

500 ml de células creciendo en medio YPD a una  $A_{600}$  de 1,3-1,5 se centrifugaron durante 5 minutos a 5.000 r.p.m. y se resuspendieron en 80 ml de agua destilada estéril fría. Para incrementar la electrocompetencia se incubaron con 10 ml de 10xTE, pH 7,5 y 10 ml de acetato de litio 1 M, pH 7,5 durante 45 minutos a 30°C y agitación suave. Posteriormente se

añadieron 2,5 ml de DTT 1M y se incubó 15 minutos a 30°C. Al finalizar la incubación se diluyó la suspensión celular con 400 ml de agua destilada estéril fría y se centrifugó a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos. Se hizo un segundo lavado con 250 ml de agua destilada, se centrifugó y se resuspendió el botón celular en 20 ml de sorbitol 1M frío. Tras una última centrifugación, se resuspendió en 0,5 ml de sorbitol 1M frío.

#### *Electroporación.*

Se utilizó el *Gene Pulser II* de la casa comercial *Bio-Rad*. En una cubeta de electroporación fría de 0,2 cm se añadieron 40  $\mu$ l de células y 100 ng de ADN. Se sometieron a un pulso de 1,5 kV a 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$  de resistencia. Inmediatamente se añadió 1 ml de Sorbitol 1M frío y se sembró en placas selectivas conteniendo sorbitol 1 M (actúa como protector osmótico, aumentando la supervivencia de las levaduras transformadas).

Generalmente, en las transformaciones tanto de bacterias como de levaduras, se realizó una transformación sin ADN transformante, como control negativo.

#### *3. 3. 2. 4. Comprobación de la estabilidad plasmídica.*

Para la determinación de la estabilidad del plásmido en la levadura transformada se tomaron muestras a diferentes tiempos de cultivo, se hicieron diluciones dependiendo de la fase de cultivo en que se encontrase y se sembraron 100  $\mu$ l en placas CM. Se dejaron crecer a 30°C y se realizó una réplica en placas CM sin el aminoácido utilizado como marcador auxotrófico, determinando la proporción de células viables.

### **3. 4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE LEVADURA.**

Se utilizaron varios métodos de preparación de extractos proteicos de la levadura *K. lactis*. En todos los casos se partió de un cultivo de células creciendo en medio YPL que se precipitaron por centrifugación a 7.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C y posteriormente se lavaron una vez con agua destilada estéril fría.

#### **3. 4. 1. Extracción con solventes.**

##### *3. 4. 1. 1. Extracción con cloroformo.*

Se siguió el método de Stred'anský *et al.*, (1993) según el cual 2 g de peso húmedo de células recogidas por centrifugación se resuspendieron en 20 ml de tampón fosfato 0,5 M, pH 9,5 al que se le añadió un 1% de cloroformo. La suspensión celular se incubó a 37°C durante 3 horas y se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa extraída y la concentración de proteínas a diferentes horas tras separar el lisado celular centrifugando 5 minutos a 5.000 r.p.m.

##### *3. 4. 1. 2. Extracción con diferentes solventes.*

En otros casos 1 g (peso húmedo) de células fueron resuspendidas en diferentes solventes al 80%: etanol, metanol, isopropanol y t-butanol, según la técnica de Fenton (1982). Tras la extracción, que tuvo lugar a 30°C durante 90 minutos, se diluyó la mezcla células-solvente con 100 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 6,6 y se incubó 21 horas a 30°C. Posteriormente, se centrifugó 5 minutos a 5.000 r.p.m., obteniendo un

sobrenadante que contiene el extracto crudo de proteínas en el que se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa y la concentración proteica.

### 3. 4. 2. Extracción por procedimientos mecánicos.

Una vez recogidas las células se resuspendieron en 1 ml de tampón A (Tris-HCl 0,2 M, pH 7,8,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,3 M,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10%) frío por gramo de peso húmedo. Antes de proceder a la rotura mecánica se añadieron inhibidores de proteasas a las siguientes concentraciones finales: pepstatina 4  $\mu\text{M}$ , leupeptina 4  $\mu\text{M}$ , aprotinina 2  $\mu\text{g/ml}$ , PMSF (fenilmetilsulfonilfluorídrico) 0,1 mM y  $\beta$ -Mercaptoetanol 2  $\mu\text{M}$ . Las células se rompieron usando diferentes procedimientos:

a) Mediante agitación vigorosa con *vortex* durante pulsos de 20 segundos y pausas de otros 20 segundos en hielo.

b) El mismo procedimiento que el anterior pero añadiendo 0,2 gramos de perlas de vidrio de 1,5 mm.

c) Utilizando un sonicador a 16 micrones con pulsos de 5 minutos y 5 minutos de pausa en hielo, repitiéndose el proceso unas 4 veces. Se observó la lisis de las células a través de un microscopio óptico.

Tras finalizar la rotura mecánica se centrifugaron a 8.000 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante se sometió a una nueva centrifugación durante 90 minutos a 40.000 r.p.m.. El sobrenadante así obtenido se repartió en alícuotas de 500  $\mu\text{l}$  que se congelaron en  $\text{N}_2$  líquido. Se determinó la concentración de proteína total del extracto por el método Bradford (1976) (apartado 4.4.) y la actividad  $\beta$ -galactosidasa por el método de Guarente (1983) (apartado 4.5.).

### 3. 4. 3. Extracción con enzimas.

Se siguió la técnica de Jigami *et al.*, (1986) con modificaciones, esta técnica también se empleó para la formación de protoplastos. Tras centrifugar las células crecidas en YPL se obtuvo un sobrenadante (S1) y un precipitado. Este precipitado se resuspendió en 1 ml de solución A (Sorbitol 1,2 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, pH 6,8 y 25 mM de 2-Mercaptoetanol) y se lavó 2 veces, se resuspendió de nuevo en 2 ml de solución B (Sorbitol 1,2 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, pH 6,8 y 0,6% de Liticasa de *Arthrobacter luteus* de *Sigma*) y se incubó unos 45-60 minutos a 30°C con agitación suave. La formación de protoplastos se observó en el microscopio óptico. Posteriormente se centrifugó a 2.500 r.p.m. a 4°C durante 4 minutos, en el sobrenadante (S2) se encuentra la fracción periplásmica y en el precipitado las células las cuales se lisaron en presencia de agua destilada y se sometieron a una nueva centrifugación de la cual se obtuvo un sobrenadante (S3) -fracción citoplasmática- y un precipitado (P1).

Se midió actividad  $\beta$ -galactosidasa y concentración proteica en las fracciones S1, S2, S3 y P1.

## 3. 5. TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS.

### 3. 5. 1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

La agarosa en solución acuosa, fundida y posteriormente enfriada, genera un gel por formación de puentes de hidrógeno. Los geles de agarosa permiten un rango de separación en función de su concentración y del tamaño molecular de los fragmentos a separar (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizaron para la separación de fragmentos de ADN, con objeto de

comprobar nuevas construcciones en plásmidos, productos de PCR, o bien para separar fragmentos específicos que fueron rescatados del gel.

Se prepararon geles con agarosa al 0,7%, utilizando el tampón Tris-EDTA-Acetato (Tris 0,04 M, EDTA 1mM, acetato sódico 20 mM, ácido acético 30 mM). Las electroforesis a voltajes entre los 60 V (para los geles pequeños) y los 100 V se efectuaron por espacio de 1-4 horas, dependiendo también del tamaño de los fragmentos a separar. Como referencia de tamaños se utilizaron los marcadores de pesos moleculares número II, III y XVII de *Boehringer Mannheim*. La composición del tampón de carga 10x fue la siguiente: 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilen-cianol y 30% de glicerol en 1xTE.

#### *Tinción de los geles de agarosa y visualización de las muestras.*

Los geles se tiñeron por inmersión en una solución de agua destilada o tampón de electroforesis (Tris-EDTA-Acetato) con 0,01% (v/v) de una solución *stock* de bromuro de etidio (5 mg/ml), durante 5-15 minutos. Se lavaron con agua destilada y se visualizaron las muestras exponiendo los geles a la luz UV en un transiluminador *Vilber Lourmat TFX-20 M*. El bromuro de etidio es un fluorocromo intercalante que se une específicamente al ADN o al ARN, permitiendo la visualización de estos ácidos nucleicos al UV.

#### *Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.*

Para el aislamiento de fragmentos de ADN para su posterior clonación en vectores, se utilizó el *Kit de Gene Clean BIO-101*, siguiendo el protocolo indicado por los proveedores. Se basa en una matriz de sílice, denominada *glass-milk*, a la que se adhiere el ADN y no el resto de los

contaminantes que se extraen mediante un proceso de lavados sucesivos con una solución de cloruro sódico, etanol y agua (*New Wash*). Posteriormente, el ADN se despega de la matriz a 45-50°C. El rendimiento estimado de recuperación es de aproximadamente un 80%.

### 3. 5. 2. Electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida.

Estos geles se utilizaron para la secuenciación de fragmentos de ADN como se indica en el apartado 3.6.3.

### 3. 5. 3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE).

#### 3. 5. 3. 1. Geles desnaturalizantes SDS-PAGE.

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida a una concentración fija de acrilamida del 10% siguiendo el método descrito por Laemmli *et al.*, (1970). Se utilizó la célula de electroforesis *Mini Protean II* de *Bio-Rad*. Los geles separador y concentrador se prepararon según el siguiente esquema:

<u>Solución</u>	<u>Separador</u>	<u>Concentrador</u>
Acrilamida 45%	2,2 ml	0,55 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	2,5 ml	0,63 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,05 ml
APS 10%	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	0,004 ml	0,005 ml
H <sub>2</sub> O	5,1 ml	3,68 ml

Se mezclaron todos los reactivos y en el momento de verter se añadió el TEMED y el APS. Se vertió la solución de acrilamida entre los cristales,



dejando espacio para colocar el peine. Sobre la superficie libre del gel se dejaron resbalar unas gotas de agua, para evitar el contacto entre el gel y el oxígeno del aire que impide la polimerización. Una vez polimerizado el gel separador (20-30 minutos) se eliminó la capa de agua y se rellenó el espacio superior restante del molde con gel concentrador, introduciéndose un peine para la formación del número de pocillos adecuado donde se colocarían las muestras. Tras la gelificación se retiró el peine y se recubrió con la solución tampón.

Se utilizó un tampón Tris-ClH-glicina: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% pH 8,3.

Las muestras de proteínas se diluyeron al 50% con tampón de carga (Tris-HCl 0,12 M pH 6,8, SDS al 6%, glicerol 10%, 2-Mercaptoetanol al 15% y azul de bromofenol 0,0025%) y seguidamente se calentaron a 100°C durante 2-5 minutos, procediéndose a continuación a aplicar la muestra en cada pocillo del gel.

Las electroforesis se llevaron a cabo manteniendo el voltaje constante a 100 V durante el paso de la muestra por el gel concentrador, incrementándose este valor a 120 V durante su transcurso a través del gel separador.

Cuando el frente, coloreado con azul de bromofenol, llegó al extremo inferior de la placa, se detuvo la electroforesis y se procedió a la extracción del gel del molde para la posterior fijación y tinción de las proteínas del mismo.

Como referencia de tamaños se utilizaron los siguientes marcadores de pesos moleculares de proteínas: los marcadores de peso molecular de rango alto de *Sigma* (de 205 kDa a 36 kDa) y los marcadores de peso molecular de rango intermedio de *Promega* (de 97,4 kDa a 14,4 kDa).

### *Tinción de los geles SDS-PAGE.*

Una vez concluida la electroforesis se procedió al lavado de los geles con agua bidestilada, con el fin de eliminar el exceso de SDS. A continuación las proteínas se tiñeron con *Coomassie brilliant blue* (CBB) G-250 (Neuhoff *et al.*, 1985). Previa a su utilización se procedió a la purificación de este colorante, para ello se disolvieron 4 gramos en 250 ml de ácido acético al 7,5%, se calentó a 70°C y se añadieron 44 gramos de sulfato amónico. Después de que el sulfato amónico se hubo disuelto, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente. El colorante se recuperó por filtración.

Después de la electroforesis se dejó incubando el gel durante una hora a temperatura ambiente con agitación en ácido tricloroacético al 12,5%. A continuación se tiñó el gel con CBB 0,1%, ácido ortofosfórico al 2%, y sulfato amónico 6% durante 2 horas o más a temperatura ambiente y en agitación. El lavado se realizó con agua. Para fijar la tinción de las proteínas, se añadió sulfato amónico al 20% y se incubó a temperatura ambiente con agitación. La sensibilidad es de 0,05-0,1 µg por banda.

### *3. 5. 3. 2. Electroelución de proteínas a partir de geles de PAGE.*

Una vez finalizada la electroforesis, se lavó el gel con agua y se tiñó con rojo *Ponceau S* al 0,2% en ácido tricloroacético al 3% para observar las bandas polipeptídicas. Se cortó la banda del gel correspondiente al fragmento de proteína que se pretendía aislar, se lavó con agua hasta eliminar el fondo rojo y se introdujo en una tripa de diálisis con un tamaño de poro de 10-15 kDa. La electroelución se realizó en una cubeta de electroforesis con el tampón Tris-ClH-glicina (pero sin SDS) y a 120 V durante una hora. Tras finalizar se recogió la membrana de diálisis con la

muestra y se dializó frente a agua durante toda la noche. A la mañana siguiente se retiró el líquido de la tripa de diálisis y se concentró mediante liofilización. Una vez liofilizada la muestra se resuspendió en agua estéril y se determinó la concentración proteica mediante el método de Bradford (1976) (apartado 4.4). La banda proteica así aislada fue utilizada para la obtención de anticuerpos.

### *3. 5. 3. 3. Geles de proteínas en condiciones nativas (PAGE).*

Los geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes fueron realizados de la misma manera que los geles SDS-PAGE pero sin añadir SDS y usando un formador de gradientes con una concentración de acrilamida entre 5-15%. La electroforesis se llevó a cabo a 4°C. Como referencia de tamaños se utilizaron los marcadores de pesos moleculares de proteínas nativas de *Sigma* (de 545 kDa a 14,2 kDa).

### *Detección de actividad $\beta$ -galactosidasa en geles de PAGE.*

Una vez concluida la electroforesis en condiciones nativas se usaron tres técnicas diferentes para detectar la banda que presentaba actividad  $\beta$ -galactosidasa:

a) El gel fue inmerso en tampón Z (apartado 4.5.2) conteniendo el substrato cromogénico o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (4 mg/ml) durante varios minutos a 30°C hasta que apareció una banda amarilla (Dickson *et al.*, 1979).

b) Siguiendo la técnica de Erickson y Steers (1970), usando como substrato 0,025 g de BNG (6-bromo-2-naftil- $\beta$ -D-galactopiranosido) en metanol 10% (v/v), Tris-ClH 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,01 M y  $Cl_2Mg$  0,01 M. Se incubó el gel durante varios minutos a temperatura ambiente en la

solución anterior, seguido de una incubación de 1 a 2 minutos con 1 mg/ml de *diazo-blue B*. La aparición de una banda marrón indicó la presencia de una forma enzimáticamente activa de  $\beta$ -galactosidasa. La reacción se paró lavando con agua y fijando el gel en ácido acético al 7,5%.

c) Se utilizó un tercer método (Brady *et al.*, 1995), incubando el gel durante 2-5 horas a temperatura ambiente en una solución con 5 mM de MUG (metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactósido) en fosfato sódico 50 mM, pH 7,0. Para la visualización de la banda los geles fueron transferidos a un transiluminador de UV.

### 3. 6. TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN DE ADN.

Las reacciones de secuenciación se realizaron empleando el método de terminación de la cadena con 2,3-didesoxirribonucleótidos trifosfato (ddNTPs) (Sanger *et al.*, 1977), utilizando el *Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (Amersham)*. Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando la ADN polimerasa del bacteriófago *T7* (apartado 3.2.5) suministrada en el *kit*. Se utilizaron cebadores comerciales o diseñados a partir de la secuencia de ADN previamente establecida.

#### 3. 6. 1. Preparación del ADN molde.

Los moldes se obtuvieron a partir de ADN bicatenario, mediante una desnaturalización alcalina según se describe a continuación: 4  $\mu$ g de ADN obtenido tras precipitación con PEG (apartado 3.2.1.) se llevaron a un volumen de 10  $\mu$ l con agua, después de añadir 1  $\mu$ l de una solución de NaOH 2 M y EDTA 2 mM, se incubaron a 37°C durante 30 minutos, se enfriaron en hielo y se mezclaron para su precipitación con 1  $\mu$ l de acetato

sódico 3M y 2-4 volúmenes de etanol al 95%. Tras centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos, lavado con etanol al 70% y secado al vacío se resuspendieron en 7  $\mu$ l de agua. En la reacción de secuenciación se emplearon los 7  $\mu$ l.

### **3. 6. 2. Reacciones de secuenciación.**

**Hibridación del cebador con el ADN molde:** Se mezclaron los 7  $\mu$ l de ADN molde con 2  $\mu$ l del tampón de la ADN polimerasa T7 (suministrado en el *kit*) y 1  $\mu$ l del cebador (250-500 ng), se incubaron a 65°C durante 2 minutos, posteriormente se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta alcanzar una temperatura aproximada de 37°C para facilitar la unión del cebador al ADN molde y se pasaron las muestras a hielo hasta el inicio de la reacción de marcaje.

**Reacción de marcaje:** Los marcajes se prepararon poco antes de cargar las reacciones en el gel. A la mezcla molde-cebador en hielo se le añadieron: 1  $\mu$ l de DTT 0,1 M, 2  $\mu$ l de mezcla de marcaje diluida (1:5) suministrada en el *kit*, 0,5  $\mu$ l de radioisótopo ( $^{35}\text{S}$ - $\alpha$ -dATP), 1  $\mu$ l de ADN polimerasa T7 diluida (1:8) con el tampón de dilución de la enzima (suministrado en el *kit*). Las reacciones de marcaje se incubaron durante 5 minutos a 20°C.

**Reacción de terminación:** Mientras se desarrollaban las reacciones de marcaje, se prepararon cuatro tubos, cada uno de ellos con 2,5  $\mu$ l de cada una de las mezclas de terminación del *kit*, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP. Estos tubos se incubaron a 37°C durante los últimos minutos de la reacción de marcaje.

A cada uno de ellos se le añadieron 3,5  $\mu$ l de la reacción de marcaje y se incubaron a 37°C durante 5 minutos. Las reacciones se pararon con 4  $\mu$ l de solución de parada del *kit* y se mantuvieron en hielo hasta el momento de ser cargadas en el gel.

### 3. 6. 3. Gel de secuenciación.

Los geles de secuenciación se prepararon al 7% a partir de una disolución *stock* que se conserva en oscuridad a 4°C y cuya composición se indica a continuación:

*Mezcla para geles al 7%:*

<u>Para 500 ml:</u>	
Urea	210 g
Acrilamida al 45%	78,1 ml
10xTBE	50 ml

*Disolución de Acrilamida al 45%:*

<u>Para 500 ml:</u>	
Acrilamida	217,5 g
Bis-Acrilamida	7,5 g

*10xTBE:*

<u>Para 500 ml:</u>	
Tris (900 mM)	54 g
Ácido bórico (900 mM)	27,5 g
EDTA (40 mM)	7,4 g

Se tomaron 70 ml de mezcla para geles al 7% y se añadieron 250  $\mu$ l de APS 10% y 50  $\mu$ l de TEMED, se mezcló todo bien y se inyectó en un molde constituido por dos cristales con una separación de 0,4 mm. Uno de

los cristales del molde se siliconizó previamente con una disolución al 5% de dicloro-metil-silano en cloroformo. Una vez polimerizado el gel, se procedió a la electroforesis vertical en tampón 1xTBE. Antes de cargar las muestras se esperó a que el gel alcanzara una temperatura entre 50 y 55°C aplicando un voltaje de unos 1.800-2.000 V. Las muestras se desnaturalizaron a 75°C durante 2 minutos antes de ser cargadas en el gel y se mantuvieron en hielo hasta el momento de la carga. Tras cargar las muestras, la electroforesis se mantuvo a una potencia de 90 W por un tiempo variable durante el cual se hicieron dos o tres cargas (de 2 a 8 horas), dependiendo de la extensión que se quería secuenciar.

Al finalizar la electroforesis se separó uno de los cristales y el gel pegado al otro cristal se adhirió a un papel de filtro grueso y se secó en un desecador de geles al vacío durante una hora.

### *3. 6. 3. 1. Autorradiografías de los geles de secuenciación.*

Los geles de secuenciación se visualizaron tras exponer los geles secos a películas de rayos X *Agfa Curix* en carcasas con pantalla amplificadora durante un tiempo estimado en relación con la señal detectada con el contador *Geiger* (16 horas normalmente). Las películas se revelaron 5 minutos en revelador RX *Agfa G-150*, se lavaron 1 minuto en agua y se fijaron 5 minutos en fijador *Agfa-G350*.

## 4. TÉCNICAS ANALÍTICAS.

### 4. 1. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES (REACCIÓN DEL FENOL-SULFÚRICO).

Basado en la reacción del furfural, el método aplicado (Dubois *et al.*, 1956, según se describe en Strickland y Parsons, 1968), consistió en una valoración de los monosacáridos presentes en la muestra a estudiar, más los obtenidos a través de la hidrólisis ácida de los disacáridos.

Se mezclaron 0,5 ml de muestra con 0,5 ml de una solución acuosa (50 mg/ml) de fenol y 2,5 ml de una solución (5 mg/ml) de sulfato de hidracina ( $N_2H_4 \cdot H_2SO_4$ ) en ácido sulfúrico concentrado (El sulfato de hidracina evita la oxidación espontánea del fenol en la mezcla de reacción). Esta última solución se añadió rápidamente para que la mezcla fuese inmediata. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 490 nm frente a un blanco en el que la solución a valorar se substituyó por agua destilada.

El calibrado se llevó a cabo mediante una serie de diluciones preparadas a partir de una solución acuosa de glucosa. Un intervalo de concentraciones adecuado es 12-125  $\mu\text{g/ml}$ .

### 4. 2. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES (REACCIÓN DEL ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO).

El método (Bernfeld, 1951) se basa en la determinación de los grupos reductores (de la glucosa, galactosa y lactosa) presentes en la muestra a estudiar.



Reactivo:

	Para 100 ml:
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	1 g
Tartrato Na-K-4H <sub>2</sub> O	30 g
NaOH 2N	20 ml
Utilizable en tanto no se forme precipitado.	

Se mezcló 1 ml de muestra con 1 ml de reactivo. La mezcla se trató 5 minutos en baño de agua a ebullición, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 10 ml de agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm frente a un blanco en el que la solución a valorar se sustituyó por agua destilada.

El calibrado se llevó a cabo sobre una serie de diluciones preparadas a partir de una solución acuosa de glucosa. Un intervalo de concentraciones adecuado es 0,25-2,5 mg/ml.

#### 4. 3. DETERMINACIÓN DE LACTOSA/D-GALACTOSA.

En algunos experimentos se hizo necesario determinar el consumo de lactosa de una manera más específica, para ello se utilizó un test comercial (*Boehringer-Mannheim*) basado en la hidrólisis de la lactosa por la enzima  $\beta$ -galactosidasa y posterior oxidación de la D-galactosa obtenida por la  $\beta$ -galactosa deshidrogenasa. La cantidad de NADH formado en esta última reacción está en una relación estequiométrica con respecto a la lactosa y la D-galactosa. El incremento en NADH se determinó midiendo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm. Se procedió siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### 4. 4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (MÉTODO DE BRADFORD).

El método de Bradford (1976) es un método colorimétrico que nos permite detectar cantidades de proteínas de hasta 1 µg.

Se preparó 1 ml de la muestra problema convenientemente diluida, de ahí se tomaron 800 µl y se llevaron a 1 ml con el reactivo *Protean-assay* de *Bio-Rad*. Las muestras se agitaron vigorosamente con la ayuda de un *vortex* y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Antes de transcurrida 1 hora se determinó su absorbancia a 595 nm. La recta de calibrado se elaboró con albúmina de suero bovino (BSA), en cantidades comprendidas entre 1 y 25 µg.

#### 4. 5. DETERMINACIÓN DE ETANOL.

Se utilizó un test comercial (*Boehringer-Mannheim*) basado en la oxidación, en condiciones alcalinas, del etanol a acetaldehído en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa por el dinucleótido de nicotinamina-adenina (NAD). El acetaldehído formado es, posteriormente, oxidado por la enzima aldehído deshidrogenasa generando ácido acético y NADH. La cantidad de NADH formado en esta última reacción está en una relación estequiométrica con respecto al etanol. El incremento en NADH se determinó midiendo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm. Se procedió siguiendo las instrucciones del proveedor.

## 4. 6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA.

### 4. 6. 1. Determinación cualitativa de la actividad $\beta$ -galactosidasa.

Se emplearon placas X-gal y placas CM omitiendo el aminoácido utilizado como marcador auxotrófico (apartado 2.2) suplementadas con 1 ml por cada 500 ml de placas del compuesto cromogénico X-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) al 2% en dimetilformamida.

Las colonias que poseían actividad  $\beta$ -galactosidasa se identificaron por la aparición de color azul en el medio.

### 4. 6. 2. Determinación cuantitativa de la actividad $\beta$ -galactosidasa.

Se utilizó el método de Guarente (1983) con ligeras modificaciones para adaptarlo a los diferentes preparados enzimáticos utilizados. La actividad enzimática se midió siguiendo la liberación de o-nitrofenol (ONP) a partir del sustrato sintético o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG).

Para medir la actividad en células libres, se dosificó en tubos de ensayo una cantidad de suspensión celular entre 1-5 ml, se centrifugó 5 minutos a 3.000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado una vez con tampón Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40 mM, KCl 10 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,6 mM y 2,7 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol por litro de disolución, pH 7), resuspendiéndose posteriormente en 2 ml del mismo. A continuación, se le añadieron 110  $\mu\text{l}$  de cloroformo y 170  $\mu\text{l}$  de SDS al 0,1%. Se agitó fuertemente en *vortex* durante 15 segundos y se preincubó a 30°C durante

5 minutos al cabo de los cuales se añadieron 440  $\mu\text{l}$  de la solución de sustrato (4 mg/ml de ONPG en agua destilada) y se dejó que la reacción se desarrollase, a la misma temperatura, en un baño con agitación hasta la aparición del color amarillo característico del producto.

A partir de este momento, se sacaron dos alícuotas de 1 ml a intervalos de tiempo controlados desde la adición del sustrato. La reacción se detuvo añadiendo dichas alícuotas sobre 0,5 ml de carbonato sódico 1 M contenidos en un tubo *eppendorf*.

La mezcla se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos para separar las células. En el sobrenadante, se determinó espectrofotométricamente el o-nitrofenol liberado, por medida de la absorbancia a 420 nm. La concentración se calcula usando un coeficiente de extinción molar de 4.500 l/mol x cm (Inchaurredo *et al.*, 1994).

Para la cuantificación de la actividad en un medio sin células, se procedió del mismo modo que para las células libres pero, en este caso, en lugar de la suspensión celular, se añadió un volumen de 100-300  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo libre de células directamente sobre el tampón Z y se prescindió de añadir los agentes permeabilizantes cloroformo y SDS.

Se definió la **Unidad Enzimática (U.E.)** como la cantidad de enzima que libera un  $\mu\text{mol}$  de o-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo. Las unidades se dan como U.E./ml de medio de cultivo, U.E./mg de proteína o U.E./g de soporte en el caso de los cultivos en estado sólido.

#### **4. 7. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE PROTEASAS.**

Se utilizó el método de Barker y Worgan (1981) consistente en la valoración de la tirosina liberada por la acción de las proteasas sobre una solución de caseína.

Se mezclaron 0,5 ml de tampón fosfato 0,4 M pH 6 con 1ml de una solución de caseína al 1% (p/v) en NaOH 0,02N y 0,5 ml de muestra problema, y se incubaron a 30°C durante 10 minutos.

Se detuvo la reacción añadiendo 3 ml de una solución acuosa de ácido tricloroacético al 5% (p/v), se agitó y se dejó reposar 5 minutos. Se centrifugó o filtró. A 0,5 ml del sobrenadante o filtrado se le añadieron 2,5 ml de una solución alcalina (20 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 4 g de NaOH, para un litro). Transcurridos 10 minutos se añadieron 0,25 ml del reactivo de Folin y Ciocalteu con un contenido ácido 1N (solución comercial diluida 1:1 con agua destilada), agitando el conjunto. Al cabo de 1 hora se midió la absorbancia a 750 nm.

El calibrado se realizó a partir de una solución de tirosina (1mg/ml) en HCl 0,01 N.

#### **5. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.**

##### **5. 1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE RÁPIDA RESOLUCIÓN (FPLC).**

###### **5. 1. 1. Cromatografía de intercambio aniónico.**

Se realizó en un FPLC del tipo *SMART system* (*Pharmacia*). De 50 a 200  $\mu$ l de muestra se aplicaron a una columna de intercambio aniónico

(*MonoQ PC 1.6/5*) equilibrada con trietanolamina 20 mM pH 7,5. La muestra fue de diferentes orígenes: un extracto crudo de levadura a una concentración proteica de unos 12 mg/ml, un preparado comercial de  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* (*Maxilact LX-5.000*, *Gist Brocades*) o fracciones con actividad  $\beta$ -galactosidasa recogidas en pasos cromatográficos previos. La elución se realizó con un gradiente de 0 a 50% de NaCl 1M en trietanolamina 20 mM pH 7,5 en 20 minutos y, por último, 5 minutos de 100% de este último tampón con el fin de eliminar las proteínas que hubiesen quedado unidas a la matriz. Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C, presión constante y a un flujo de 100  $\mu$ l/min, recogién dose fracciones de 100  $\mu$ l por tubo y determinándose la  $A_{280}$ .

A continuación se midió actividad  $\beta$ -galactosidasa en las fracciones, tras lo cual se mezclaron cuidadosamente aquellas fracciones que presentaban una mayor actividad y se concentraron cuando fue necesario en sistemas de microultrafiltración de corte 100.000 ó 10.000 Da (*Amicon Microcon-100YM*), o se cargaron directamente en un gel de PAGE.

### 5. 1. 2. Cromatografía de exclusión en gel.

Como en el caso anterior se realizó en un FPLC del tipo *SMART system*. Se empleó la columna de exclusión molecular *Superose 12 PC 3.2/30* equilibrada con fosfato sódico 50 mM, pH 7,0 y NaCl 0,15 M, a la que se aplicaron de 50 a 200  $\mu$ l de muestra. Se realizó a 4°C, presión constante y a un flujo de 40  $\mu$ l/min. Se recogieron alícuotas de 100  $\mu$ l, determinándose la  $A_{280}$  y la actividad  $\beta$ -galactosidasa, y se concentró la muestra cuando fue requerido en sistemas de microultrafiltración.

Para la determinación del peso molecular de las proteínas la columna fue calibrada usando los siguientes patrones de pesos moleculares (*Sigma*):

el hexámero (545 kDa) y el trímero (272 kDa) de la ureasa de judía y el dímero (132 kDa) y el monómero (66 kDa) de la albúmina de suero bovino.

## **5. 2. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.**

Se utilizó una columna de 5 ml de agarosa sustituida con p-Aminofenil-1-thio- $\beta$ -D-galactopiranosido (*Sigma*). El piranosido es el sustrato análogo para la  $\beta$ -galactosidasa.

La columna, antes de aplicar 1 ml de muestra, se equilibró con tampón fosfato 50 mM, la elución se realizó con borato sódico 0,1 M pH 10,1 (Nader de Macías *et al.*, 1983) a un flujo constante de 100  $\mu$ l/min y en cámara fría (4°C). Se recogieron fracciones de 1 ml por tubo, neutralizándose el pH para evitar la desnaturalización de la muestra y se determinaron aquellas con mayor actividad, concentrándose y desalinizándose en sistemas de microultrafiltración.

## **6. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.**

### **6. 1. PRODUCCIÓN DE SUERO HIPERINMUNE EN RATONES Y CONEJOS.**

#### **6. 1. 1. Obtención de anticuerpos contra la $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*.**

Se obtuvieron anticuerpos tanto en conejo como en ratones. Para la obtención de suero hiperinmune en ratones se inyectaron intraperitonealmente 50  $\mu$ g del antígeno, un preparado comercial de  $\beta$ -

galactosidasa de *K. lactis* (*Maxilact LX-5.000*, *Gist-Brocades*), emulsionado 1:1 (v/v) con adjuvante completo de Freund (volumen final 0,2 ml). Transcurridos 21 días se procedió a una reinmunización con 50 µg de antígeno (volumen final 125 µl) por vía intravenosa a través del seno retrobulbar. Al cabo de 2 semanas se procedió al sangrado del animal por la misma vía. El suero recogido siguió el mismo tratamiento que en el caso del suero de conejo.

La obtención de anticuerpos en conejo se realizó siguiendo la técnica de Vaitukaitis (1981). En este caso, se utilizó como antígeno la β-galactosidasa de *K. lactis* purificada mediante electroforesis, en un gel de poliacrilamida al 10% a partir del preparado comercial *Maxilact*; la banda correspondiente a la enzima (de un tamaño de 124 kDa) fue cortada, disgregada mecánicamente y emulsionada 1:1 (v/v) con adyuvante completo de Freund mediante tratamiento con ultrasonidos. La solución se consideró emulsionada cuando al añadir una gota de la emulsión sobre agua no se dispersaba.

A un conejo de unos 2-3 kg de la raza California se le rasuró el dorso e inyectó intradérmicamente 3-5 ml de la emulsión que contenía 50 µg de proteína total en unos 30-50 puntos a distancias iguales (dosis de 0,1 ml aproximadamente). Transcurridos unos 2 meses se procedió a una reinmunización con 50 µg de la misma banda proteica pero electroeluida del gel de SDS-PAGE (apartado 3.5.3.2), mediante una inyección intravenosa en la vena marginal de la oreja.

Al cabo de 2 semanas de la reinmunización, se sangró el animal a través de la vena marginal de la oreja. Se dejó coagular la sangre durante 1 hora a temperatura ambiente. Se despegó el coágulo obtenido de la pared del tubo y se mantuvo a 4°C hasta que se observó la presencia de suero. Se



recogió el suero con una pipeta y se centrifugó a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos para eliminar los eritrocitos. Se recogió el sobrenadante (suero) que se mezcló con igual volumen de glicerol y se mantuvo congelado a -20°C. La presencia de inmunoglobulinas se confirmó mediante la técnica de inmunodifusión simple de Ouchterlony en geles de agarosa.

Para evitar reacciones inespecíficas, tanto los antisueros de ratón como los de conejo fueron adsorbidos durante 24 horas a 4°C con un volumen igual de un extracto proteico de una cepa de *K. lactis* deficiente en  $\beta$ -galactosidasa (MW190-9B) obtenido mediante disrupción con ultrasonidos (apartado 3.4.2.).

#### **6. 1. 2. Obtención de anticuerpos contra la $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis*.**

La obtención de suero hiperinmune en ratones y en conejos se realizó del mismo modo que en el apartado anterior pero utilizando como antígeno, tanto en la primera inyección como en la reinmunización, 100  $\mu$ g de un preparado comercial de  $\beta$ -galactosidasa purificada de *K. fragilis* (*Sigma*).

#### **6. 2. INMUNODIFUSIÓN DE OUCHTERLONY.**

Tanto para comprobar la presencia de anticuerpos como para determinar el grado de homología entre distintos antígenos se llevaron a cabo inmunodifusiones en geles de agarosa según la técnica descrita por Pritchard *et al.*, (1984). Para ello, se preparó una solución de agarosa al 1% en tampón Tris-ClH 0,2 M pH 8,3 conteniendo PEG 6.000 al 3% y azida

sódica al 0,01%. Se disolvió la agarosa en un microondas hasta que comenzó a hervir. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 50°C y se vertió en un portaobjetos formando una película delgada. Una vez solidificada la agarosa se formaron pocillos circulares de 0,5 cm de diámetro con ayuda de una pipeta Pasteur, de los cuales uno se dispuso en el centro y los otros periféricamente a éste, a una distancia de aproximadamente 1 cm, donde se introdujeron unos 20 µl de las soluciones de los antígenos y los antisueros. La difusión se dejó transcurrir durante 24-48 horas a 37°C en una cámara húmeda consistente en una placa *petri* cerrada, en cuyo interior se colocó un papel de filtro humedecido. La reacción positiva se manifestó mediante la aparición de un arco de precipitación entre los pocillos que contienen los antígenos y los antisueros.

### 6. 3. ENZIMOINMUNOENSAYO (*ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY. ELISA*).

Se realizó siguiendo la técnica descrita por Iglesias *et al.*, (1993). Extractos de levadura conteniendo β-galactosidasa preparados mediante lavados de las células en TBS (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4), tratamiento con ultrasonidos (60 W en pulsos de 30 segundos) durante 10 minutos en hielo y posterior centrifugación durante 10 minutos a 10.000 r.p.m., se unieron a placas de microtitulación de PVC (0,5-2 µg de proteína por pocillo) en 100 µl/pocillo de tampón carbonato-bicarbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,015 M, HNaCO<sub>3</sub> 0,035 M, pH 9,6) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron las placas tres veces con TBS y se bloquearon durante dos horas a 37°C con una solución de leche descremada en polvo al 5% en TBS conteniendo Tween 20 al 0,2% (TBS-Tween). Las placas se

incubaron durante dos horas a 37°C con el antisuero diluido en TBS-Tween conteniendo leche descremada en polvo al 1%, se lavaron 5 veces durante 5 minutos con Tween al 0,05% en TBS y se incubaron con el segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina (Ig) de ratón conjugado a peroxidasa (*Dakopatts*) diluido en TBS-Tween con PEG 6.000 al 3%. Por último, se realizaron 5 lavados de cinco minutos con TBS y se incubó con 100  $\mu$ l de 1,2-benzenodiamina (*Sigma*) al 0,04% y 0,001% de peróxido de hidrógeno en tampón fosfato-citrato (pH 5,0). La reacción se paró a los 20 minutos tras añadir 25  $\mu$ l de ácido sulfúrico 3N. Se determinó la  $A_{492}$  en un lector de placas de microtitulación (*Titertek Muliskan, Labsystems, Finlandia*).

#### 6. 4. INMUNOTRANSFERENCIA (*WESTERN-BLOT*).

Una vez realizada la electroforesis en SDS-PAGE (apartado 3.5.3.1) se lavó el gel en agua destilada para eliminar el tampón de electroforesis. Posteriormente, se sumergió el gel en tampón de transferencia (Tris 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0,037%, Metanol 20%) al igual que la membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,2  $\mu$ m). Para la transferencia se utilizó un aparato *Trans-Blot* semiseco (*BioRad*), se colocaron 10 trozos de papel de filtro previamente embebidos en tampón de transferencia, a continuación se colocó la membrana de nitrocelulosa, sobre ésta el gel de poliacrilamida y, finalmente, otros 10 trozos de papel de filtro. Se eliminaron las burbujas mediante una varilla de vidrio. Las proteínas se electrotransfirieron acoplado el *trans-blot* a una fuente de alimentación. Las condiciones de la transferencia fueron: voltaje constante de 15 V (se alcanzaron inicialmente amperajes altos -0,9 A- pero aproximadamente a

los 5-15 minutos, el amperaje comenzó a bajarse, hasta mantenerse alrededor de 0,3 A). En estas condiciones, el tiempo de transferencia fue de unos 60 minutos.

Al finalizar la transferencia, se retiró la membrana de nitrocelulosa y se lavó con agua destilada. A continuación se tiñó la membrana durante unos 10 minutos con *Ponceau S* al 0,2% y ácido tricloroacético al 3% para verificar la transferencia de las proteínas. Seguidamente, se lavó con agua destilada hasta que se eliminó el fondo rojo y se pudieron observar perfectamente las bandas polipeptídicas.

Para evitar las uniones inespecíficas de anticuerpos a la membrana a la que se transfirieron, las proteínas se incubaron durante 2 horas en tampón TBS (Tris-HCl 0,3% pH 8, NaCl 0,8%, KCl 0,02%) con Tween 20 al 0,2% y 5% de leche descremada.

Se incubó la membrana con el primer anticuerpo (suero de ratón o conejo inmunizado con  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*) diluido 1:500 en el caso del suero de ratón y 1:250 en el caso del suero de conejo, durante 90-120 minutos con agitación a temperatura ambiente.

Tras la incubación se lavó 5 veces con TBS Tween 20 0,2%, 5 minutos cada lavado y a continuación se trató con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa a una dilución 1:2.000 para el caso del anticuerpo anti-Ig de conejo (*Sigma ImmunoChemicals*) o 1/1.600 para el caso del anti-Ig de ratón (*Dakopatts*), en TBS Tween 20 al 0,2% durante 90 minutos. Se procedió a un nuevo lavado con TBS y se reveló. El color de la reacción se desarrolló utilizando, como sustrato de la peroxidasa,  $H_2O_2$  al 0,03% en presencia de diaminobencidina disuelta en Tris-HCl 50 mM pH 7,6 y cloruro de níquel al 0,03%, durante 2-5 minutos. La reacción

se detuvo introduciendo la membrana en tampón TBS o añadiendo abundante agua destilada.

## 7. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Se realizó siguiendo la técnica descrita por Leiro *et al.*, (1996). Las levaduras en fase exponencial de crecimiento en medio YPL fueron recogidas mediante centrifugación (5 minutos a 5.000 r.p.m.), lavadas dos veces con tampón PBS (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7,4) y fijadas durante 60 minutos en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2, conteniendo glutaraldehído al 0,1%, formaldehído al 4% y ácido pícrico al 0,02%. Tras la fijación, las levaduras se lavaron dos veces en PBS, se deshidrataron en etanol y se embebieron en la resina *LR White* (*London Resin Company Limited*) a 50°C. Cortes finos de la inclusión se recogieron sobre una rejilla de níquel de malla 200 y se incubaron posteriormente a temperatura ambiente durante 90 minutos en TBS conteniendo 5% de leche descremada y Tween 20 al 0,2% y durante 120 minutos en suero de ratón inmunizado con la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* diluido 1:10 en TBS con 1% de leche descremada y 0,2% de Tween 20. Se realizaron controles reemplazando el suero inmunizado por suero de ratón sin inmunizar. Después de la incubación, las rejillas fueron lavadas tres veces con TBS con Tween 20 al 0,05% y tres veces con TBS. Tras los lavados, se incubaron 60 minutos con el segundo anticuerpo, suero de conejo inmunizado con IgG de ratón conjugado con oro (diámetro de la partícula de oro de 10 nm; *Sigma Chemical, St Louis, USA*) diluido 1/25. Posteriormente, las rejillas se lavaron con TBS y agua destilada, se tiñeron

con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión *Philips CM 12* a 80 kV.

## 8. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Se diseñó un plan factorial completo para estudiar la influencia combinada de tres variables en la producción de  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* en cultivos en estado sólido. Se determinó el punto óptimo de acuerdo con el método de la máxima pendiente (Box *et al.*, 1989).

## 9. PROGRAMAS INFORMÁTICOS.

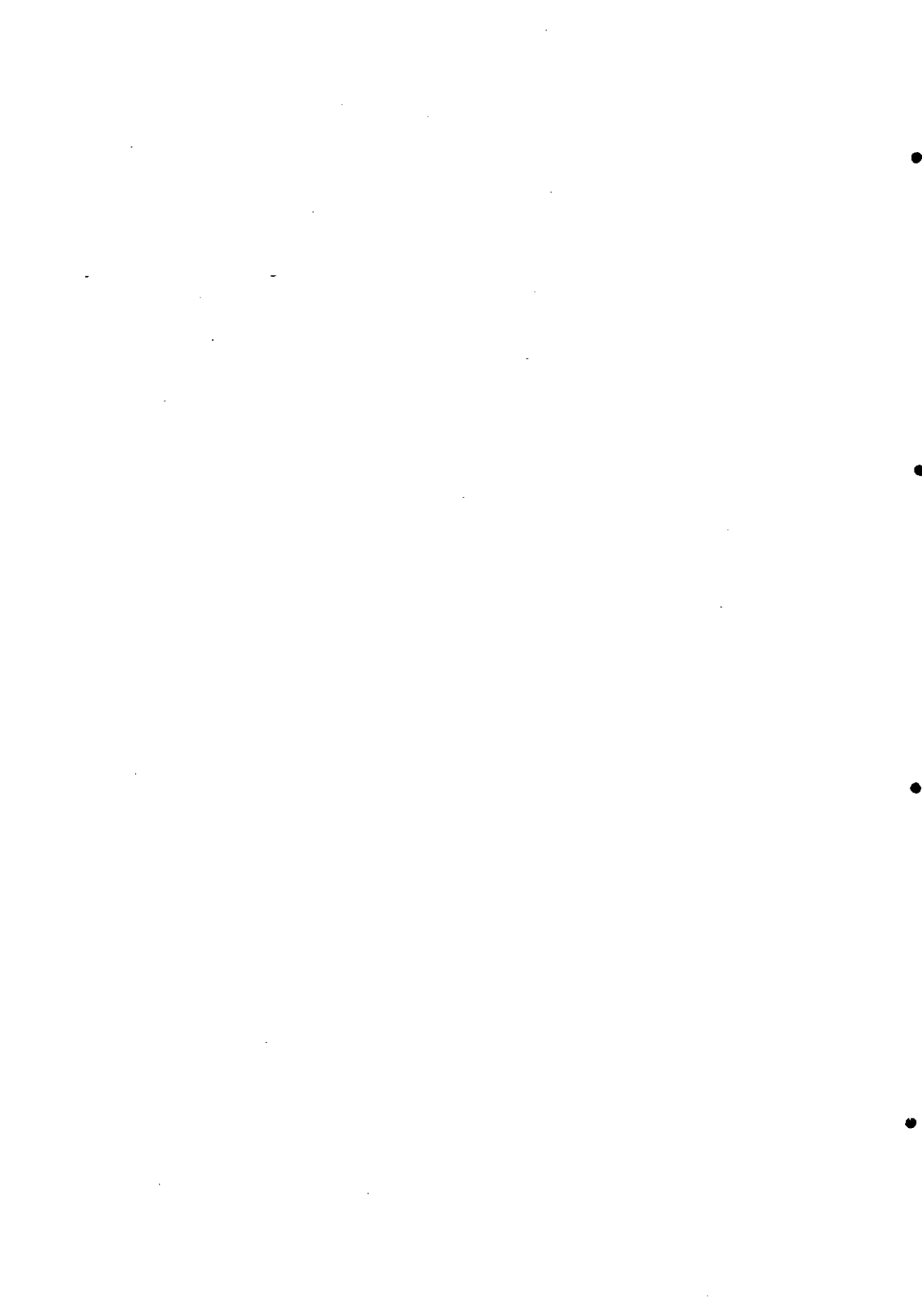
### **Análisis de la secuencia.**

El alineamiento múltiple de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*, *E. coli* y *Aspergillus niger* se realizó mediante el programa *CLUSTAL V* (Higgins *et al.*, 1992).

Para el análisis de los aminoácidos ácidos y básicos de las  $\beta$ -galactosidasas de *K. lactis* y de la *A. niger* se utilizó el programa *DNA<sup>TM</sup> Strider 1.2* (Christian Marck. *Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire. Bât. 142. Centre d'Etudes de Saclay. 91191 Gif-sur-Yvette. France*).

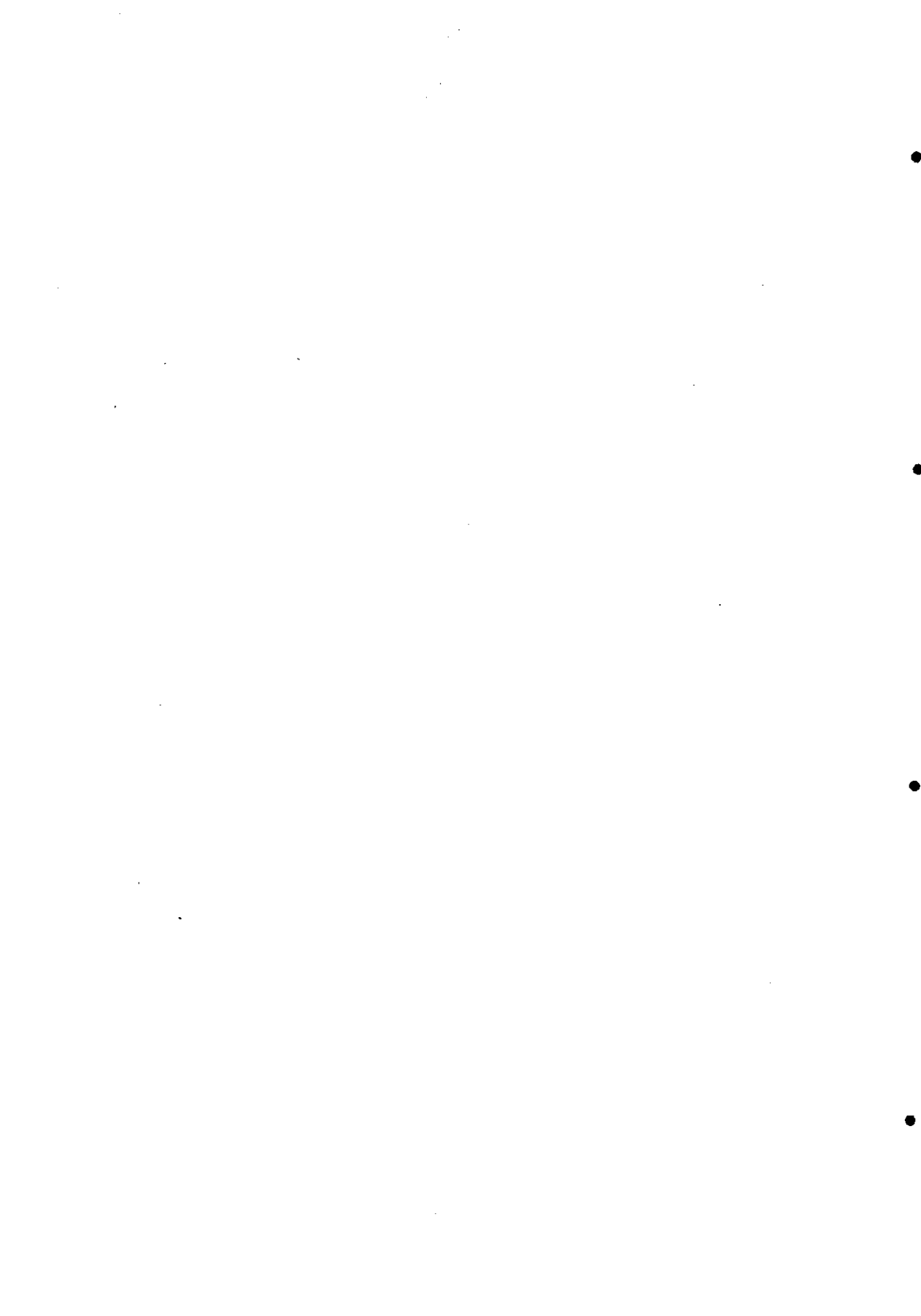
### **Análisis estadístico.**

Los cálculos estadísticos se realizaron con la ayuda del programa informático *StatGraphics Plus* para *Windows* (*Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation*) versión 2.1.



## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**





# 1. PURIFICACIÓN DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces lactis*.

Dados los objetivos planteados en la presente Tesis, se hizo necesaria la puesta a punto de un método eficaz, rápido y reproducible de purificación de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*, que nos permitiese, por ejemplo, usar la proteína purificada como antígeno para inducir anticuerpos específicos, con los cuales, posteriormente, poder detectar la enzima secretada. Se ensayaron varios procedimientos de purificación buscando un método sencillo de obtención de la enzima purificada en un único paso y minimizando al máximo posible la cantidad de extracto crudo necesario.

## 1. 1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO.

La ruptura celular constituye el primer paso en el aislamiento de materiales intracelulares. Presenta una influencia considerable no sólo sobre la cantidad total de proteína recuperada, sino también sobre su actividad biológica, su asociación con otros componentes celulares y la posible presencia de degradación proteolítica y contaminantes que pueden influir en los siguientes pasos de purificación (Millard y Charles, 1990).

Existen varios métodos que se pueden utilizar para la ruptura celular y liberación de componentes intracelulares de levaduras, presentando cada uno de ellos diferentes ventajas e inconvenientes, como la homogenización (Dickson *et al.*, 1979; Kengen *et al.*, 1993; Brady *et al.*, 1995; Ismail *et al.*, 1997), la sonicación (Itoh *et al.*, 1982; Nader de Macías *et al.*, 1983; Lind *et al.*, 1989; Fujimoto *et al.*, 1998) o la extracción química (Fenton, 1982; Stred'anský *et al.*, 1993; Domingues *et al.*, 1997; Somkuti y Holsinger,

1997). Estos procedimientos ejercen un efecto importante sobre el rendimiento y la calidad del extracto proteico obtenido.

Con el objetivo de obtener una recuperación buena de proteínas intracelulares y una calidad de la muestra adecuada para posteriores pasos de purificación, se ha comparado la eficiencia de distintos métodos para la preparación de extractos crudos de proteínas de la levadura *K. lactis*.

### 1. 1. 1. Extracción con solventes.

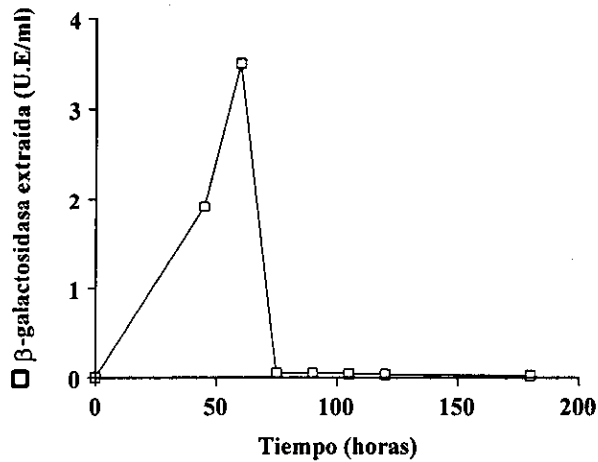
Se estudió el efecto de la liberación a diferentes intervalos de tiempo de la  $\beta$ -galactosidasa de las células mediante extracción con cloroformo al 1%. La actividad medida extracelularmente fue máxima a los 60 minutos, comenzando a decaer bruscamente poco después (Figura 1.1). En este punto, el porcentaje de actividad liberada en el tampón con respecto a la actividad intracelular fue aproximadamente del 1%. Como este porcentaje fue muy bajo y existían datos en la bibliografía acerca de la liberación de  $\beta$ -galactosidasa de otras levaduras mediante la utilización de otros solventes (Fenton, 1982), se decidió emplear otros compuestos (metanol, etanol, isopropanol y t-butanol) para mejorar la extracción.

Los mejores resultados se obtuvieron con metanol después de 21 horas y con etanol y t-butanol después de 5 horas (Tabla 1.1).

Tabla 1. 1. Efecto de diferentes solventes sobre la liberación de la  $\beta$ -galactosidasa.

Solvente	5 Horas	21 Horas
t-Butanol	9,44	0,27
Etanol	9,30	5,31
Metanol	1,74	15
Isopropanol	0,70	3,50

Los resultados se expresan como porcentajes de la actividad liberada con respecto a la actividad intracelular.



**Figura 1. 1:** Efecto del tiempo de incubación con cloroformo al 1% sobre la extracción de la  $\beta$ -galactosidasa. Se dan los valores absolutos de  $\beta$ -galactosidasa en el medio.

### 1. 1. 2. Extracción por procedimientos mecánicos.

Se ensayaron diferentes métodos de ruptura celular mecánica. La extracción mediante agitación vigorosa (*vortex*) dio como resultado una liberación proteica de 0,12 mg/ml presentando una actividad  $\beta$ -galactosidasa de 0,61 U.E. El porcentaje de actividad liberada con respecto a la intracelular fue del orden del 1%. Se obtuvo un resultado similar cuando las células fueron tratadas de una manera idéntica, pero con 0,2 g de perlas de vidrio. Los mejores resultados se alcanzaron mediante sonicación, obteniendo de 20 a 110 veces más proteína y de 400 a 25.000 veces más actividad que en los otros dos procedimientos mecánicos (Tabla 1.2). En este caso el porcentaje de actividad liberada llegó hasta el 64%.

Como las bacterias son más sensibles al tratamiento con ultrasonidos que las levaduras, se estudió la posibilidad de obtener la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* mediante la sonicación de transformantes bacterianos, lo que

podría facilitar la recuperación de la proteína y su posterior purificación. Para ello, se transformó una cepa de *Escherichia coli* deficiente en  $\beta$ -galactosidasa con el plásmido pLX8 (Figura 3.2), que contiene el gen *LAC4* (que codifica la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*) con su región promotora. La cantidad de proteína obtenida mediante sonicación de estos transformantes bacterianos fue de 4 a 25 veces mayor que la conseguida en el caso de las levaduras; sin embargo, la actividad  $\beta$ -galactosidasa fue de 50 a 242 veces inferior (Tabla 1.2). Este hecho es atribuible a que la producción heteróloga de  $\beta$ -galactosidasa en bacterias no es tan efectiva como la producción natural en la levadura *K. lactis*.

**Tabla 1. 2:** Efecto comparativo de la extracción proteica obtenida mediante las diferentes técnicas de extracción mecánica ensayadas.

Método	Proteína (mg/ml)	$\beta$ -galactosidasa (U.E.)
Vortex	0,12	0,61
Perlas de Vidrio	0,10	0,95
Sonicación	12	25,398
Sonicación*	50	105,33

Se indican los mejores resultados obtenidos en cada tratamiento. \*Resultados de la extracción mediante sonicación de células de *E. coli* transformadas con el plásmido pLX8.

Con el objetivo de mejorar los resultados obtenidos mediante sonicación, se prepararon extractos de *K. lactis* en diferentes condiciones. Se trataron con ultrasonidos células procedentes de cultivos con diferentes valores de absorbancia a 600 nm, midiendo la cantidad de proteína y de actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenida. Ambos parámetros parecen ser aproximadamente proporcionales a la absorbancia inicial, alcanzando un máximo de proteína y de actividad enzimática cuando las células están próximas a una absorbancia de 2, decreciendo posteriormente (Figura 1.2).

Cuando se usaron células provenientes de diferentes volúmenes de cultivo (de 0,5 a 1 litro) pero con la misma absorbancia se obtuvieron

resultados similares en todos los casos, siendo las diferencias menores del 4,5%. Aparentemente la eficiencia de la sonicación no viene influenciada por la densidad celular en este rango. El estado fisiológico de las células en el momento del tratamiento con ultrasonidos parece ser un factor determinante.

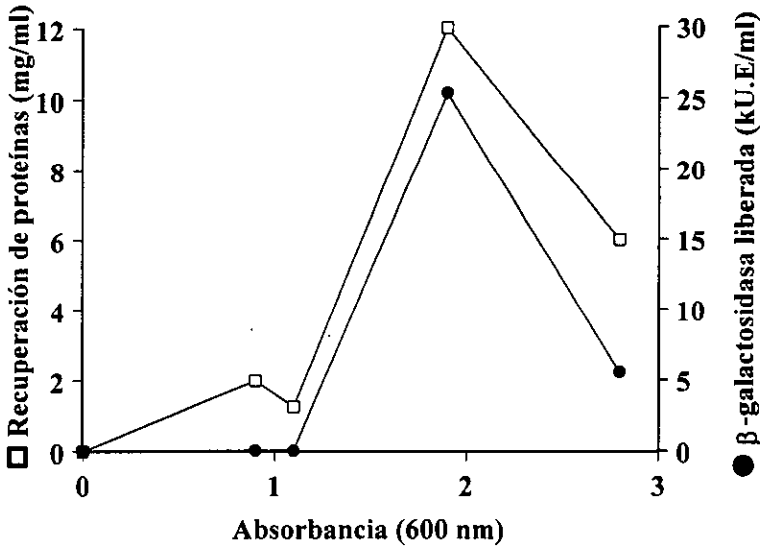
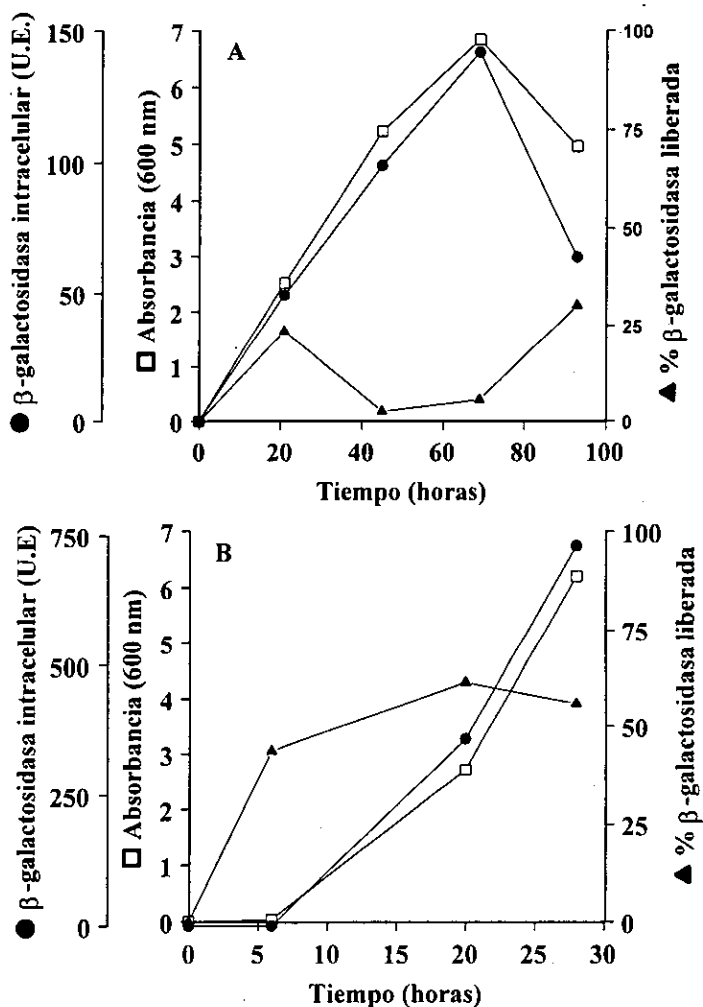


Figura 1. 2: Efecto de la fase de crecimiento sobre la liberación de proteínas y recuperación de  $\beta$ -galactosidasa por el procedimiento de sonicación. Las células se recogieron a diferentes  $A_{600}$  y se lisaron mediante ultrasonidos.

### 1. 1. 3. Extracción con enzimas.

Con la intención de estudiar el procedimiento de extracción con liticasa se usaron células creciendo en dos medios diferentes. El porcentaje de actividad liberada comparado con la actividad intracelular alcanzó un 24% para células creciendo en un medio con glucosa (YPD) (Figura 1.3 A), mientras que para las células creciendo en un medio con un inductor de la  $\beta$ -galactosidasa, la lactosa (YPL), el porcentaje fue superior, cerca del 61%

en el punto de máxima recuperación (Figura 1.3 B). En ambos casos, se tomaron muestras por triplicado en el punto de máxima recuperación, obteniendo un porcentaje medio de  $23,5 \pm 4$  y  $61,4 \pm 31$ , respectivamente. Como en la extracción mediante sonicación, las células recogidas durante la fase de crecimiento exponencial fueron más sensibles al tratamiento con liticosa.



**Figura 1. 3:** Porcentaje de  $\beta$ -galactosidasa liberada después del tratamiento enzimático. Las células creciendo en YPD (A) y en YPL (B) fueron tratadas con liticosa. Se dan los datos del porcentaje de actividad liberada en el medio con respecto a la actividad intracelular.

Un importante inconveniente de la extracción enzimática, además del alto costo del tratamiento enzimático y de la introducción de proteínas que pueden producir un problema en los siguientes pasos de purificación, fue que durante la incubación con liticasa se produjo una pérdida de aproximadamente un 36% de la actividad  $\beta$ -galactosidasa total.

El estado fisiológico de las células y las condiciones de crecimiento en el momento de la extracción ejercen un importante efecto sobre la cinética de ruptura celular. Los mejores porcentajes de actividad extracelular obtenidos, tanto por sonicación como por extracción enzimática, se consiguieron en la fase de crecimiento exponencial. Las células creciendo más rápido son más fáciles de romper que las que crecen más lentamente, ya que dirigen la energía disponible hacia la división más que hacia la síntesis o fortalecimiento de la pared celular (Keshavarz *et al.*, 1987). Esto explicaría porqué las células de *K. lactis* creciendo de una manera rápida con lactosa en el medio dan un porcentaje mayor de actividad enzimática liberada después del proceso de extracción con enzimas que las células creciendo de una manera más lenta en un medio con glucosa.

La extracción mediante ultrasonidos resultó la técnica más efectiva para la recuperación de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*. Por tanto, con los extractos obtenidos mediante tratamiento con ultrasonidos se realizó el proceso de purificación.



## 1. 2. PURIFICACIÓN DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *K. lactis*.

La  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* es una enzima con un interés notable en biotecnología, como se ha comentado en la introducción, sin embargo, existen algunas características bioquímicas que todavía no han sido bien establecidas. El primer intento de purificación de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* data del año 1968 por Biermann y Glantz. Desde entonces, se han publicado varios artículos en relación con la purificación de esta enzima de *K. lactis*, a partir tanto de extractos de proteína crudos como de diferentes preparaciones comerciales (Dickson *et al.*, 1979; Mbuyi-Kalala *et al.*, 1988; Cavaille y Combes, 1995; Becerra *et al.*, 1998 a y b).

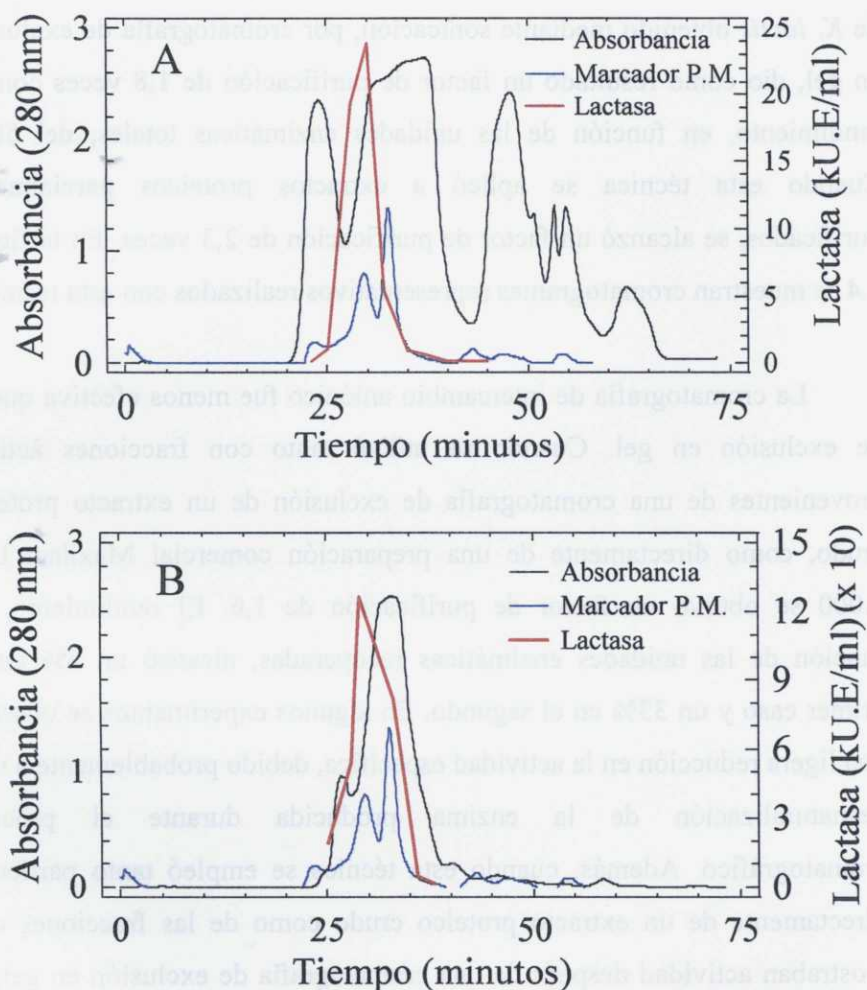
No solo se ha intentado la purificación de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* sino que se han hecho notables esfuerzos en la purificación de esta enzima en diferentes microorganismos: *Beauveria bassiana* (MacPherson y Khachatourians, 1991), *Aspergillus fonsecaeus* (González y Monsán, 1991), *Aspergillus nidulans* (Ríos *et al.*, 1993), *Pyrococcus furiosus* (Kengen *et al.*, 1993), *Kluyveromyces marxianus* (Brady *et al.*, 1995), *Mucor pusillus* (Ismail *et al.*, 1997), *Tritrichomonas foetus* (Vella y Greenwell, 1997), *Achatina achatina* (Leparoux *et al.*, 1997), *Bacillus circulans* (Fujimoto *et al.*, 1998).

En nuestro caso la purificación de la  $\beta$ -galactosidasa se realizó empleando tanto un extracto crudo de proteína de levadura como una preparación comercial de  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* (Maxilact LX-5.000, Gist-Brocades) mediante dos procedimientos diferentes: cromatografía líquida de rápida resolución (FPLC), usando columnas de exclusión en gel y de intercambio aniónico, por separado y conjuntamente, y cromatografía de afinidad.

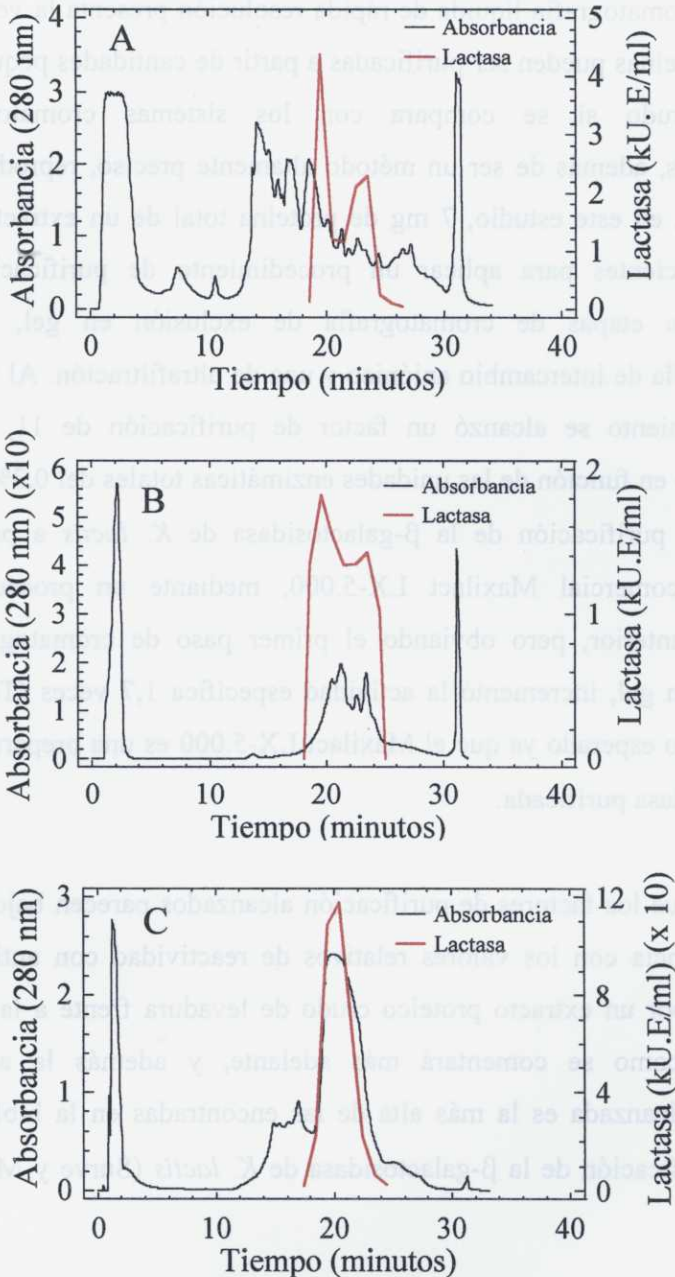
### 1. 2. 1. Cromatografía líquida de rápida resolución.

La purificación de la  $\beta$ -galactosidasa, de un extracto proteico crudo de *K. lactis* obtenido mediante sonicación, por cromatografía de exclusión en gel, dio como resultado un factor de purificación de 1,8 veces con un rendimiento, en función de las unidades enzimáticas totales, del 50%. Cuando esta técnica se aplicó a extractos proteicos parcialmente purificados, se alcanzó un factor de purificación de 2,3 veces. En la figura 1.4 se muestran cromatogramas representativos realizados con esta técnica.

La cromatografía de intercambio aniónico fue menos efectiva que la de exclusión en gel. Cuando se utilizó tanto con fracciones activas provenientes de una cromatografía de exclusión de un extracto proteico crudo, como directamente de una preparación comercial Maxilact LX-5.000 se obtuvo un factor de purificación de 1,6. El rendimiento, en función de las unidades enzimáticas recuperadas, alcanzó un 8% en el primer caso y un 33% en el segundo. En algunos experimentos se observó una ligera reducción en la actividad específica, debido probablemente a una desnaturalización de la enzima producida durante el proceso cromatográfico. Además, cuando esta técnica se empleó tanto partiendo directamente de un extracto proteico crudo como de las fracciones que mostraban actividad después de una cromatografía de exclusión en gel, el perfil de la actividad enzimática mostró repetidamente dos picos, mientras que cuando se partió de Maxilact LX-5.000 sólo se observó un único pico de actividad (Figura 1.5).



**Figura 1. 4:** Perfiles de proteína y de actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenidos después de una cromatografía de exclusión en gel. (A) Cromatograma de 2,4 mg de un extracto crudo de *K. lactis*. (B) Cromatograma de 3 mg de extractos parcialmente purificados de Maxilact LX-5.000. Se muestra el perfil de los marcadores de peso molecular usados para la calibración. Los valores de absorbancia de los marcadores están multiplicados por 100.



**Figura 1. 5:** Perfiles de proteína y de actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenidos tras la cromatografía de intercambio aniónico de: (A) 2,4 mg de proteína de un extracto crudo de *K. lactis*. (B) 0,6 mg de proteína de fracciones con actividad recogidas después de una cromatografía de exclusión en gel de un extracto crudo de levadura. (C) 2,4 mg de proteína de Maxilact LX-5.000.

La cromatografía líquida de rápida resolución presenta la ventaja de que las proteínas pueden ser purificadas a partir de cantidades pequeñas de extracto crudo si se compara con los sistemas cromatográficos tradicionales, además de ser un método altamente preciso, reproducible y rápido. Así, en este estudio, 7 mg de proteína total de un extracto crudo fueron suficientes para aplicar un procedimiento de purificación que incluyó dos etapas de cromatografía de exclusión en gel, una de cromatografía de intercambio aniónico y una de ultrafiltración. Al finalizar el procedimiento se alcanzó un factor de purificación de 11, con un rendimiento en función de las unidades enzimáticas totales del 0,3% (Tabla 1.3 A). La purificación de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* a partir del preparado comercial Maxilact LX-5.000, mediante un procedimiento similar al anterior, pero obviando el primer paso de cromatografía de exclusión en gel, incrementó la actividad específica 1,7 veces (Tabla 1.3 B), resultado esperado ya que el Maxilact LX-5.000 es una preparación de  $\beta$ -galactosidasa purificada.

Aunque los factores de purificación alcanzados parecen bajos, están en consonancia con los valores relativos de reactividad con anticuerpos mostrados por un extracto proteico crudo de levadura frente a la enzima purificada como se comentará más adelante, y además la actividad específica alcanzada es la más alta de las encontradas en la bibliografía para la purificación de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* (Surve y Mahoney, 1994).

**Tabla 1. 3:** Resumen de la purificación de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*. **A:** Partiendo de un extracto crudo de levadura. **B:** Partiendo de la preparación comercial Maxilact LX-5.000 (*Gist-Brocades*).

<b>A</b>					
<b>Etapas</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>kU.E. totales</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Actividad específica (kU.E./mg)</b>	<b>Factor de purificación</b>
<b>Extracto crudo</b>	7,20	15,24	100	2,12	1
<b>Exclusión en gel</b>	2,40	7,43	49	3,87	1,8
<b>Intercambio aniónico</b>	0,10	0,61	4	6,05	2,9
<b>Ultrafiltración</b>	0,06	0,09	0,6	10,09	4,8
<b>Exclusión en gel</b>	0,01	0,05	0,3	23,22	11

<b>B</b>					
<b>Etapas</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>kU.E. totales</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Actividad específica (kU.E./mg)</b>	<b>Factor de purificación</b>
<b>Maxilact</b>	14,40	541,12	100	37,58	1
<b>Intercambio aniónico</b>	3	179,20	33,1	59,73	1,6
<b>Ultrafiltración</b>	3	179,97	33,3	59,99	1,6
<b>Exclusión en gel</b>	0,44	28,10	5,2	63,87	1,7

### 1. 2. 2. Cromatografía de afinidad.

Se utilizó una columna de agarosa sustituida con p-aminofenil-1-thio- $\beta$ -D-galactopiranosido para la purificación en un único paso de la  $\beta$ -galactosidasa tanto a partir de un extracto proteico crudo de *K. lactis* (Figura 1.6) como del Maxilact LX-5.000. En el primer caso (Tabla 1.4 A), se emplearon 12 mg de proteína total, recogiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en una fracción de 1 ml. Se obtuvo una recuperación de proteína de 2,2% con un rendimiento del 5,3% y un incremento en la actividad específica de 2,5 veces. En el segundo caso (Tabla 1.4 B), se partió de 40 mg de proteína total, obteniendo una recuperación de proteína de 2,5%, un rendimiento del 53% y un incremento en la actividad

específica de 2,1 veces. Por tanto, esta técnica resultó más efectiva que la cromatografía de exclusión en gel y de intercambio iónico si se analizan individualmente, e incluso mejor, para el caso del Maxilact LX-5.000, si se comparan juntas. Sin embargo, requiere una cantidad inicial de muestra mayor y más tiempo que las otras dos técnicas comparadas (Tabla 1.5).

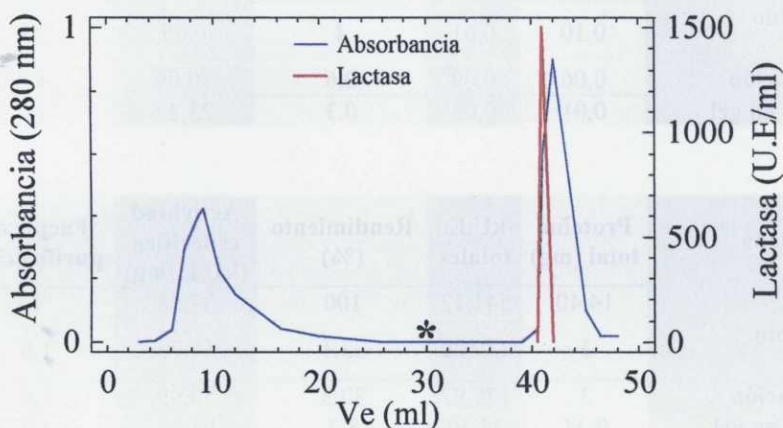


Figura 1. 6: Perfil cromatográfico y de actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenido por cromatografía de afinidad de 12 mg de un extracto crudo de *K. lactis*. El asterisco indica el cambio del tampón de equilibrado (tampón fosfato pH 7) a tampón de elución (tampón borato pH 10).

Tabla 1. 4: Resumen de la purificación de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* por cromatografía de afinidad. A: Extracto crudo. B: Maxilact LX-5.000.

A

Etapa	Proteína total (mg)	kU.E. totales	Rendimiento (%)	Actividad específica (kU.E./mg)	Factor de purificación
Extracto crudo	12	25,4	100	2,12	1
Afinidad	0,26	1,4	5,3	5,30	2,5

B

Etapa	Proteína total (mg)	kU.E. totales	Rendimiento (%)	Actividad específica (kU.E./mg)	Factor de purificación
Maxilact	40	150,31	100	37,6	1
Afinidad	1	79,10	53	79,1	2,1

**Tabla 1. 5:** Tabla comparativa de las diferentes técnicas cromatográficas empleadas a partir de un extracto crudo de *K. lactis*.

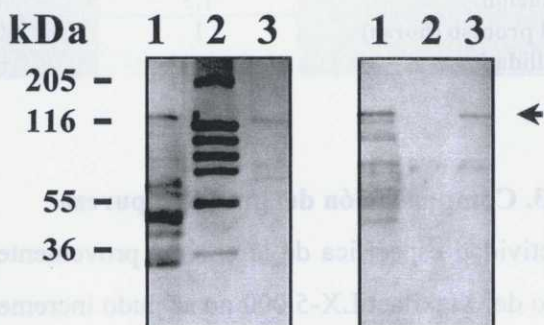
	Exclusión en gel	Intercambio aniónico	Afinidad
<b>Factor de purificación</b>	1,8	1,6	2,5
<b>Rendimiento (%)</b>	50	33	5,3
<b>Cantidad inicial de muestra (mg)</b>	2,4	2,4	12
<b>Factor de dilución</b>	1,5	1,5	1
<b>Duración del proceso (horas)</b>	1	0,5	8
<b>Reproductibilidad</b>	+++	+++	++

### 1. 2. 3. Comprobación del grado de pureza.

La actividad específica de la enzima proveniente tanto de extractos crudos como del Maxilact LX-5.000 no se pudo incrementar de una manera significativa con posteriores purificaciones sin una gran pérdida de proteína, sugiriendo que estos preparados purificados eran homogéneos. El grado de pureza de la  $\beta$ -galactosidasa aislada se comprobó mediante geles de SDS-PAGE y análisis de *western-blot* de la enzima purificada, tanto para el extracto crudo como para el Maxilact LX-5.000 (Figura 1.7), dando como resultado una banda mayoritaria de peso molecular alrededor de 124 kDa, tamaño que coincide con el estimado a partir del único gen clonado para esta enzima en *K. lactis* (Poch *et al.*, 1992). En algunas ocasiones, se observaron otras bandas de menor peso molecular, principalmente en el caso del Maxilact LX-5.000, que son atribuibles probablemente a productos de degradación de la  $\beta$ -galactosidasa ya que su intensidad aumenta cuando disminuye la banda de 124 kDa. Estas bandas se detectaron también en el *western-blot* con anticuerpos contra la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* (tanto con antisueros de conejo como de ratón). Esto ocurrió para las tres técnicas de purificación empleadas en este trabajo. De hecho, una de las dificultades principales encontradas en la purificación fue el aumento de la



inestabilidad de la enzima durante los diferentes pasos de purificación y también de la enzima purificada incluso si se almacenaba en un tampón conteniendo glicerol.



**Figura 1. 7:** Electroforesis en gel SDS-PAGE (izquierda) y western-blot (derecha) de la  $\beta$ -galactosidasa purificada de *K. lactis*. Se indica con una flecha la banda correspondiente a la  $\beta$ -galactosidasa. El western-blot se realizó empleando un suero de ratón inmunizado contra la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*. Calle 1: 75  $\mu$ g de un extracto crudo de *K. lactis*; calle 2: marcador de peso molecular; calle 3: 5  $\mu$ g de  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* purificada por cromatografía de afinidad.

#### 1. 2. 4. Determinación del peso molecular.

Aunque se han realizado muchas investigaciones sobre la producción (Siso, 1994; Becerra y Siso, 1996), el uso (Siso et al., 1992; Siso y Doval, 1994) y ciertas características bioquímicas (Kim *et al.*, 1997; Cavaille y Combes, 1998; Athès y Combes, 1998; Athès *et al.*, 1998) de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*, otras características como su estructura y el número de subunidades no se han descrito con precisión. Así, mientras Dickson *et al.* (1979) purificaron esta enzima de extractos de levadura cultivada en un medio con lactosa y determinaron, a partir del coeficiente

de sedimentación, que estaba compuesta por dos subunidades idénticas de 135 kDa, Mbuyi-Kalala *et al.* (1988) describieron la existencia de cuatro isoenzimas con unos pesos moleculares aparentes de 630, 550, 41 y 19 kDa en una preparación comercial de  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* (Maxilact 40.000). La clonación del único gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*, *LAC4*, (Poch *et al.*, 1992) confirmó que esta enzima estaba compuesta de un único tipo de subunidad o que si se producían las modificaciones en el tamaño de la proteína, eran post-traduccionales. Más recientemente, Cavaille y Combes (1995) purificaron la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* de una preparación comercial y confirmaron los resultados de Dickson *et al.* (1979), ya que ellos también encontraron, en función de los datos obtenidos por cromatografía de exclusión en gel, que la principal forma de la enzima era dimérica pero con un peso molecular, estimado a partir de geles de SDS-PAGE, ligeramente más pequeño, de unos 114 kDa. Como se ha comentado anteriormente, nuestros datos sugieren un peso molecular alrededor de 124 kDa.

A pesar de estos esfuerzos, aún se pueden encontrar varias discrepancias aparentes en la bibliografía en relación con la forma nativa de la proteína. Así, Dickson *et al.* (1979), observaron dos bandas activas en sus electroforesis en condiciones nativas cuando utilizaron el sustrato ONPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido) y una tercera banda activa de mayor peso molecular que sólo apareció cuando las muestras eran incubadas con glicerol (no se determinó el peso molecular de estas bandas). Esta observación fue apoyada más tarde por Surve y Mahoney (1994), quienes también describieron la existencia de dos bandas activas, en geles en condiciones nativas, de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* purificada a partir de una preparación comercial. En aquella ocasión los geles fueron

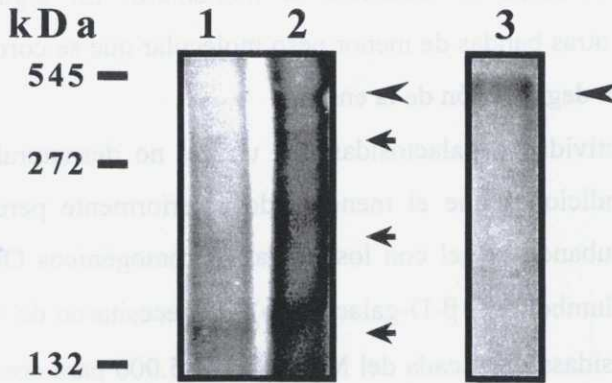
incubados con BNG (6-bromo-2-naftil- $\beta$ -D-galactopiranosido) pero tampoco se determinó el peso molecular de las bandas que mostraron actividad. Por otra parte, aunque Cavaille y Combes (1995) apoyaron la idea de que la proteína era dimérica, describieron la existencia de una banda de unos 400 kDa en geles en condiciones nativas, pero no identificaron qué bandas eran activas en estas electroforesis.

Intentando clarificar esta situación, se realizaron estimaciones del peso molecular en condiciones nativas de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* mediante cromatografía de exclusión en gel y electroforesis en geles no desnaturizantes. La determinación del peso molecular a partir de un extracto crudo por cromatografía de exclusión en gel dio como resultado que la actividad  $\beta$ -galactosidasa estaba confinada en un rango de 140-440 kDa (mostrando un máximo de actividad en los 250 kDa), mientras que para la preparación comercial Maxilact LX-5.000 estaba en un pico entre 130 y 440 kDa (máximo de actividad a los 260 kDa) (Figura 1.4). Cavaille y Combes (1995) describieron para el Maxilact LX-5.000 un perfil proteico similar pero con un rango de peso molecular más estrecho (200-400 kDa). Estos resultados sugieren que la forma activa principal de la enzima es dimérica.

Cuando la  $\beta$ -galactosidasa purificada del Maxilact LX-5.000 se sometió a una electroforesis en condiciones nativas en un gel en gradiente de acrilamida (5-15%) se observaron varias bandas teñidas con azul de Coomassie (Figura 1.8). La concentración relativa de estas bandas fue variable. La banda superior presentó un peso molecular en torno a 483 kDa y las otras de aproximadamente 385, 239 y 146 kDa. Por tanto, estas cuatro bandas parecen corresponderse a diferentes formas de agregación de la  $\beta$ -

galactosidasa desde el tetrámero al monómero. En algunos geles se observaron otras bandas de menor peso molecular que se corresponderían a productos de degradación de la enzima.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa en un gel no desnaturalizante en las mismas condiciones que el mencionado anteriormente pero sin teñir se localizó incubando el gel con los sustratos cromogénicos ONPG, BNG o MUG (metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactósido). Se necesitaron de 40 a 80  $\mu$ g de la  $\beta$ -galactosidasa purificada del Maxilact LX-5.000 para detectar la banda activa después de la electroforesis. Únicamente la banda correspondiente a la forma tetramérica mostró siempre actividad con los dos primeros sustratos (ONPG y BNG) (Figura 1.8). La banda amarilla obtenida con el sustrato ONPG parecía indicar que la forma trimérica también podría ser enzimáticamente activa, pero esto no se pudo determinar con precisión debido a su proximidad a la forma tetramérica. Aunque Surve y Mahoney (1994), como se comentó antes, detectaron dos bandas activas al incubar con el BNG, en nuestro caso la incubación con BNG sólo mostró una banda activa (Figura 1.8). Las bandas teñidas con ONPG dieron una coloración más intensa, pero también fueron menos estables después de almacenar los geles, que las que se obtuvieron con el sustrato BNG. La técnica incubando con MUG fue menos sensible que las otras y no permitió detectar ninguna banda activa.



**Figura 1. 8:** Electroforesis del Maxilact LX-5.000 en un gel en gradiente (5-15%) en condiciones nativas teñido con ONPG y posteriormente con Azul de Coomassie G250 (izquierda) y con BNG (derecha). Se muestran con flechas grandes las bandas que presentaron actividad  $\beta$ -galactosidasa y con flechas pequeñas las diferentes formas de agregación de la  $\beta$ -galactosidasa. Se cargaron diferentes concentraciones del Maxilact LX-5.000, calle 1: 20  $\mu$ g; calle 2: 40  $\mu$ g; calle 3: 80  $\mu$ g.

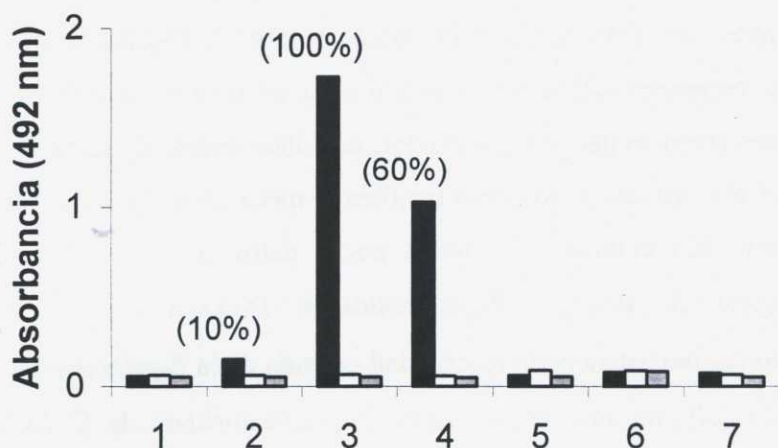
Basándonos en estos resultados y en los de los autores previamente citados, podemos concluir que la enzima puede ser activa tanto en forma de dímero como de tetrámero, sin excluir la posibilidad de que otras formas de agregación puedan ser también activas, y que la preponderancia de una de ellas depende de las condiciones de ensayo. La agregación de la proteína se puede ver favorecida por el gel de poliacrilamida y por la presencia de glicerol en la muestra como sugirió Dickson *et al.* (1979), esto explicaría el hecho de que la actividad se encontró en formas de peso molecular mayores en la electroforesis que en la cromatografía, y en formas de peso molecular ligeramente superiores en el Maxilact LX-5.000 que en extractos crudos. De hecho, el contenido en glicerol del Maxilact LX-5.000 es de 565 g/l (Cavaille y Combes, 1995). De esta manera, se podrían explicar las aparentes discrepancias encontradas en la bibliografía.

### 1. 2. 5. Caracterización inmunológica de la $\beta$ -galactosidasa.

Existen una gran cantidad de estudios sobre la  $\beta$ -galactosidasa de diferentes microorganismos con respecto a su estructura y características bioquímicas (peso molecular, asociación de subunidades, óptimos de pH, estabilidad térmica, etc.), así como también al mecanismo de inducción de esta enzima. Sin embargo, se tienen pocos datos sobre las relaciones inmunológicas de distintas  $\beta$ -galactosidasas. Dickson *et al.* (1979) demostraron la inexistencia de reactividad cruzada de la  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* con anticuerpos contra la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* y viceversa. Con el objetivo de caracterizar inmunológicamente la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*, se realizó un ensayo ELISA frente a varias  $\beta$ -galactosidasas de distinto origen.

Las  $\beta$ -galactosidasas comerciales (*Sigma*) de *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* y de hígado bovino no mostraron reactividad cruzada con los anticuerpos contra la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*, mientras que la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* sí presentó reactividad cruzada, como puede verse en la figura 1.9.

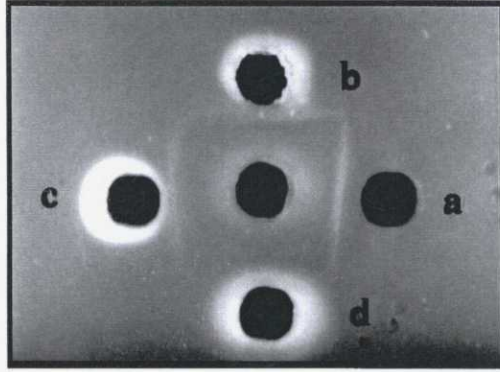
Se confirmó la especificidad del anticuerpo contra la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* ya que el extracto proteico de una cepa de *K. lactis* deficiente en  $\beta$ -galactosidasa (MW190-9B) no mostró reactividad cruzada en la técnica de ELISA frente a anticuerpos contra la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*. Un extracto proteico crudo de *K. lactis* mostró solo un 10% de reactividad de la proteína purificada frente a anticuerpos contra la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*, lo que sugiere que la  $\beta$ -galactosidasa no es la principal proteína del extracto. Este resultado está en consonancia con el factor de 11 alcanzado en la purificación.



**Figura 1. 9:** Resultados de reactividad cruzada obtenidos mediante ELISA con anticuerpos específicos contra la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* (barras negras) frente a (1) un extracto crudo de proteínas de una cepa de *K. lactis* deficiente en  $\beta$ -galactosidasa (MW190-9B), (2) un extracto crudo de una cepa silvestre de *K. lactis* (NRRL-Y1140), (3)  $\beta$ -galactosidasa purificada a partir del Maxilact LX-5.000, (4)  $\beta$ -galactosidasa parcialmente purificada de *K. fragilis*, (5)  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus niger*, (6)  $\beta$ -galactosidasa de hígado bovino, (7)  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*. Las barras blancas son controles de ausencia de reactividad cuando se usa el suero de un ratón sin inmunizar en vez de los anticuerpos contra la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*. Las barras grises son controles de la ausencia de reactividad cuando no se añaden los mencionados anticuerpos primarios.

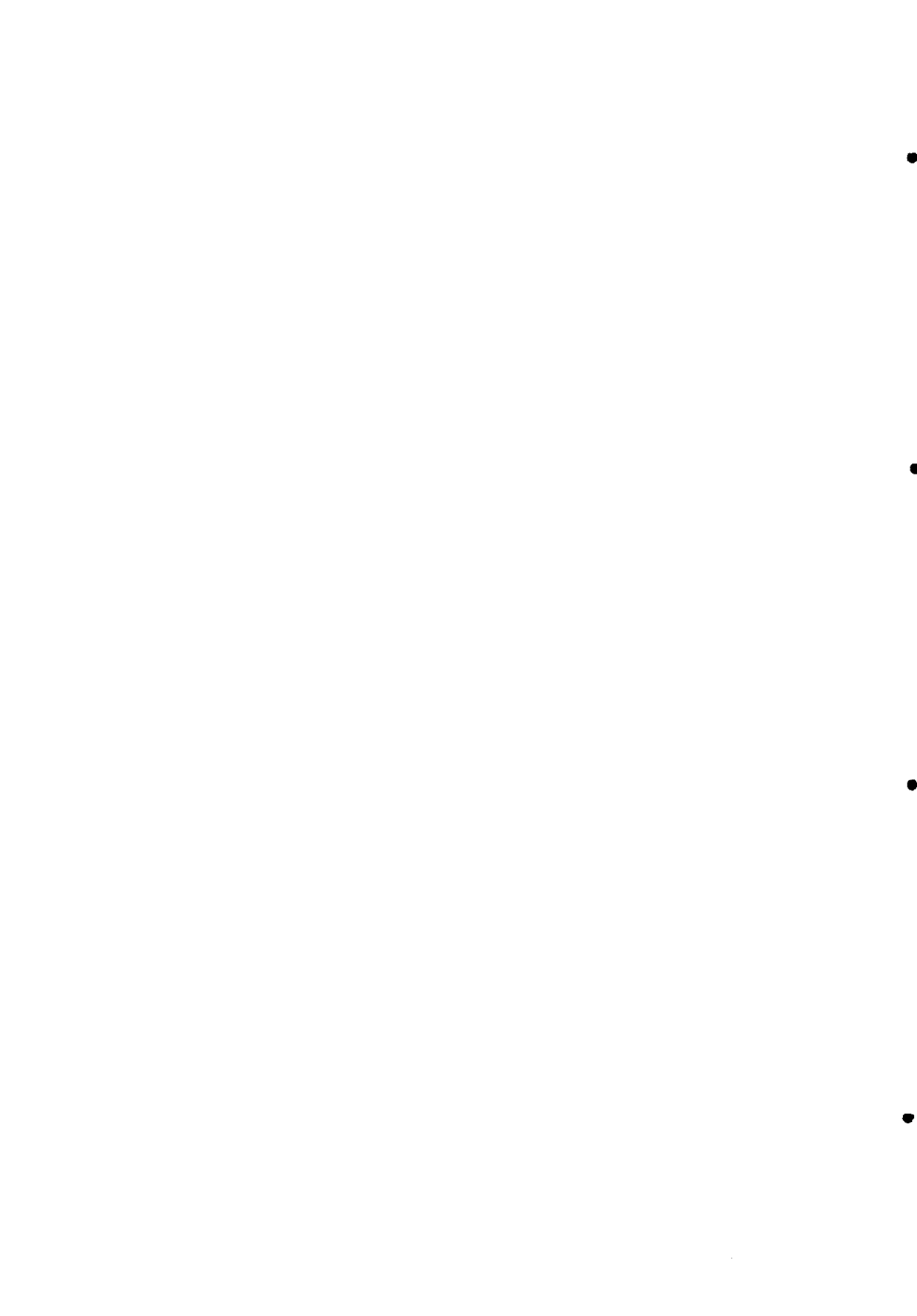
El preparado comercial de  $\beta$ -galactosidasa parcialmente purificada de *K. fragilis* alcanzó un 60% de reactividad cruzada frente a los anticuerpos contra la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*. Y viceversa, la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* presentó reactividad cruzada frente a los anticuerpos contra la  $\beta$ -galactosidasa de *K. fragilis*, como se demostró por el método de inmunodifusión (Figura 1.10). En este caso la presencia de un espolón en la banda de precipitación que mira hacia el pocillo que contiene el extracto crudo de *K. lactis*, nos indica la existencia de epítomos comunes entre ambos antígenos (Ouchterlony y Nilsson, 1986), existiendo en la  $\beta$ -galactosidasa de *K. fragilis* otros determinantes antigénicos únicos que son detectados por el anticuerpo.

Por tanto, las  $\beta$ -galactosidasas de origen animal, bacteriano o de hongos parecen estar poco relacionadas desde el punto de vista antigénico con las de levaduras.



**Figura 1. 10:** Inmunodifusión en geles de agarosa. Pocillo central, suero de ratón inmunizado contra la  $\beta$ -galactosidasa de *K. fragilis*. (A)  $\beta$ -galactosidasa de *K. fragilis*, (B) y (C) extracto proteico de *K. lactis*, (D) control negativo, extracto proteico de una cepa de *Escherichia coli* deficiente en  $\beta$ -galactosidasa (JM109).





## 2. PRODUCCIÓN DE $\beta$ -GALACTOSIDASA EN CULTIVOS EN ESTADO SÓLIDO.

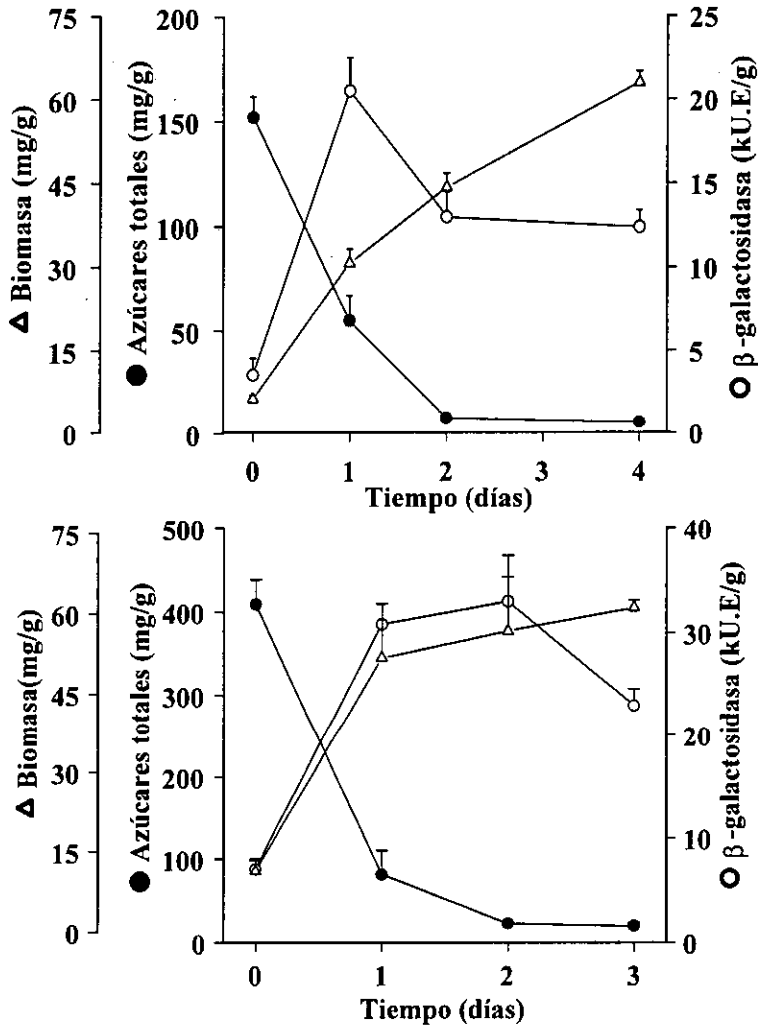
Las fermentaciones en estado sólido han generado un creciente interés en años recientes debido a que ofrecen varias ventajas prácticas y económicas con relación a los cultivos líquidos, como se ha comentado en la introducción (la recuperación del producto es más fácil y se obtiene más concentrado, los equipos de cultivo son sencillos, se reduce el volumen de efluentes, se requiere una menor inversión de capital). Sin embargo, a pesar de estas ventajas, hasta ahora la producción de  $\beta$ -galactosidasa se ha realizado mayoritariamente en cultivos en estado líquido. Con el objetivo de conseguir un abaratamiento de los costos de producción de esta enzima hemos realizado cultivos en estado sólido sobre dos tipos de soporte diferentes: carozo de maíz y salvado de trigo (Becerra y Siso, 1996).

Por otra parte, se estudió la posible secreción de la  $\beta$ -galactosidasa por *Kluyveromyces lactis* en cultivos en estado sólido, ya que se ha descrito la secreción de enzimas, que son intracelulares en cultivos líquidos, cuando los microorganismos crecen en estado sólido (Shankaranand *et al.*, 1992).

### 2. 1. Evaluación de la capacidad nutritiva de los soportes.

Para evaluar la capacidad del carozo de maíz y el salvado de trigo de servir, sin suplemento, como fuente de nutrientes y/o sustratos que promuevan la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa por *K. lactis*, se realizaron varios cultivos añadiendo 3 ml de agua destilada (cantidad estimada en experimentos previos que el soporte puede absorber sin dejar agua libre) y 1 ml de inóculo proveniente de un cultivo creciendo en suero de leche

desproteínizado a 1 gramo de soporte (carozo de maíz o salvado de trigo). En estas condiciones, los azúcares disponibles fueron escasos y no se observó en el período ensayado de tiempo (hasta 96 horas) ni crecimiento de la levadura ni producción de  $\beta$ -galactosidasa (datos no mostrados).



**Figura 2. 1:** Cultivo en estado sólido de *K. lactis* sobre carozo de maíz humedecido con suero de leche concentrado: 150 mg de lactosa por gramo de soporte (gráfica superior) y 350 mg de lactosa por gramo de soporte (gráfica inferior). Los resultados representan la media de tres (gráfica superior) y cuatro (gráfica inferior) cultivos diferentes. Las barras verticales indican el error estándar.

## 2. 2. Cultivos en estado sólido.

Tras comprobar que sobre el carozo de maíz y el salvado, sin suplementos, no se producía crecimiento, se realizaron cultivos añadiendo, a 1 g de soporte, suero de leche desproteinizado (concentrado mediante liofilización hasta obtener aproximadamente niveles de 150 y 350 mg de lactosa en 3 ml de fase líquida) y 1 ml de inóculo. En este caso, cuando el suero de leche desproteinizado se usó como sustrato para los cultivos en estado sólido sobre el carozo de maíz y el salvado de trigo, se obtuvieron niveles significativos de crecimiento y de producción de  $\beta$ -galactosidasa por *K. lactis*, siendo consumidos prácticamente todos los azúcares disponibles en el período de tiempo ensayado (Figura 2.1 y 2.2).

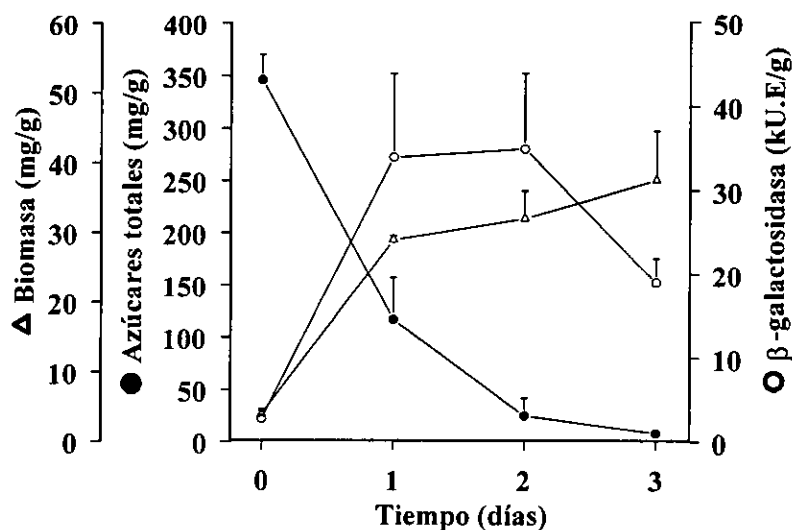


Figura 2. 2: Cultivo en estado sólido de *K. lactis* sobre salvado de trigo humedecido con suero de leche concentrado hasta un nivel de 350 mg de lactosa por gramo de soporte. Los resultados son la media de cuatro cultivos diferentes. Las barras verticales indican el error estándar.

Aunque no es común realizar cultivos líquidos con inóculos tan grandes, se realizaron, con propósitos comparativos, cultivos en las condiciones descritas previamente pero sin soporte (Figura 2.3).

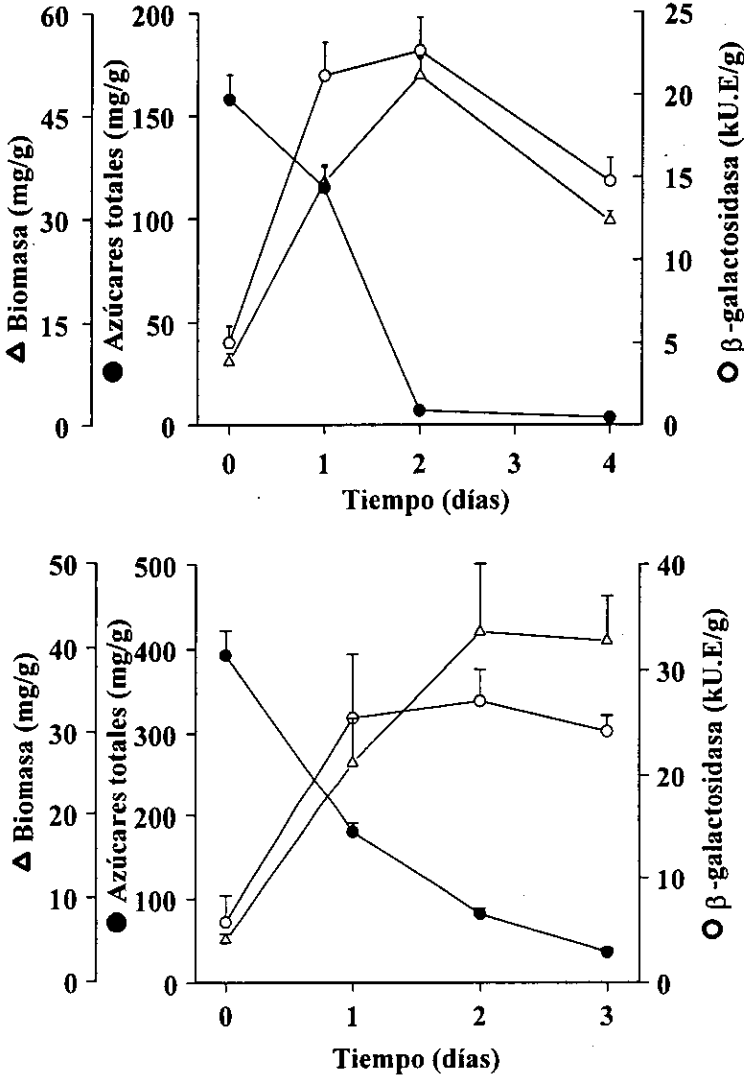


Figura 2. 3: Cultivos en medio líquido de *K. lactis* sobre suero de leche concentrado: 50 mg de lactosa por ml (gráfica superior) y 150 mg de lactosa por ml (gráfica inferior). Se cultivaron 3 ml de sustrato más 1 ml de inóculo en un matraz Erlenmeyer de 25 ml de capacidad a 30°C y 250 r.p.m. Los resultados representan la media de tres (gráfica superior) y cuatro (gráfica inferior) cultivos diferentes. Las barras verticales indican el error estándar.

En la tabla 2.1 se muestran los rendimientos en biomasa por azúcar consumido ( $Y_{x/s}$ ) y de  $\beta$ -galactosidasa producida por biomasa ( $Y_{p/x}$ ). Se puede observar que los valores de  $Y_{p/x}$  para los cultivos sobre carozo de maíz fueron mayores que los obtenidos para los cultivos sobre salvado de trigo y en medio líquido para el mismo nivel de azúcar. Esto parece demostrar que los cultivos en estado sólido sobre el carozo de maíz fueron más efectivos, por lo tanto, se consideró esta situación mas interesante para nuestros propósitos.

**Tabla 2. 1:** Rendimientos de biomasa y de  $\beta$ -galactosidasa en los cultivos analizados (media  $\pm$  SE).

	Cultivo	$Y_{x/s}$ biomasa en función de los azúcares consumidos (mg/mg) <sup>a</sup>	$Y_{p/x}$ $\beta$ -galactosidasa en función de la biomasa (kU.E/mg) <sup>b</sup>
a	Líquido (150 mg lactosa)	0,32 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,04
b	Líquido (350 mg lactosa)	0,14 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,09
c	Carozo de maíz (150 mg lactosa por g soporte)	0,43 $\pm$ 0,04	0,67 $\pm$ 0,05
d	Carozo de maíz (350 mg lactosa por g soporte)	0,12 $\pm$ 0,02	1,07 $\pm$ 0,07
e	Salvado de trigo (350 mg lactosa por g soporte)	0,17 $\pm$ 0,02	0,61 $\pm$ 0,11

Comparaciones estadísticas hechas por medio del *test* t de Student ( $\alpha=0,05$ ). Tamaño de la muestra: tres para los datos de las filas a, c y cuatro para los datos en las filas b, d, e.

<sup>a</sup> En el punto más alto de biomasa.

<sup>b</sup> En el punto más alto de  $\beta$ -galactosidasa.

En el caso del carozo de maíz, mientras que los rendimientos  $Y_{p/x}$  para niveles superiores de lactosa fueron mayores que para niveles inferiores,  $Y_{x/s}$  fue superior para niveles más bajos de lactosa.

### 2. 3. Diseño de un plan factorial completo.

Intentando averiguar las condiciones que maximizan la producción de  $\beta$ -galactosidasa por *K. lactis* en cultivos en estado sólido sobre carozo

de maíz, se estudió la influencia de tres variables (nivel inicial de lactosa, cantidad de inóculo y tiempo de incubación a 30°C) y sus interacciones sobre esta respuesta, por medio de un diseño experimental consistente en un plan factorial completo cuyos dominios y criterios de codificación de las variables se recogen en la tabla 2.2.

**Tabla 2. 2:** Dominios experimentales de las variables y su codificación.

Valor codificado	Tiempo (T:h)	Valores naturales	
		Azúcares (A:mg/g)	Inóculo (I:mg/g)
-1	22	150	2
0	44	300	7
+1	66	450	12

Codificación:  $V_c=(V_n-V_0)/\Delta V_n$ ; Descodificación  $V_n=V_0+(\Delta V_n \times V_c)$  donde  $V_c$ =valor codificado,  $V_n$ =valor natural,  $V_0$ =valor natural en el centro del dominio experimental,  $\Delta V_n$ =incremento del valor natural correspondiente a un incremento unidad del valor codificado.

En la tabla 2.3 se muestra la matriz experimental, junto con los resultados obtenidos para la respuesta (actividad  $\beta$ -galactosidasa), otros parámetros del cultivo y los coeficientes de las variables indicando los coeficientes significativos en función del *test* t de Student para un nivel de significación del 95%.

La adecuación a un modelo de primer orden se demuestra por la estimación de la curvatura (Tabla 2.3). Este parámetro representa la suma de los coeficientes de las tres variables al cuadrado y, en el caso estudiado aquí, no es significativo. El sistema es susceptible de definirse mediante la siguiente ecuación codificada (cuya significación se comprobó por medio del *test* F de Fisher) en la cual únicamente la interacción entre el tiempo y el nivel de azúcar inicial (lactosa) no presentó influencia significativa en la respuesta:

$$\beta G = 12,55 - 3,42 T + 4,16 A + 3,13 I - 1,96 T \times I + 1,56 A \times I - 1,54 T \times A \times I$$

**Tabla 2. 3:** Resultados experimentales del plan factorial completo ( $2^3$ ) para el estudio de la producción de  $\beta$ -galactosidasa por *K. lactis* en cultivos en estado sólido y análisis de la significación y de la adecuación del modelo propuesto. Variables de acuerdo con la tabla 2.2.

	T	A	I	Biomasa (mg/g)	Azúcares (mg/g)	$\beta$ G observada (kU.E./g)	$\beta$ G esperada (kU.E./g)	Residuos normalizados
1	1	1	1	54	11	13,82	14,47	-1,40
2	-1	1	1	54	13	28,12	28,32	-0,36
3	1	1	-1	40	10	11,45	12,11	-1,40
4	-1	1	-1	42	45	11,75	11,95	-0,36
5	1	-1	1	34	9	5,90	6,10	-0,36
6	-1	-1	1	28	19	13,15	13,81	-1,40
7	1	-1	-1	24	9	3,62	3,82	-0,36
8	-1	-1	-1	24	31	9,15	9,81	-1,40
9	0	0	0	42	11	13,50	12,55	0,75
10	0	0	0	41	10	14,80	12,55	3,04
11	0	0	0	44	10	12,75	12,55	0,15
12	0	0	0	41	13	12,60	12,55	0,04

Curvatura:  $(13,41-12,12) \pm 1,26 = 1,29 \pm 1,26$  (N.S.)

$M\beta G_f$  = Media de los valores observados de  $\beta$ G en los experimentos del 1 al 8

$M\beta G_c$  = Media de los valores observados de  $\beta$ G en los experimentos del 9 al 12 (centro del dominio)

N.S. = No significativo;  $M\beta G_f = 12,12$  ;  $M\beta G_c = 13,41$

	Coefficientes	t	Nivel de significación ( $\alpha=0,05$ )
Constante	12,55	34,58	0,0000
T	-3,42	-7,70	0,0006
A	4,16	9,37	0,0002
Y	3,13	7,04	0,0009
TxA	-0,23	-0,47	0,6626 N. S.
TxY	-1,96	-4,42	0,0069
AxY	1,56	3,50	0,0172
TxAxY	-1,53	-3,45	0,0182

#### Análisis de la varianza

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	$F_{calculada}$	Valor P
Modelo	379,882	6	63,3137	40,0682	0,0005
Error	7,900	5	1,580		
Total (Corr.)	387,783	11			

R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 0,955 Error estándar de est. = 1,257



Algunas de las superficies de respuesta más representativas correspondientes a la ecuación obtenida están representadas en la figura 2.4. Estas superficies son planos definidos por pares de variables fijando la tercera variable (valor 0).

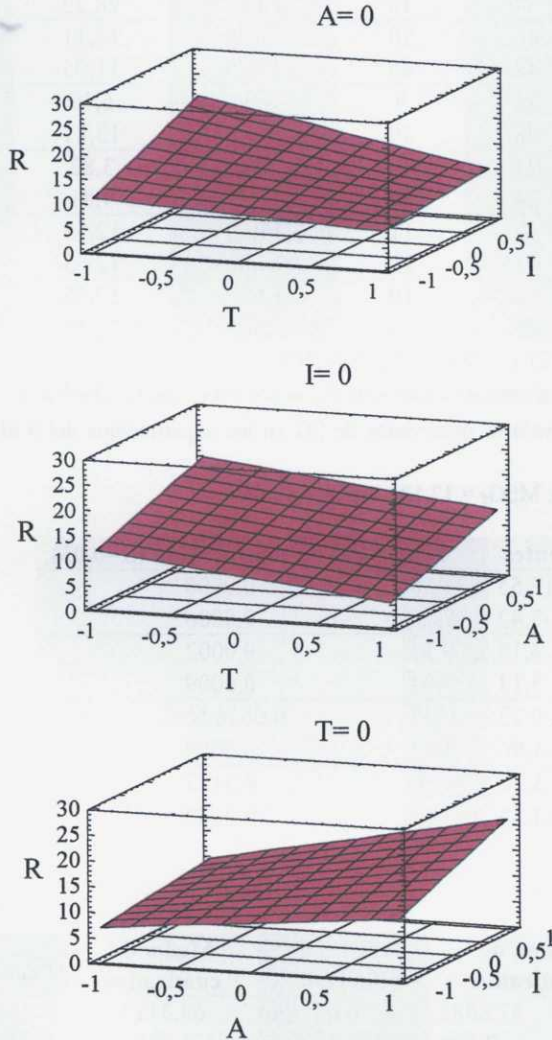


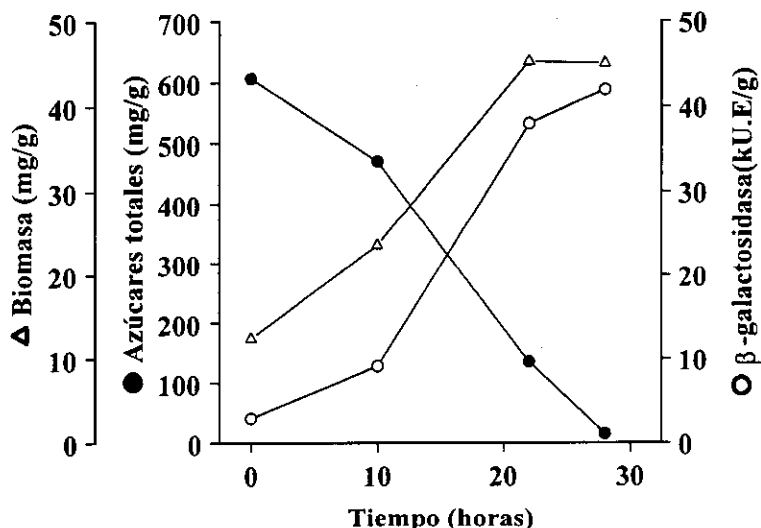
Figura 2. 4: Superficies de respuesta obtenidas en las fermentaciones en estado sólido estudiadas de acuerdo con el plan experimental definido en la tabla 2.3. R= respuesta (actividad  $\beta$ -galactosidasa). Los valores y nomenclatura de las variables pueden verse en la tabla 2.2.

Como se puede observar en la figura 2.4, la respuesta aumenta en cada situación del dominio experimental cuando los niveles de azúcares iniciales y el inóculo incrementan (coeficiente positivo) y cuando el tiempo se reduce (coeficiente negativo). El valor más alto de la respuesta se obtiene en la esquina  $A = +1, I = +1, T = -1$ .

#### **2. 4. Método de la máxima pendiente.**

Con la intención de encontrar un óptimo fuera del dominio experimental, se aplicó el método de la máxima pendiente, incrementando los valores de las variables proporcionalmente a sus coeficientes (0,5 unidades codificadas para el coeficiente más pequeño) en la dirección del incremento de la respuesta. Se hizo una excepción con el tiempo. Fuera del dominio experimental la respuesta no puede ser superior con niveles iniciales de azúcar mayores para tiempos de incubación cortos (10 horas o menos). Además, la reducción del tiempo implica dejar niveles altos de azúcares sin utilizar. Otros límites los presentan el inóculo y la concentración del suero de leche ya que: a) la necesidad de concentrar las células provenientes de cultivos líquidos influye de manera negativa en la economía del proceso, suponiendo un costo añadido a la fermentación; b) la cristalización de la lactosa impide una concentración mayor del suero de leche para obtener la concentración inicial de lactosa deseada en el volumen requerido; y c) un volumen mayor de inóculo o de sustrato (suero de leche) sería perjudicial para el crecimiento ya que un exceso de líquido libre presente sin absorber provocaría un aumento en las barreras difusionales y traería consigo un menor crecimiento y una menor producción enzimática. La cantidad de inóculo controla la fase inicial de latencia, un inóculo pequeño prolonga la fase de latencia (Muniswaran y

Charyulu, 1994). De hecho, cuando se realizaron cultivos con una fase líquida mayor se obtuvieron resultados negativos. Por lo tanto, se analizaron las condiciones teóricas iniciales de 550 mg de lactosa y 14,5 mg de biomasa, pero incrementando hasta tres veces el tiempo de incubación sugerido por el método de la máxima pendiente. Los resultados obtenidos (Figura 2.5) muestran que para esas condiciones se obtiene una actividad  $\beta$ -galactosidasa máxima a las 28 horas.



**Figura 2. 5:** Producción de  $\beta$ -galactosidasa por *K. lactis* en un cultivo en estado sólido sobre carozo de maíz humedecido con suero de leche. El nivel inicial de lactosa y de inóculo se determinó por el método de la máxima pendiente en función de los resultados del plan factorial completo estudiado.

## 2. 5. Estudio de la posible secreción de enzimas.

Como se ha comentado en la introducción, se ha descrito la secreción de enzimas, que son intracelulares en cultivos líquidos, cuando los microorganismos crecen en estado sólido (Shankaranand *et al.*, 1992). Se estudió, por tanto, la posibilidad de que la  $\beta$ -galactosidasa se secretase mediante cultivos en estado sólido, ya que esto facilitaría en gran medida

el proceso de preparación enzimática. Además, se estudió si la adición de un detergente al medio de cultivo, Tween-80, favorecía la secreción de la enzima.

Como se puede observar en la tabla 2.4, el nivel de secreción no sobrepasa el 10% incluso con las mayores concentraciones de Tween-80 tanto para cultivos líquidos como sólidos; por lo tanto, se podría afirmar que el cambio de cultivos líquidos a sólidos no parece promover la secreción de  $\beta$ -galactosidasa por *K. lactis* en el medio de cultivo.

**Tabla 2. 4:** Porcentaje de secreción de  $\beta$ -galactosidasa en cultivos líquidos y en estado sólido suplementados o no con diferentes concentraciones de Tween-80.

Días	Cultivos líquidos				Carozo de maíz				Salvado de trigo	
	0%	0,2%	0,3%	0,4%	0%	0,2%	0,3%	0,4%	0%	0,4%
1	1	2,80	0,05	0,08	0,05	0,03	0,60	3	0,80	9,50
2	0,5	0,70	0,03	0,05	0,56	0,80	5,40	5	1,30	0,50
3	1,9	0,06	0,24	0,04	-	1,90	0,10	3	4,70	2,70

Nivel inicial de lactosa =  $385 \pm 20$  mg/g

Inóculo =  $6,7 \pm 2,8$  mg/g,  $1 \pm 0,3$  kU.E./g

## 2. 6. Estudio de otras variables que influyen en los cultivos en estado sólido.

Al igual que en los cultivos sumergidos, una adecuada selección y control de las variables que influyen en el proceso, condiciona el éxito de las fermentaciones en estado sólido (Pastrana, 1996). En este trabajo se estudió el efecto de la aireación y el tamaño de la partícula del soporte.

La aireación del medio sólido humedecido es uno de los factores claves que determinan la productividad en los cultivos en estado sólido (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994; Gowthaman *et al.*, 1995). Mediante los sistemas de aireación y agitación se pretende favorecer los procesos de transferencia de masa tanto a nivel interparticular como intraparticular

(Pastrana, 1996). Como los valores obtenidos para  $Y_{x/s}$  principalmente por los cultivos con niveles de azúcar mayores (Tabla 2.1) son típicos de un metabolismo fermentativo, se evaluó la posibilidad de incrementar  $Y_{x/s}$  y por lo tanto la producción de  $\beta$ -galactosidasa, cambiando a un metabolismo oxidativo mediante cultivos con aireación forzada. No obstante, en este caso, aún cuando el aire se suministró prehumedecido, la evaporación fue muy alta siendo muy difícil mantener la humedad necesaria para el crecimiento de la levadura.

El efecto del tamaño de la partícula (y por tanto, la porosidad y el área específica) sobre los cultivos en estado sólido debe tenerse en cuenta. La porosidad influye en la difusión del aire, los nutrientes y los productos hacia y desde el microorganismo. Un diámetro de partícula mayor favorece estos factores, aunque el área para el crecimiento puede ser más pequeña. Por tanto, se debe buscar una compensación entre los dos factores (Pandey, 1992; Muniswaran *et al.*, 1994; Gowthaman *et al.*, 1995). No obstante, cuando ensayamos un diámetro de soporte mayor (0,8 mm) para reducir la compactación de la biomasa, no se encontraron diferencias relevantes en la producción de  $\beta$ -galactosidasa con respecto a las partículas de 0,2 mm.

### 3. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE SECRECIÓN DE $\beta$ -GALACTOSIDASA.

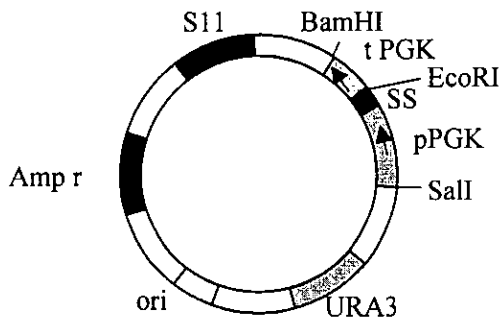
Como se ha comentado en la introducción, la secreción de proteínas heterólogas en el medio de cultivo es una manera de obtener grandes cantidades de estas proteínas en una forma relativamente pura, sin contaminantes de proteínas celulares y abaratando los costos asociados a la extracción y purificación de la proteína. La obtención mediante ingeniería genética de una levadura capaz de secretar la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* al medio de cultivo, sería de un valor incalculable en la industria, ya que la principal limitación al aprovechamiento del suero de leche basado en la hidrólisis enzimática de la lactosa, se deriva de los altos costos de extracción de dicha enzima. En este capítulo se describe la construcción de un plásmido de secreción de la  $\beta$ -galactosidasa y diferentes modificaciones genéticas para conseguir que la enzima sea secretada eficientemente al medio de cultivo.

#### 3. 1. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR DE SECRECIÓN.

##### 3. 1. 1. Diseño del vector.

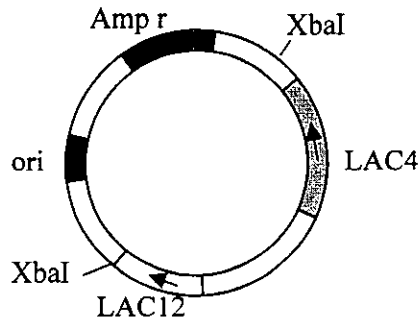
El vector utilizado fue el plásmido de secreción, pSPGK1 (Figura 3.1) que es un derivado del pKD1. El plásmido pKD1 es análogo al 2  $\mu$ m de *Saccharomyces cerevisiae* y fue aislado de *Kluyveromyces drosophilarum*, replicándose eficientemente en *Kluyveromyces lactis* (Van der Berg *et al.*, 1990). Además, parece ser adecuado para la aplicación industrial ya que se mantiene en *K. lactis* en un alto número de copias hasta

100 generaciones sin necesidad de condiciones de crecimiento selectivas (Fleer *et al.*, 1991 a). El pSPGK1 presenta el promotor constitutivo y el terminador de la fosfoglicerato quinasa (*PGK*) de *S. cerevisiae* que ha sido usado eficientemente en la expresión de proteínas heterólogas en *S. cerevisiae* como la quimosina (Berry *et al.*, 1987) y en *K. lactis* como la seroalbúmina humana (Blondeau *et al.*, 1994) y la  $\alpha$ -amilasa de ratón (Tokunaga *et al.*, 1997). También incluye la señal de secreción que corresponde a la pre-secuencia (16 aminoácidos) de la subunidad  $\alpha$  de la toxina *killer* de *K. lactis* y al dipéptido Lys-Arg que es un sitio potencial de corte de la endopeptidasa *Kex1* de *K. lactis* (Fleer *et al.*, 1991 b). Entre el promotor y el terminador de la *PGK*, inmediatamente después de la secuencia de la señal de secreción, se localiza un único sitio de clonación *EcoRI* para la inserción del gen heterólogo de interés.



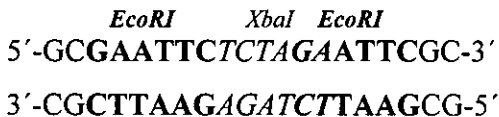
**Figura 3. 1:** Plásmido pSPGK1. La secuencia de la señal de secreción (SS) es 5'ATG AAT ATA TTT TAC ATA TTT TTG TTT TTG CTG TCA TTC GTT CAA GGT AAA AGA 3'. Los dos últimos tripletes de la SS codifican para el dipéptido Lys-Arg que es un sitio potencial de corte de la endopeptidasa *Kex1* de *K. lactis*. PGK=fosfoglicerato quinasa. p=promotor. t= terminador. Amp r=gen de resistencia a la ampicilina. Ori=origen de replicación en bacterias. S11=origen de replicación en *K. lactis*. URA=marcador de selección en levaduras.

Disponíamos del gen *LAC4* que codifica la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* clonado dentro del plásmido pLX8 (Das y Hollenberg, 1982) (Figura 3.2). Debido a que el gen presenta varios sitios de corte con la enzima *EcoRI* fue necesario introducir otro sitio de clonación distinto a *EcoRI* dentro del pSPGK1. Se eligió *XbaI* ya que no existen sitios potenciales de corte de esta enzima dentro del gen *LAC4*.



**Figura 3. 2:** Plásmido pLX8. Amp r=gen de resistencia a la ampicilina. Ori=origen de replicación en bacterias. LAC4=gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*. LAC12=gen de la lactosa permeasa de *K. lactis*.

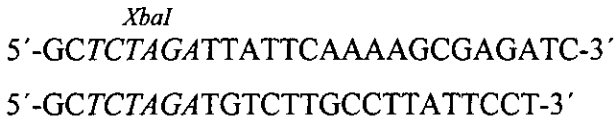
La introducción del sitio *XbaI* se realizó mediante la inserción de un oligonucleótido sintético en el sitio único de clonación del pSPGK1, comprobándose mediante secuenciación la correcta inserción. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos que contienen un sitio *XbaI* central flanqueado por dos sitios *EcoRI*:



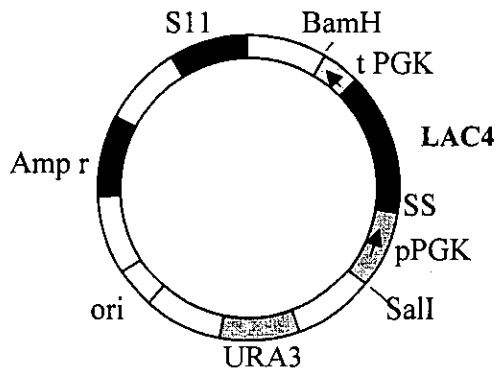
Para la amplificación del gen *LAC4* mediante PCR se utilizaron los siguientes oligonucleótidos cebadores construidos a partir de la secuencia



del gen *LAC4* que ha sido publicada (Poch *et al.*, 1992) y que contienen además en sus extremos el sitio *XbaI*:



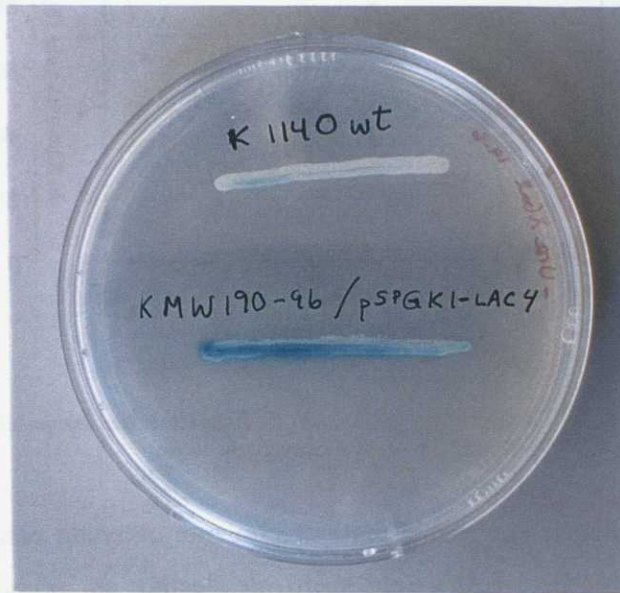
El gen amplificado, con sitios *XbaI* terminales, se purificó a partir de una banda de unos 3 kb. Tanto el vector, pSPGK1, como el gen *LAC4* fueron digeridos con *XbaI* y se procedió a la reacción de ligamiento. En el plásmido resultante, pSPGK1-LAC4 (Figura 3.3), se secuenció la zona de unión del gen a la señal de secreción, verificando que se encontraba en la pauta de lectura correcta.



**Figura 3. 3:** Plásmido construido para la secreción de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*. Se ha utilizado la misma nomenclatura que en las figuras 3.1 y 3.2.

Una vez obtenido el plásmido de secreción se procedió a transformar la cepa de *K. lactis* MW190-9B (*MATa*, *lac4-8*, *uraA*, *Rag*<sup>+</sup>). Se obtuvieron varios transformantes que se sembraron en placas X-Gal-Ura utilizando como control negativo la levadura MW190-9B sin transformar y como control positivo la cepa silvestre de *K. lactis* Y1140. Se observó que los

transformantes son de crecimiento más rápido y adquieren un color azul más intenso que el salvaje. Sin embargo, en ningún caso apareció un halo azul excesivamente grande alrededor de la siembra indicando que, si bien el gen de la  $\beta$ -galactosidasa se expresa, no se produce una secreción masiva de la proteína (Figura 3.4).



**Figura 3. 4:** Levaduras de las cepas de *K. lactis* Y1140 (cepa silvestre) y MW190-9B transformada con el plásmido pSPGK1-LAC4 tras dos días de crecimiento a 30°C en placas X-Gal-Ura.

### 3. 1. 2. Cinética de crecimiento y secreción.

Para examinar la cinética de crecimiento y secreción de la  $\beta$ -galactosidasa por las levaduras transformadas con el plásmido pSPGK1-LAC4, se realizaron cultivos discontinuos en un fermentador con suero de leche como sustrato (Figura 3.5). Se observó que la levadura era capaz de crecer y producir  $\beta$ -galactosidasa, llegando a alcanzar un porcentaje de actividad enzimática en el medio de cultivo con respecto a la actividad intracelular de un 10%. Sin embargo, el crecimiento fue lento en

comparación con el de la cepa silvestre productora de  $\beta$ -galactosidasa inducible (Doval, 1992).

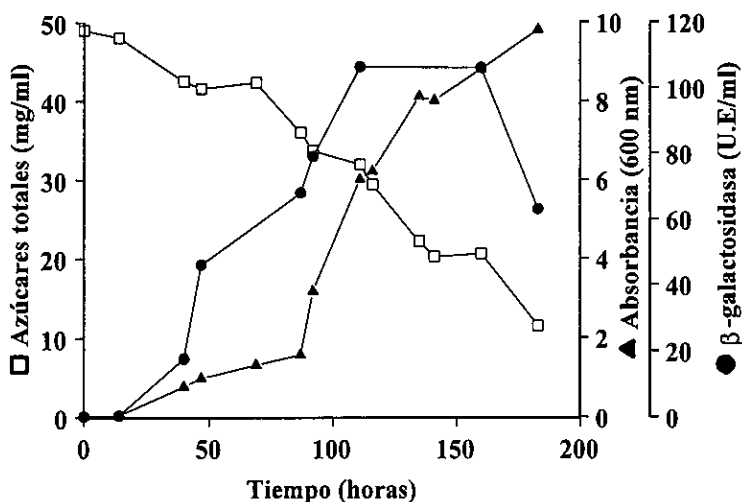


Figura 3. 5: Crecimiento y producción de  $\beta$ -galactosidasa intracelular por la levadura MW190-9B/pSPGK1-LAC4 en suero de leche.

Para intentar explicar el lento crecimiento obtenido con la levadura MW190-9B/pSPGK1-LAC4 en suero de leche, en primer lugar se determinó si el plásmido, dado que es de alto número de copias, podría resultar tóxico para la levadura. Para ello, se realizaron cultivos con la cepa mutante MW190-9B transformada con cada uno de los plásmidos pSPGK1-LAC4 y pSPGK1 en medios CM-Ura y suero de leche, comparándolos con cultivos de la cepa MW190-9B sin transformar en medio completo y suero de leche.

Como se puede observar en la Tabla 3.1, la levadura no transformada con el gen *LAC4*, no presentó crecimiento significativo en suero de leche (lactosa como principal fuente de carbono). Además, los crecimientos alcanzados por las levaduras transformadas en medio CM-Ura fueron

similares a los alcanzados por la cepa mutante en CM, con lo cual, se puede deducir que los plásmidos no resultan tóxicos para la levadura.

**Tabla 3. 1:** Crecimiento (medido como Absorbancia a 600 nm) de la levadura MW190-9B transformada o no con los plásmidos pSPGK1-LAC4 y pSPGK1 en los medios indicados para estudiar la posible toxicidad plasmídica.

Tiempo (horas)	MW190-9B		MW190-9B/pSPGK1		MW190-9B/pSPGK1-LAC4	
	CM	Suero leche	CM-Ura	Suero leche	CM-Ura	Suero leche
18	1,22	0,06	0,94	0,09	1,15	0,26
41	2,60	0,06	2,38	0,08	2,20	0,97
48	1,10	0,11	0,96	0,09	0,90	0,70

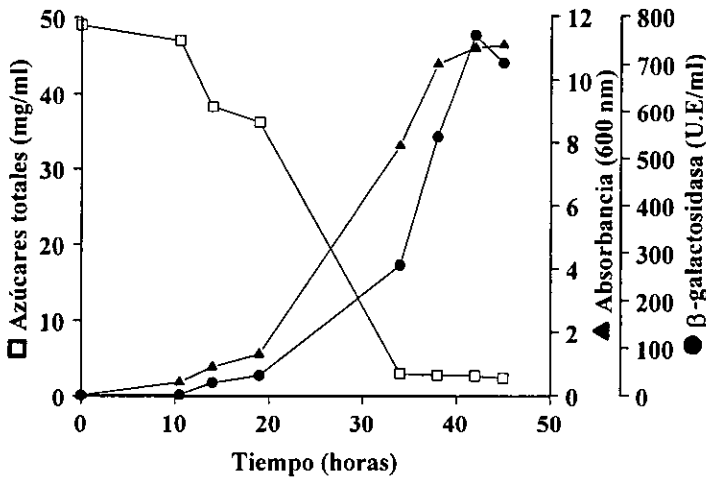
### 3. 1. 3. Estudio de la influencia de la composición del medio de cultivo.

La composición del medio ejerce un efecto importante sobre la producción de proteínas de secreción en levaduras, influyendo tanto en el crecimiento celular como en los porcentajes de secreción (Chen *et al.*, 1993; Wittrup y Benig, 1994; Chang *et al.*, 1998). El promotor de la PGK generalmente es capaz de expresar el gen asociado hasta un nivel del 1-5% del total de las proteínas celulares, dependiendo su eficiencia tanto de la fuente de carbono empleada como de la actividad celular glicolítica (Blondeau *et al.*, 1994). Además, la expresión y secreción parece verse incrementada significativamente por el uso de medios ricos (Rossini *et al.*, 1993; Castelli *et al.*, 1994).

Experimentos previos habían demostrado que el extracto de levadura constituía un suplemento adecuado para el suero de leche, mejorando el crecimiento en *K. lactis* (Becerra, 1995). Por estos motivos, se realizó un cultivo en fermentador del transformante en suero de leche suplementado con extracto de levadura y se procedió a determinar, además del

crecimiento y la producción de  $\beta$ -galactosidasa (Figura 3.6), la estabilidad del plásmido, obteniéndose tras 45 horas de cultivo una estabilidad del 56%.

Al suplementar el suero de leche con extracto de levaduras, el crecimiento fue considerablemente más rápido, agotando todos los azúcares del medio de cultivo en menos de 35 horas, cuando sobre suero de leche sin suplementar se necesitaron más de 200 horas (Figura 3.5). Además, se multiplicaron por 12 los niveles de absorbancia (600 nm) a las 45 horas de cultivo y se incrementaron en más de 6 veces los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa.



**Figura 3. 6:** Crecimiento y producción de  $\beta$ -galactosidasa intracelular por la levadura MW190-9B/pSPGK1-LAC4 en suero de leche suplementado con extracto de levaduras.

Dado que el cultivo en suero de leche sin suplementar se había realizado sin control de pH (Figura 3.5) y que está descrito que la actividad  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* disminuye bruscamente a valores de pH por debajo de 6,5 o por encima de 7,5 (Dickson *et al.*, 1979; Siso y Doval, 1994), en el cultivo sobre suero de leche suplementado se mantuvo el pH

próximo a 7 por adición de sosa para evitar la pérdida de actividad extracelular. En este caso, sí se detectó presencia de actividad  $\beta$ -galactosidasa en el medio de cultivo. Así, entre las 10 y las 14 horas de cultivo, la  $\beta$ -galactosidasa extracelular llegó a representar el 54% de la intracelular, disminuyendo este valor hasta un 32% a las 20 horas y hasta menos de un 10% a partir de las 35 horas de cultivo. A lo largo de todo el cultivo, los valores absolutos de actividad enzimática extracelular se mantuvieron constantes, debiéndose el descenso en el porcentaje de secreción al aumento de la  $\beta$ -galactosidasa intracelular.

#### 3. 1. 4. Localización subcelular de la $\beta$ -galactosidasa.

La presencia de la pared celular en levaduras representa una barrera adicional que dificulta la excreción de proteínas al medio de cultivo. El péptido señal dirige a las proteínas a través de la ruta de secreción hasta el espacio periplásmico pero esto no implica que la proteína pueda atravesar fácilmente la pared y ser excretada al medio de cultivo (Venturini *et al.*, 1997).

Con el objetivo de intentar aclarar si en la levadura transformada se producía acumulación de la  $\beta$ -galactosidasa de secreción en el espacio periplásmico u otro compartimento celular, se realizó un cultivo en fermentador, con control de pH a 7,0, esta vez en dos litros de YPL (4% de lactosa) con glucosa al 0,1%, determinando la actividad enzimática además de en las células enteras y medio de cultivo, en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial y correspondientes al espacio periplásmico, citoplasma y sedimento celular. La utilización de YPL, un medio sintético, en lugar de suero de leche, facilita la generalización de los resultados obtenidos. Se adicionó una pequeña cantidad de glucosa en el medio de

cultivo a fin de disminuir la fase de latencia favoreciendo el crecimiento inicial y la producción de biomasa de la levadura, por ser una fuente de carbono de utilización más rápida que la lactosa; esta modificación no implica riesgo de existencia de represión catabólica pues el promotor de la PGK es constitutivo. Además, incluso parece existir cierta inducción del promotor de la PGK al añadir glucosa, así la expresión del  $\alpha$ -interferón usando el promotor PGK se indujo de 20 a 30 veces tras adicionar glucosa a un cultivo creciendo sobre acetato como fuente de carbono (Romanos *et al.*, 1992). Si bien el cultivo se comenzó en modo discontinuo, al cabo de 25 horas (comienzo de la fase estacionaria) se inició el cultivo continuo con una tasa de dilución de  $0,02 \text{ h}^{-1}$ , pues existen precedentes en la bibliografía indicativos de que prolongando la fase estacionaria de los cultivos se incrementa la liberación de proteínas al medio de cultivo (Fleer *et al.*, 1991 a; Macreadie *et al.*, 1993) (Figura 3.7).

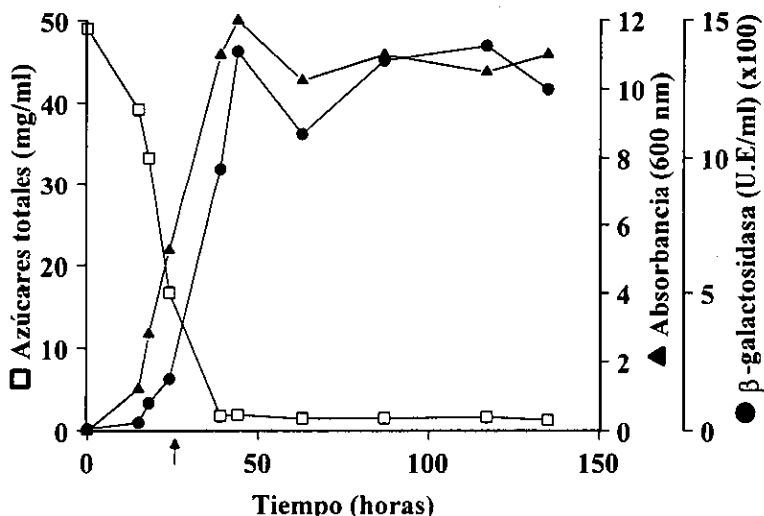


Figura 3. 7: Crecimiento y producción de  $\beta$ -galactosidasa por la levadura MW190-9B/pSPGK1-LAC4 en YPL 4% de lactosa con glucosa al 0,1%. La flecha indica el momento en que se conectó el cultivo continuo ( $\mu=0,02 \text{ h}^{-1}$ ).

A pesar de que la actividad  $\beta$ -galactosidasa en el medio va aumentando a lo largo del cultivo (Tabla 3.2), cabe destacar que si se expresan los datos como porcentajes de la actividad intracelular, al inicio de la fase exponencial (15 horas) la  $\beta$ -galactosidasa extracelular representa un 44% de la intracelular, disminuyendo a partir de las 24 horas hasta valores comprendidos entre el 7 y el 14%. Por tanto, prolongando la fase estacionaria de los cultivos de la levadura MW190-9B/pSPGK1-LAC4 no parece incrementarse el porcentaje de secreción de la  $\beta$ -galactosidasa recombinante.

Se determinó la estabilidad del plásmido durante la fase estacionaria resultando ser de un 75% entre las 60 y las 150 horas de cultivo.

**Tabla 3. 2:** Localización de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (U.E./ml) producida por la levadura MW190-9B/pSPGK1-LAC4 a las horas de cultivo que se indican. Datos correspondientes al cultivo de la Figura 3.7.

Tiempo (horas)	Medio cultivo	Periplasma	Citoplasma	Sedimento
15	13	-	-	-
39	15	3	38	347
44	24	3	41	559
63	49	50	164	200
87	115	56	165	191
117	139	84	217	295
135	171	103	130	60
158	176	114	183	207

Con respecto a la localización subcelular de la  $\beta$ -galactosidasa (Tabla 3.2), parece existir cierto aumento de la enzima en el periplasma a lo largo del cultivo, obteniéndose los valores más altos de actividad en la fracción correspondiente al sedimento celular, lo cual puede ser debido a la  $\beta$ -galactosidasa contenida en células enteras que no se transformaron en protoplastos y no fueron, por tanto, lisadas, o bien, a  $\beta$ -galactosidasa que ha



seguido la ruta de secreción pero que permanece unida a las paredes celulares de la levadura.

Otro dato a destacar es el hecho de que el número total de unidades enzimáticas de la actividad  $\beta$ -galactosidasa encontrada en las tres fracciones celulares resulta mucho menor que la actividad total medida en las células enteras. Por tanto, al igual que lo que sucedía en el proceso de preparación de extractos proteicos con enzimas (apartado 2.1.3.), durante el proceso de fraccionamiento se produce una notable pérdida de actividad enzimática. Dado que está descrita la existencia de proteasas en levaduras (Chen *et al.*, 1993), se determinó la posible presencia de actividad proteolítica tanto en el medio de cultivo como en las tres fracciones celulares preparadas. Sin embargo, en ningún caso se detectó actividad proteolítica apreciable con el método utilizado, quedando sin determinar el factor causante de la acusada pérdida de actividad enzimática que se produce durante el fraccionamiento.

### **3. 1. 5. Observación al Microscopio Electrónico.**

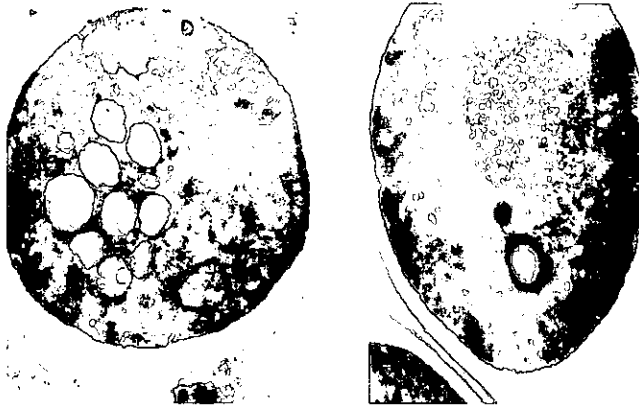
Dado que durante el proceso de fraccionamiento se produjo una pérdida de la actividad enzimática, se intentó mediante microscopía electrónica la inmunolocalización subcelular de la  $\beta$ -galactosidasa. Aunque no fue posible determinar claramente su inmunolocalización, sí se puede observar que la levadura MW190-9B/pSPGK1-LAC4 presenta un mayor grado de estructuras parecidas a vacuolas que la cepa silvestre Y1140 (Figura 3.8).

Está descrito que sólo un pequeño porcentaje de la proquimosina bovina producida por *S. cerevisiae* es secretada, permaneciendo una fracción sustancial localizada en las vacuolas (Smith *et al.*, 1985). Algo

similar podría estar sucediendo en nuestro caso, la  $\beta$ -galactosidasa sería dirigida hacia la vía secretora y algún paso de esta compleja ruta se colapsaría dirigiendo el exceso de proteína hacia la vacuola en donde podrían tener lugar procesos degradativos.

MW190-9B/pSPGK1-LAC4

Y1140



**Figura 3. 8:** Fotografía al microscopio electrónico de las cepas de *K. lactis* MW190-9B/pSPGK1-LAC4 (aumentos 28.0 K) e Y1140 (cepa silvestre) (aumentos 35.0 K).

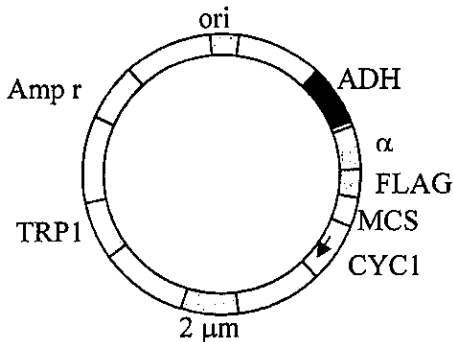
### 3. 2. ACORTAMIENTO DE LA PROTEÍNA.

Aunque se han conseguido secretar varias proteínas heterólogas en levaduras, suelen ser pequeños polipéptidos que probablemente sean más adecuados para la secreción que una proteína citoplasmática tan grande como la  $\beta$ -galactosidasa (Tabla 1 de la introducción). Por tanto, el conseguir una  $\beta$ -galactosidasa más pequeña, mediante acortamiento de algunos dominios sin perder la actividad enzimática, podría incrementar la fracción de enzima que alcanza el medio de crecimiento. Con este

propósito se diseñaron nuevas construcciones usando el vector de expresión YEpFLAG1. Además, este nuevo vector nos permitiría estudiar la influencia de otras señales de secreción y otros promotores en la secreción heteróloga de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*.

### 3. 2. 1. Diseño de la construcción.

El vector YEpFLAG1 (Figura 3.9) presenta el promotor de la alcohol deshidrogenasa de levaduras (*ADH2*) que es regulado mediante represión por glucosa, la señal de secreción del factor  $\alpha$  de levaduras (83 aminoácidos), el péptido FLAG para la detección inmunológica y el terminador transcripcional del gen *CYC1*.



**Figura 3. 9:** Plásmido YEpFLAG1. ADH2=promotor de la alcohol deshidrogenasa.  $\alpha$ =señal de secreción del factor  $\alpha$ . FLAG=péptido FLAG. MCS=sitio múltiple de clonaje. CYC1=terminador del gen *CYC1*. 2  $\mu$ m=origen de replicación en *S. cerevisiae*. TRP1= marcador de selección en levaduras. Amp r= gen de resistencia a la ampicilina.

El péptido FLAG está compuesto de 8 aminoácidos codificados por una secuencia de 24 pb:

N- Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys-C  
5'-GAC TAC AAG GAC GAT GAT GAC AAG-3'  
3'-CTC ATG TTC CTG CTA CTA CTG TTC-5'

La unión de anticuerpos monoclonales (*Eastman Kodak Company*) contra el epítipo FLAG permite la detección inmunológica de la proteína fusionada al péptido FLAG1. El anticuerpo monoclonal M1 se une al péptido FLAG únicamente cuando éste se localiza en el extremo amino terminal de la proteína unida a FLAG, mientras que el anticuerpo monoclonal M2 se puede unir al péptido FLAG en cualquier posición. El péptido FLAG se puede eliminar proteolíticamente mediante el uso de la enteroquinasa y así se recupera la proteína intacta.

Se diseñaron cuatro construcciones diferentes, una de ellas manteniendo el gen *LAC4* entero, en otro caso delecionando los 10 primeros aminoácidos del extremo amino terminal, en un tercer caso retirando los 25 primeros aminoácidos del extremo N-terminal y la última construcción quedándonos con el dominio correspondiente al centro activo que se puede predecir aproximadamente en función de la comparación con la secuencia de la  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* (Figura 3.10), la única  $\beta$ -galactosidasa hasta el momento de la que se encuentra publicada su estructura tridimensional obtenida mediante cristalografía de Rayos-X (Jacobson *et al.*, 1994). Se puede observar en la Figura 3.10 que los residuos de Glu 461, Met 502, Tyr 503 y Glu 537 que son importantes en la función catalítica de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* por estar implicados en el sitio de unión al sustrato (Jacobson *et al.*, 1994) se encuentran conservados en la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*. Estos residuos se encuentran altamente conservados entre  $\beta$ -galactosidasas homólogas (Jacobson *et al.*, 1994).

Para la amplificación del gen se utilizaron los siguientes oligonucleótidos cebadores construidos a partir de la secuencia del gen *LAC4* (Poch *et al.*, 1992) y que en este caso contienen en sus extremos el sitio *XhoI*, ya que el plásmido YEpFLAG1 no contiene en su sitio múltiple

de clonación el sitio *XbaI*, y no existen sitios potenciales de corte de esta enzima en el gen *LAC4*:

*XhoI*

- A) 5'-GCCTCGAGTCTTGCCTTATTCCTGA-3'
- B) 5'-GCCTCGAGTTATTCAAAAAGCGAGATC-3'
- C) 5'-GCCTCGAGAACCCCAAAAAGGTTCA-3'
- D) 5'-GCCTCGAGTACTATGATCAGGATATTT-3'
- E) 5'-GCCTCGAGCATGTTGGTTTCAGACAA-3'
- F) 5'-GCCTCGAGTCCGTGCGCAATTTTAAT-3'

Los dos primeros oligonucleótidos (A y B) fueron utilizados para amplificar el gen *LAC4* entero. El ligamiento con el YEpFLAG1 proporcionó el plásmido que se denominó YEpFLAG1-LAC4. Los oligonucleótidos B y C amplificaron el gen *LAC4* sin los 10 primeros aminoácidos N-terminales (YEpFLAG1-BC). Los oligonucleótidos B y D el gen *LAC4* sin los 25 primeros aminoácidos N-terminales (YEpFLAG1-BD) y por último los oligonucleótidos E y F la región correspondiente al centro activo (YEpFLAG1-EF).

Con las construcciones resultantes se transformó la cepa de *S. cerevisiae* BJ3505 (*pep4::HIS3*, *prb- $\Delta$ 1.6R HIS3*, *lys2-208*, *trp1- $\Delta$ 101*, *ura3-52*, *gal2*, *can1*) cepa haploide deficiente en proteasas debido a las mutaciones *pep4* y *prb1* responsables de la degradación vacuolar en levaduras (Romanos *et al.*, 1992).

K. lactis	M----SCLIP----ENL-----RNPKKVHENRNPTRAYYYD---	28
E. coli	M----T-MIT----DSLAVVLQRR--DWNPGVQTQLNRLAAHPPFASWRN	39
A. niger	MKLSSACAIALLAQAAGASIKHRINGFTLTHESDPAKRELLQKYVTTWDD	50
	* . . . . . * . . . . .	
K. lactis	-----QDI FESLNGPWAFALFDAPLDAPDAKNLDWETAK--KWSTI	67
E. coli	SEEARTDRPSQQLRSLNGEWRFAWFPAPEAVPES----WLECDLPEADTV	85
A. niger	KSLFINGERIMI FSG-----EFHPPRLPVKELQLDIFQ--KVKALGFNCV	93
	. . . . . * * * . . .	
K. lactis	SVP SHWELQEDWKY GKPIYTNVQYPIPIDIPNPPTVNPTGVYARTFELDS	117
E. coli	VVPSNWQMHG--YDAPIYTNVTYPTITVNPFFVPTENPTGCYSLTFNVDE	132
A. niger	SFYVDWALVE---GKP----GEYRADG-----IFDLEP	119
	* . . . . . * . . . . . * . . . . .	
K. lactis	KSIESFEHRLRFEGVDNCELYVNGQYVGFNKGSRNGAEFDIQKYVSEGE	167
E. coli	SWLQEGQTRII FDGVNSAFHLWCNGRWVGYGQDSRLPSEFDLSAFLRAGE	182
A. niger	-----FFDAASEA-GIYLLARPGPYINAESSGGGF--PGWLQRVN	156
	* . . . . . * . . . . . * . . . . .	
K. lactis	NLVVVVKFKWSDSTYIEDQDQWWSGIYRDVSLKLPKKAHIEDVRVTTT	217
E. coli	NRLAVMVLRWSDGSYLEDQDMWRMSGI FRDVSLLHKPT-TQISDFHVATR	231
A. niger	G-----TLRSSDKAYLDATDNY-VSHVAATI AKYQITNGGP IILYQPENE	201
	. . . * . * . . . * . . . . . * . . . . .	
K. lactis	FVDSQYQDAELSVKVDVQGS--SYDHINFTLYEPEDGSKVYDASLLNEE	265
E. coli	F-NDDFSRAVLEAEVQMCGELRDYLRVTVSLWQGET-----QVA	269
A. niger	YTSG-----CSGV-EFPDPVYMQYVEDQARNAGVVIPLINND	237
	. . . . . * . . . . . * . . . . .	
K. lactis	NGN----TTFSTKEFISFSTKKNEETA FKINVKAPEHW-TAENPTLYKYQ	310
E. coli	SGT---APFGG-EIIDERGGYADRVTLRLNVENPKLW-SAEIPNLRYAV	313
A. niger	ASASGNNA PGTKGKGAVDIYG--HDSYPLGFDCANPTVWPSGDLPTNFR-T	284
	. . . . . * . . . . . * . . . . .	
K. lactis	LDLIGSDGSVIQSIKHHVGFQRQVELKDGNI TVNGKDILFRGVNRHDDHPR	360
E. coli	VELHTADGTLIEAEACDVGFRREVRIENGLLLNGKPLLRIGVNRHEHHPL	363
A. niger	LHLEQSPPT-----PYAIVEFQGGSYDPWGGPGFAACSELNNE--	323
	* . . . . . * . . . . . * . . . . .	
K. lactis	FGRAVPLDFVVRDLILMKKFNINAVRNSHYPNHPKVYDLFDKLGFWVIDE	410
E. coli	HGQVMDEQTMVQDILLMKQNNFNAVRC SHYPNHPLWYTLCDRYGLYVVDE	413
A. niger	FERVFYKNDFS FQIAIMNLYMI FGGTNWGNLGPNGYTSYD-----YGS	367
	. . . . . * . . . . . * . . . . .	
K. lactis	ADLETHGVQEPFNRHTNLEAEYPDTKNKLYDVNAHYLSDNPEYEVA--YL	458
E. coli	ANIE THGMV-PMNR-----LTDDPRWLPA--MS	438
A. niger	AVTESRNITREKYSELKLLGNFAK-----VSPGYLTASPGNLTTSGYA	410
	* . . . . . * . . . . . * . . . . .	
<b>BamHI</b>		
K. lactis	DRASQLVLRD VNHP SII IWSLGN EACYGRNHKAMYKLIKQLDPTRLVHYE	508
E. coli	ERVTRMVQRDRNHP SVIIWSLGNESGHGANHDALYRWIKSVDPSPRPVQYE	488
A. niger	DTTDLTVTPLLGNSTG SFF-VVRHSDYSSEESTSYKLRRLPTSAGSVTIPO	459
	. . . . . * . . . . . * . . . . .	
K. lactis	GD---LNALSADIF SFMYP-----TFEIME--RWRKNHTDENGKFEKP	546
E. coli	GGG---ADTTATDIIICPMYARVDEQPPPAVP--KWSIKKWLSPGETRP	533
A. niger	LGGTLTLNGRDSKIHVT DHNVSGTNI IYSTAEVFTWKK-----FADG	499
	. . . . . * . . . . . * . . . . .	
K. lactis	LILCEYG----HAMG---NGPGLKEYQELFYKEKQYGGFIWEW---A	585
E. coli	LILCEYA----HAMG---NSLGGFAKYWQAFRQY PRLQGGFVVDW---V	572
A. niger	KVLVLYGGAGEHHELAISTKSNVTVIEGSESGISSKQTSSSVVVGWDVST	549
	* . . . . . * . . . . . * . . . . .	
<b>BamHI</b>		

K. lactis	NHG-IEFEDVSTADGKGLHKAYAY-GGDFKEEVHDGVFIMDGLCNSEHNPT	633
E. coli	DQSLIKYDENGPNWS-----AY-GGDFGDTPNDRQFCMNGLVFADRTPH	613
A. niger	TRRIIQVGLKILLLLDRNSAYNYWVPLATDGTSPGFST-----PEKVAS	594
	. * . . . . * .. * . . . .	
K. lactis	PGLVEYKVKVIEPVHIAHGSVTITNKHDFITTDHLLF-----	671
E. coli	PALTEAKHQQQFFQFRLSGQTIEVTSEYLFHSDNELLHWMVALDGKPL-	662
A. niger	SIIVKAGYLVRTAYLK--GSGLYLTADFNAATTSVEVI---GVPSTAKNLF	639
	. . . . . * . . . .	
K. lactis	-----IDKDTGKTIDVPSLKPEESVTIPSDT-TYVVAVLKDDAGVL	711
E. coli	-ASGEVPLDVAPQGGKQLIELPELPQPESE---AGQL-WLTVRVVQPNATAW	707
A. niger	INGDKTSHTVDKNGIWSATVDYNAPDISLPSLKDLDWKYVDTLPEIQSSY	689
	. . . . . * . . . .	
K. lactis	K-AGHEIAWGAELPLK---VPDFVTETAEKAAK--INDG---KRYVSV	751
E. coli	SEAGHISAWQWRLAEN---LSVTLPAASHAI PH--LTTSE---EMDFCI	748
A. niger	DDS---LWPAADLKQTKNLTLSLTPPSTSLYSSDYGFHTGYLLYRGHFTA	735
	. . . . . * . . . .	
K. lactis	ESSGLHFILDKLLG--KIESLKVKGKEISS---KFEFS--SITFWRPPTN	794
E. coli	ELGNKRWQFNRSQSG--FLSQMWIGDKK--Q---LLTPL--RDQFTRAPLD	789
A. niger	TGNESTFAIDTQGGSAFGSSVWLNGTYLGSWTGLYANSYDYNATYNLPLQLQ	785
	. . . . . * . . . .	
K. lactis	ND-----EPRDF-KNWKYINIDLKQNIHGVSVKEGKSNGLAVVTV	834
E. coli	NDIGVSEATRIPNAWVERWKAAGHYQAEALLQCTADTLADAVLITTAH	839
A. niger	AGKTYVITVVIDNMGLEENW-TVGEDLMKSP-RGISTSCLPDQG--AAPI	831
	. . . . . * . . . .	
K. lactis	NSRISPVVFFYGFETVQKYTI FANKINLNTSMKLTGEYQPPDFPRVGYEF	884
E. coli	AWQHQGKTL---FISRKYRI-DGSGQMAITVDVEVASDTPHPARIGLNC	885
A. niger	SWKLTGNL-----GGEDYE-----DKVRGPNLEGGLYA----ERQGFH-	865
	. . . . . * . . . .	
K. lactis	WLGDSYESFEWLGRGPGESYPDKKE---SQRFGLYDSKDVVE-----F	924
E. coli	QLAQVAERVNWLGLGQENYPDRLT---AACFDRWDLPLSDM-----Y	925
A. niger	--QPEPPSQNWKSSSPLEGLSEAGIGFYSASFDL-DLPKDGMSHCSSSTSV	912
	. * . . * * . . . . * . . . .	
K. lactis	V-YDYPQENGHTDTHFLNIKFEAGKLSIFQ--KEKPFNFKISDEYGV	971
E. coli	TPYVFPSENGLRGTR--ELNYGPHQWRGDFQ-----FNISRYSQQLM	967
A. niger	TALRHRTACRSTSTDIVCEIHKQHRSTDLPCPRGNP-ELSRNELVGGD	961
	. * . . . . * . . . .	
K. lactis	EAAHADCVKRYGRHYLRDLDAIHGVGSEAC-GPAVLQYRLKAQDFNFEF	1020
E. coli	ETSHRLLHAEEGTWNIDGFHMGIGGDDSWSPVSAEFQLSAGRYHYQL	1017
A. niger	PVALDSAGGKLESLELSYTPVLTALGEV--ESVDQPKYKKRKGAY----	1005
	. . . . . * . . . .	
K. lactis	DLAFE	1025
E. coli	VWCQK	1022
A. niger	-----	

**Figura 3. 10:** Alineamiento proteico de las  $\beta$ -galactosidasas de *K. lactis*, *E. coli* y *Aspergillus niger*. En rojo se muestra el centro activo de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* correspondiente al dominio 3. En azul la región amplificada del *LAC4* para la construcción YEpFLAG1-EF. En gris residuos implicados en el sitio de unión al sustrato. Se indica la localización del sitio de restricción *BamHI* para la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* y de *A. niger*. Los residuos idénticos se han señalado con un asterisco, mientras que los similares se han identificado con un punto.

### 3. 2. 2. Cinética de crecimiento y secreción.

Con los transformantes obtenidos se realizaron cultivos discontinuos en medio YPHSM. La expresión de la  $\beta$ -galactosidasa comienza a partir de las 24 horas de cultivo cuando los niveles de glucosa son bajos pues el promotor *ADH2* es reprimido en presencia de glucosa. Sólo las construcciones con la delección en los 10 primeros aminoácidos en el extremo amino terminal (YE<sub>p</sub>FLAG1-BC), y la que mantenía el gen *LAC4* entero (YE<sub>p</sub>FLAG1-AB), presentaron actividad  $\beta$ -galactosidasa tanto en las células como en el medio de cultivo (Figura 3.11). Al igual que en el caso de la cepa MW190-9B/pSPGK1-LAC4, los mayores porcentajes de secreción se obtuvieron al inicio del cultivo. Se obtuvieron para los dos tipos de transformantes (BJ3505/YE<sub>p</sub>FLAG1-LAC4 y BJ3505/YE<sub>p</sub>FLAG1-BC) un 32% de secreción a las 7 horas de cultivo cuando la actividad intracelular es muy pequeña, bajando hasta el 0,37% a las 24 horas y manteniéndose en torno al 0,06% durante el resto del cultivo. Aunque los porcentajes de secreción fueron bajando, la  $\beta$ -galactosidasa en el medio de cultivo fue aumentando debiéndose el descenso en el porcentaje al incremento de la actividad enzimática en las células. Por tanto, la delección en los 10 primeros aminoácidos de la región amino terminal no mejoró los porcentajes de secreción.

El medio YPHSM mantuvo el pH a las 72 horas de cultivo en torno a 7,03, por tanto no se debe el descenso en el porcentaje de secreción a la variación de pH.

En el análisis mediante *Western-blot* (Figura 3.12) de las proteínas del medio de cultivo recogido a diferentes intervalos de tiempo (y concentrado hasta 5 veces) de la cepa BJ3505/YE<sub>p</sub>FLAG1-BC mostró una



banda que se corresponde con la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*. Esta banda se pudo detectar tanto con los anticuerpos monoclonales contra el epítipo FLAG M1 como con el M2. La detección con el anticuerpo M1 que como se ha comentado únicamente detecta el péptido FLAG cuando está localizado en el extremo amino terminal de la proteína, nos indica que la señal de secreción (el factor  $\alpha$ ) se ha procesado correctamente durante su paso por la vía secretora.

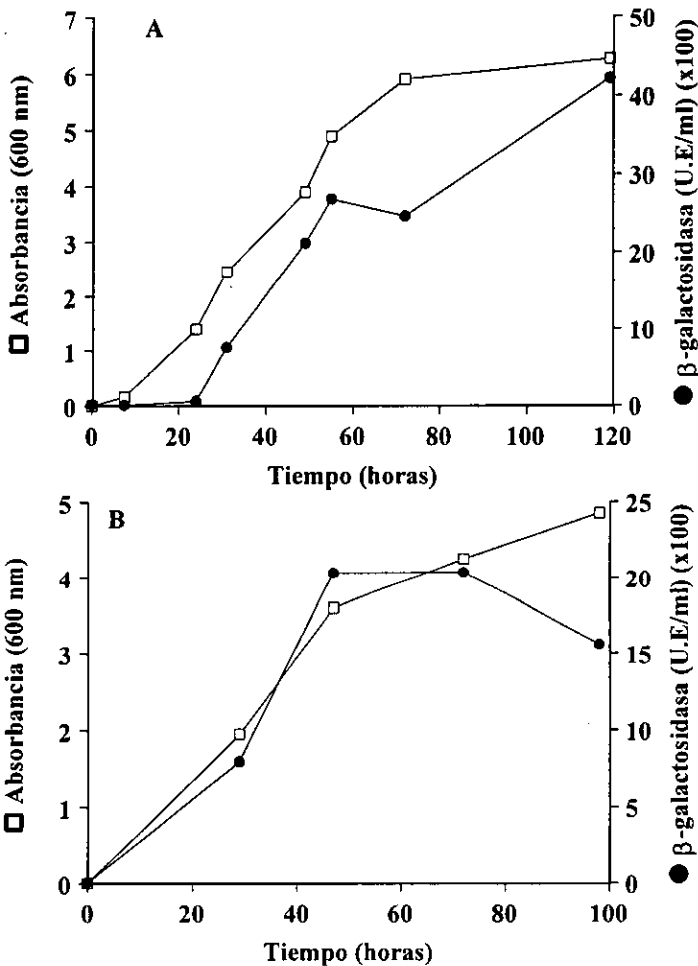
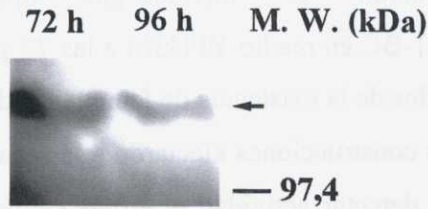


Figura 3. 11: Crecimiento y producción de  $\beta$ -galactosida intracelular por la cepa de *S. cerevisiae* BJ3505/YEpFLAG1-LAC4 (A) y BJ3505/YEpFLAG1-BC (B) en YPHSM.



**Figura 3. 12:** Análisis por *western-blot* de la  $\beta$ -galactosidasa excretada a diferentes horas al medio de cultivo por la cepa de *S. cerevisiae* BJ3505/YEpFLAG1-BC. Se realizó empleando el anticuerpo M1. Se cargaron 7  $\mu$ g de proteína total en la calle correspondiente a las 72 horas y 6  $\mu$ g de proteína total en la calle correspondiente a las 96 horas.

El peso molecular de la  $\beta$ -galactosidasa excretada determinado a partir del *western-blot* fue de aproximadamente 123 kDa, por lo tanto, considerando que cada cadena de oligosacáridos unida a asparragina produce un aumento del peso molecular de 2 kDa a 2,5 kDa (Das *et al.*, 1989), la proteína no parece haber sufrido procesos de glicosilación de alguno de los 7 sitios potenciales de N-glicosilación existentes en ella. Aunque, como se ha comentado en la introducción, algunas de las proteínas heterólogas secretadas por *S. cerevisiae* presentan fenómenos de hiperglicosilación (Müller *et al.*, 1998), también se ha descrito el caso contrario. Así, de los ejemplos de secreción heteróloga de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* por *S. cerevisiae* encontrados en la bibliografía (Tabla 3.3) ninguno de ellos presentó glicosilación de los 5 sitios potenciales de N-glicosilación presentes en la enzima bacteriana (Das *et al.*, 1989). Esto ocurrió tanto para los casos en que la proteína alcanzó el medio extracelular (Rossini *et al.*, 1993; Pignatelli *et al.*, 1998), como para

aquellos en que quedó retenida en el espacio periplásmico (Das *et al.*, 1989; Porro *et al.*, 1992).

La observación al microscopio óptico del cultivo BJ3505/YEpFLAG1-BC en medio YPHSM a las 72 y 96 horas, no mostró evidencias apreciables de la existencia de fenómenos de lisis celular.

Las otras dos construcciones afectaron a la actividad  $\beta$ -galactosidasa ya que no se pudo detectar actividad ni en las células ni en el medio de cultivo. Uno de los mutantes mediante delección de los residuos 11-41 descritos para la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* da una proteína inactiva y dimérica (Jacobson *et al.*, 1994). Esta región en la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* parece participar en contactos con los dominios (1, 2 y 3) del mismo monómero, así como con otros monómeros de la misma proteína. Algo similar podría estar sucediendo con la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*. Por tanto, parece que no hay una fracción de proteína grande que se pueda eliminar sin tener un efecto grave en la actividad  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*.

### 3. 3. CAMBIOS EN LA ESTABILIDAD PROTEICA.

La vida media de las proteínas en el interior de una célula varía desde unos pocos minutos hasta varias semanas. La expresión de proteínas de vida corta o que son secretadas de una manera natural, como la insulina, en levaduras da bajos rendimientos. En algunos casos la fusión a proteínas más estables aumenta el nivel de acumulación en levaduras (Romanos *et al.*, 1992). Existen diferentes vías para la degradación de proteínas y por tanto, hay múltiples determinantes moleculares que confieren inestabilidad.

La degradación vacuolar es responsable de la renovación no selectiva de las proteínas de vida larga (más de 160 horas), mientras que las proteínas de vida corta (vida media menor de 2,5 horas) son degradadas en el citosol (Romanos *et al.*, 1992). Las proteínas que van a ser destruidas en el citosol son marcadas mediante la unión covalente a la ubiquitina y posteriormente hidrolizadas por el proteosoma en una manera dependiente de ATP (Bonifacino y Weissman, 1998; Hershko y Ciechanover, 1998). De acuerdo con algunos estudios de degradación de proteínas, la vida media de una proteína madura viene determinada, al menos en parte, por su aminoácido N-terminal. Este fenómeno se conoce como la regla del extremo N-terminal. Así, la vida media de una proteína madura en *S. cerevisiae* cuyo extremo N-terminal es serina, alanina o treonina es mayor de 20 horas, mientras que la vida media de una proteína madura cuyo residuo N-terminal sea fenilalanina, leucina, lisina, triptófano o arginina es de sólo 2 a 3 minutos (Varshavsky, 1996).

### 3. 3. 1. Diseño de la construcción.

Con la intención de obtener una  $\beta$ -galactosidasa más estable y comprobar si eso afectaba al nivel de secreción, se diseñó una nueva construcción. Se utilizó el plásmido pSPGK1 (Figura 3.1), que se digirió con *EcoRI*, se trató con la nucleasa *S1* para eliminar los extremos protuberantes y se le insertó el siguiente oligonucleótido sintético que contiene un sitio *XhoI*:

*XhoI*  
5'-ATCCCTCGAG-3'  
3'-TAGGGAGCTC-5'

Se determinó mediante secuenciación la correcta inserción del oligonucleótido.

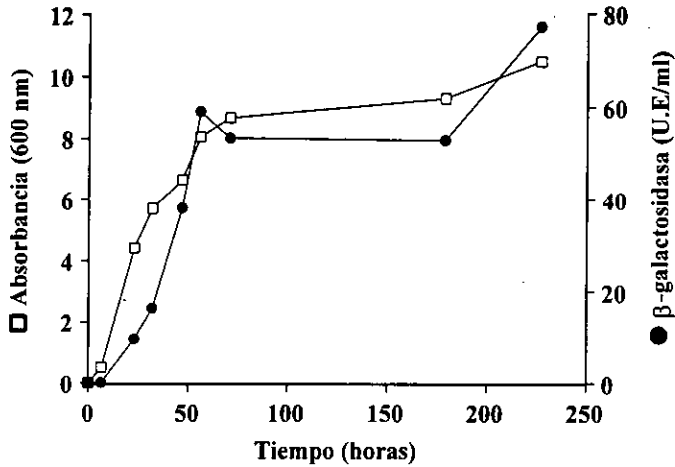
La amplificación del gen *LAC4* se realizó mediante PCR empleando los oligonucleótidos A y B ya descritos. El plásmido resultante se denominó pSPGK1-Ser-LAC4; con esta construcción se añaden tres aminoácidos más a la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* en el extremo N-terminal Ser-Leu-Glu. La proteína tras el procesamiento de la señal de secreción y el corte con la endopeptidasa *Kex1* de *K. lactis* del dipéptido Lys-Arg quedaría con el aminoácido serina en el extremo N-terminal, que es un aminoácido estabilizante.

Con la construcción obtenida se transformó la cepa de *K. lactis* MW190-9B y se determinó la cinética de crecimiento y secreción.

### 3. 3. 2. Cinética de crecimiento y secreción.

Se realizaron cultivos discontinuos en medio YPD del transformante MW190-9B/pSPGK1-Ser-LAC4 (Figura 3.13). El añadir un aminoácido estabilizante al extremo N-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* no incrementó el porcentaje de secreción. De nuevo los mayores porcentajes de secreción (56%) se obtuvieron al inicio del cultivo, a las 24 horas, disminuyendo posteriormente al aumentar la actividad intracelular.

Como se ha comentado anteriormente existen diferentes vías implicadas en la degradación de las proteínas y por tanto existen múltiples señales que pueden ser importantes a la hora de mejorar la estabilidad de una proteína. Además la vida media de diferentes proteínas con el mismo aminoácido N-terminal puede diferir considerablemente (Varshavsky, 1996).



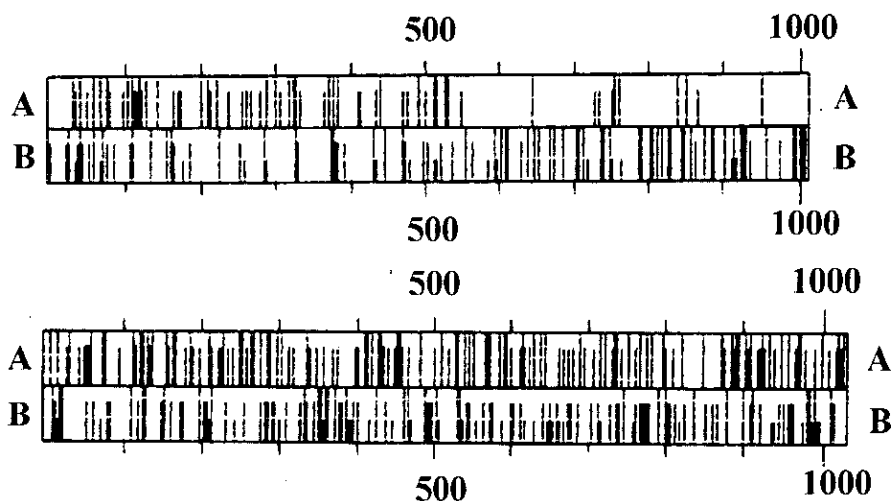
**Figura 3. 13:** Crecimiento y producción de  $\beta$ -galactosidasa intracelular por la levadura MW190-9B/pSPGK1-Ser-LAC4 en YPD.

### 3. 4. CONSTRUCCIÓN DE PROTEÍNAS HÍBRIDAS.

La secreción de proteínas heterólogas, además de la importancia de la composición del medio, condiciones de cultivo y fase de crecimiento, depende de determinantes estructurales que posiblemente, a través de la interacción con receptores específicos, dirigen la proteína hacia el exterior celular. La capacidad de las proteínas para atravesar la pared celular depende de muchos factores como el tamaño, la estructura tridimensional, la carga de la proteína, punto isoelectrico, glicosilación, etc (De Nobel *et al.*, 1990 a, b y 1991; Soo-Wan *et al.*, 1993). Dado que varios determinantes estructurales, presentes en la proteína, pueden ser necesarios para dirigir una proteína al medio de cultivo, la construcción de una proteína híbrida entre la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* y otra proteína

extracelular relacionada como la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus niger* podría incrementar la fracción de enzima que alcanza el medio de cultivo.

La  $\beta$ -galactosidasa de *A. niger* presenta una distribución de aminoácidos ácidos y básicos diferente a la de *K. lactis* y que se caracteriza porque en la mitad C-terminal de la proteína predominan los aminoácidos básicos mientras que en *K. lactis* la distribución de aminoácidos ácidos y básicos es equilibrada a lo largo de toda la molécula (Figura 3.14). Esto podría facilitar la secreción de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. niger*. La carga de los aminoácidos parece tener importancia en la localización de proteínas de membrana y de proteínas que se van a secretar (Boyd y Beckwith, 1990). Por tanto, se diseñó una nueva construcción intercambiando la mitad C-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* por la de *A. niger*.

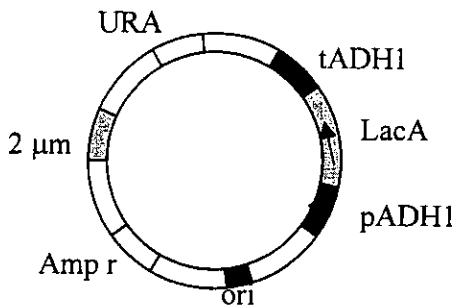


**Figura 3. 14:** Análisis de los aminoácidos ácidos (A) y básicos (B) de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. niger* (esquema superior) y de *K. lactis* (esquema inferior).

### 3. 4. 1. Diseño de la construcción.

La presencia de un único sitio *Bam*HI en la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* y otro en la de *A. niger* nos sirvió para nuestros objetivos. Ambos cortan aproximadamente en la mitad de la molécula en la región equivalente al dominio 3 de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* que es donde se localiza el centro activo (Figura 3.10). Se digirió el plásmido pSPGK1-Ser-LAC4 con *Bam*HI y se eliminó el fragmento *Bam*HI que contiene la mitad C-terminal del *LAC4* y el terminador.

El gen *LACA* que codifica la  $\beta$ -galactosidasa de *A. niger* se encuentra clonado dentro del plásmido pVK1.1 (Kumar *et al.*, 1992) (Figura 3.15).



**Figura 3. 15:** Plásmido pVK1.1. p=promotor. t=terminador. ADH1=alcohol deshidrogenasa de levadura. LacA=gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. Niger*. Ori=origen de replicación en bacterias. Amp r=gen de resistencia a la ampicilina. 2  $\mu$ m=origen de replicación en *S. cerevisiae*. URA3=marcador de selección en levaduras.

La amplificación del extremo C-terminal del gen *LACA* se realizó mediante los siguientes oligonucleótidos contruidos a partir de la secuencia del gen *LACA* (Kumar *et al.*, 1992) y que contienen en sus extremos el sitio *Bam*HI:





Los oligonucleótidos se diseñaron de manera que quedasen en la pauta de lectura correcta con la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* y que se amplificase la mitad C-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. niger* y el terminador ADH1 del plásmido pVK1.1.

El ligamiento del plásmido pSPGK1-Ser-LAC4 digerido con *Bam*HI con el fragmento *Bam*HI amplificado del pVK1.1 dio como resultado el plásmido pSPGK1-LAC4-LACA que se utilizó para transformar la cepa de *K. lactis* MW190-9B.

### 3. 4. 2. Cinética de crecimiento y secreción.

Se realizaron cultivos discontinuos del transformate MW190-9B/pSPGK1-LAC4-LACA en medio YPD (Figura 3.16). Es destacable el hecho de que se pudo detectar actividad enzimática en las células, siendo unas 33 veces menor a las 81 horas que la que mostró la cepa MW190-9B/pSPGK1-Ser-LAC4 en el mismo medio. Además el porcentaje de secreción desde las 48 a las 54 horas se mantuvo en torno al 38%, disminuyendo al 15% a las 72 horas y al 4% a las 81 horas.

Para comprobar que la actividad enzimática intracelular era debida a la construcción y no a una actividad  $\beta$ -galactosidasa residual de la cepa de *K. lactis* MW190-9B, se realizaron cultivos de esta última en YPD, obteniendo niveles de actividad intracelular 25 veces inferior a las 81 horas con respecto a la cepa MW190-9B/pSPGK1-Ser-LAC4-LACA. Por tanto, se puede descartar que toda la actividad enzimática detectada en la cepa MW190-9B/pSPGK1-Ser-LAC4-LACA sea una actividad remanente de la cepa MW190-9B, debiéndose la mayor parte de la actividad a la proteína híbrida.

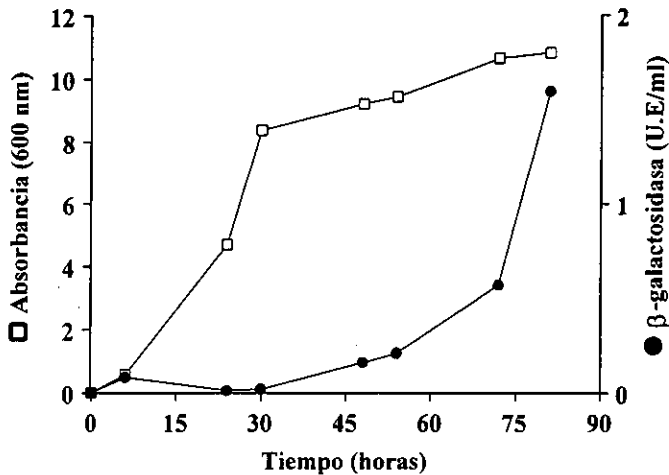


Figura 3. 16: Crecimiento y producción de  $\beta$ -galactosidasa intracelular por la levadura MW190-9B/pSPGK1-LAC4-LACA en YPD.

La construcción de una proteína híbrida entre la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* y la de *A. niger* aunque disminuye los valores de actividad enzimática en el interior celular, efecto que no parece sorprendente ya que estamos eliminando aproximadamente la mitad del centro activo de la proteína y reemplazándolo por otro, parece mejorar ligeramente los porcentajes de secreción con respecto a los conseguidos por la misma cepa transformada con el plásmido pSPGK1-Ser-LAC4. La región C-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. niger* parece complementar en cierta medida la delección sufrida por la de *K. lactis*.

En la actualidad se están planificando nuevas proteínas híbridas que comprenden un fragmento más pequeño de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. niger*, y por tanto una delección menor de la proteína de *K. lactis*. Esta nueva proteína podría mantener la actividad enzimática e incrementar los porcentajes de secreción.

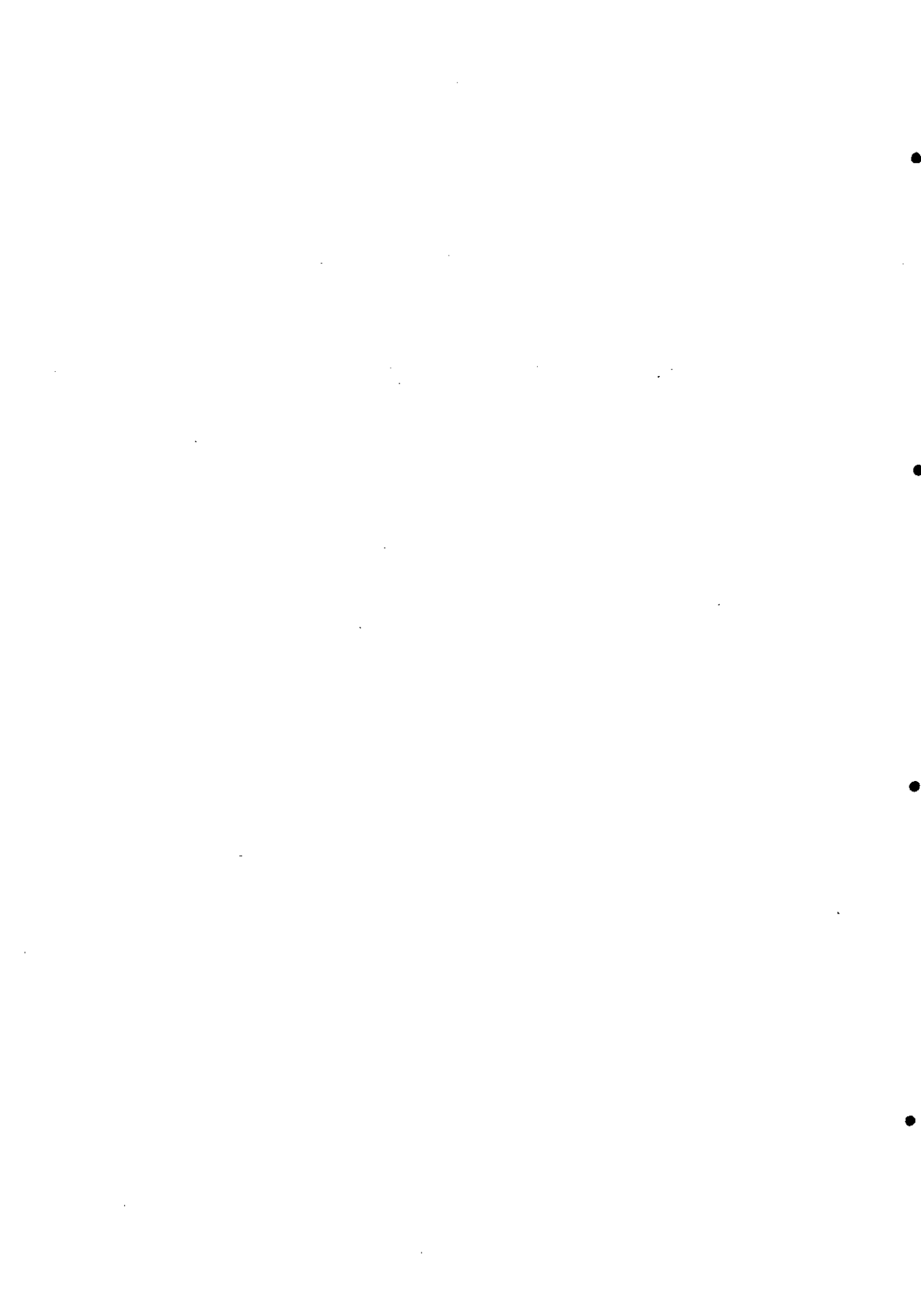
Como se ha comentado, la posibilidad de secreción de proteínas heterólogas ha estimulado los estudios sobre la utilización de diferentes levaduras como hospedadores de secreción de proteínas con interés industrial. Sin embargo, la mayoría de las proteínas secretadas resultan ser pequeños polipéptidos o proteínas de naturaleza extracelular en origen (Tabla 1 de la introducción). Durante esta última década se han venido realizando intentos para secretar  $\beta$ -galactosidasas provenientes de diferentes fuentes (Tabla 3.3). De los resultados obtenidos por los distintos autores, cabe concluir que es una empresa difícil para una proteína tan grande. Rossini *et al.*, (1993) consiguieron en el mejor de los casos un 33% de secreción utilizando para ello condiciones de cultivo específicas como: el empleo de temperaturas altas, la presencia de agentes reductores y el crecimiento en medios ricos. Kumar *et al.*, (1992), obtuvieron porcentajes de secreción del 40% para una proteína que es excretada de manera natural al medio de cultivo.

Tabla 3. 3: Secreción heteróloga de la  $\beta$ -galactosidasa de distintas fuentes por *Saccharomyces cerevisiae* empleando diferentes señales de secreción.

Origen <sup>a</sup>	Tamaño (kDa)	Señal secreción	% Secreción <sup>b</sup>	Referencia
<i>Escherichia coli</i> (I)	116	glucoamilasa	1%	Vanoni <i>et al.</i> , 1989
		Factor $\alpha$ mating	(P)	Das <i>et al.</i> , 1989
		Glucoamilasa	(P)	Porro <i>et al.</i> , 1992
		Glucoamilasa	33%	Rossini <i>et al.</i> , 1993
		Ggpl	1,6%	Pignatelli <i>et al.</i> , 1998
<i>Aspergillus niger</i> (E)	110	Nativa	40%	Kumar <i>et al.</i> , 1992

<sup>a</sup> Se indica entre paréntesis la localización natural de la proteína, (I) intracelular, (E) extracelular. <sup>b</sup> Porcentaje de secreción al medio extracelular. (P) localización periplasmática de la proteína secretada.

Los porcentajes de secreción homóloga de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* alcanzados mediante las diferentes estrategias empleadas en este trabajo (en torno al 10% en la fase estacionaria) son equiparables e incluso mejores a los obtenidos por otros autores mediante secreción heteróloga.



#### 4. SECRECIÓN DE $\beta$ -GALACTOSIDASA POR MUTANTES DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Recientemente se ha desarrollado un sistema para liberar proteínas producidas intracelularmente, basado en la utilización de cepas de levadura que lisan a temperaturas no permisivas debido a la expresión de mutaciones que traen consigo la formación de una pared celular alterada. Constituye una alternativa interesante a la producción de proteínas intracelulares y facilita su procesamiento posterior (Fuente *et al.*, 1993; Álvarez *et al.*, 1994, Becerra *et al.*, 1997). Se ha probado su utilidad en la liberación, después de un aumento de temperatura, de proteínas tanto homólogas (fosfatasa alcalina) como heterólogas (cloranfenicol acetil transferasa) (Álvarez *et al.*, 1994), incluyendo moléculas tan grandes como las partículas parecidas a virus (*virus-like particles*, VLPs) de 60 nm de tamaño, mediante choque osmótico (Álvarez *et al.*, 1995).

Por otra parte, también se ha desarrollado un sistema para incrementar la producción de proteínas heterólogas y estudiar los mecanismos de secreción proteica en levaduras que se basa en el uso de cepas que muestran un fenotipo super-secretor. Así, cepas de *S. cerevisiae* que presentan la mutación *ssc1* han resultado eficaces en la secreción de proteínas de mamífero como la proquimosina bovina, la hormona de crecimiento bovino (Smith *et al.*, 1985) y la pro-uroquinasa humana (Melnick *et al.*, 1990).

Con la intención de mejorar los porcentajes de secreción obtenidos se emplearon estos dos tipos de mutantes de *S. cerevisiae* para la producción heteróloga de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*.

#### 4. 1. UTILIZACIÓN DE MUTANTES QUE LISAN A TEMPERATURAS NO PERMISIVAS.

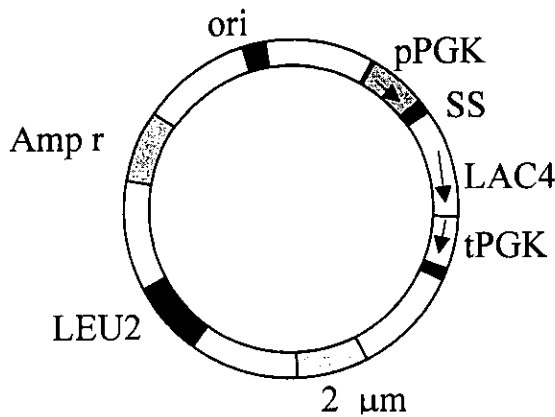
Se han usado las siguientes cepas de *S. cerevisiae*: LD1 (MATa/MAT $\alpha$ , *lyt2-1/lyt2-1*, *leu2-3.112/leu2-3.112*, *his4 $\Delta$ 34/his4 $\Delta$ 34*) es una cepa diploide homocigótica para el alelo mutante *lyt2-1* que determina la autólisis de las células cuando crecen a la temperatura no permisiva de 37°C (Torres *et al.*, 1991; Fuente *et al.*, 1993) y LHDP1 (MATa, *lyt2-1*, *ade2*, *leu2-3.112*, *pep4::HIS3*, *prb1 $\Delta$ 1.6R*) cepa haploide deficiente en proteasas debido a las mutaciones *pep4* y *prb1* (Romanos *et al.*, 1992) que también presenta el alelo mutante *lyt2-1*.

Estas cepas fueron transformadas con el plásmido YEplac181-LAC4 que presenta un fragmento de 5 kb que contiene la señal de secreción que corresponde a la pre-secuencia (16 aminoácidos) de la subunidad  $\alpha$  de la toxina *killer* de *K. lactis* y el gen *LAC4* que codifica la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* flanqueado por el promotor constitutivo y el terminador de la fosfoglicerato quinasa (*PGK*) de *S. cerevisiae*. Este fragmento fue insertado en el sitio de clonaje múltiple del YEplac181 (Figura 4.1).

##### 4. 1. 1. Liberación de proteínas por choque térmico.

Se determinó, en las dos cepas transformadas, la liberación de  $\beta$ -galactosidasa después de la expresión del fenotipo lítico inducido por un aumento en la temperatura de los cultivos de 25 a 37°C (Figura 4.2). Ambas cepas transformadas crecieron de una manera estable a 25°C y la actividad  $\beta$ -galactosidasa extracelular se detectó entre unos porcentajes del 2,7% al inicio del cultivo y el 0,37% al finalizar el cultivo.

La determinación de la estabilidad plasmídica de las dos cepas transformadas creciendo en YPD (este medio no selectivo permitió un rápido crecimiento y por lo tanto una producción superior de  $\beta$ -galactosidasa y una expresión más fuerte del fenotipo lítico) dio como resultado al final de los cultivos, una estabilidad cercana al 70% para la cepa LHDP1/YEplac181-LAC4 y próxima al 80% para la cepa LD1/YEplac181-LAC4.

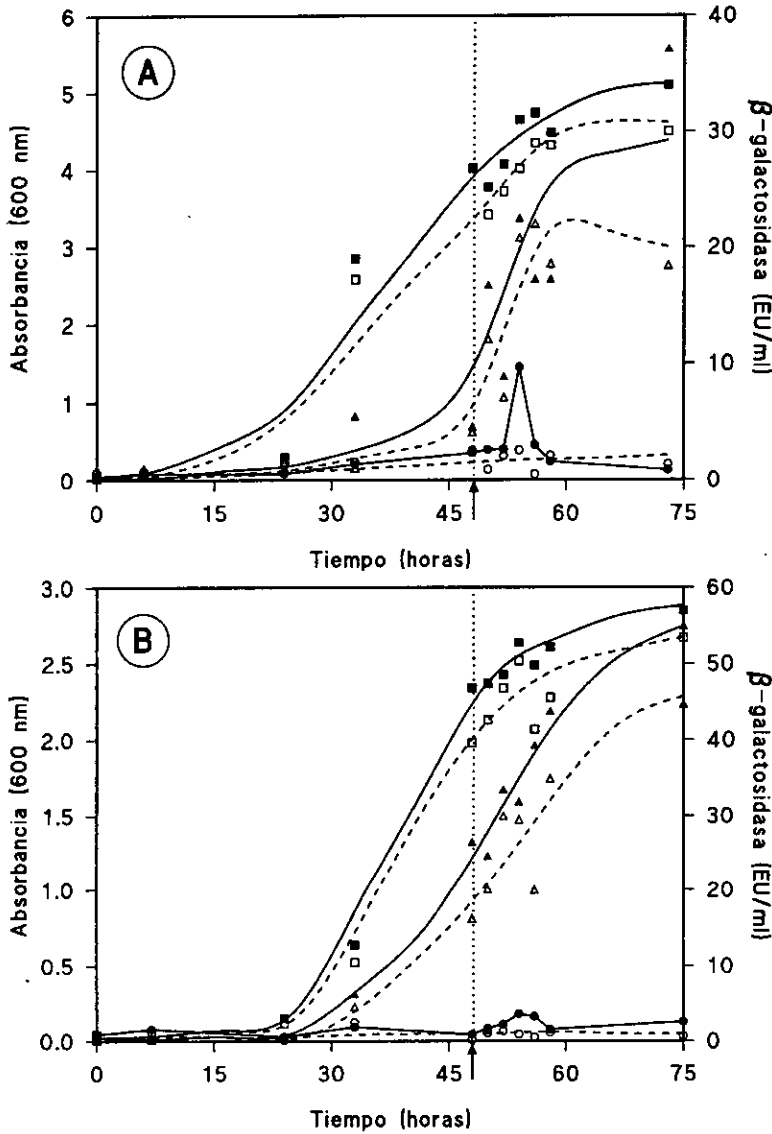


**Figura 4. 1:** Plásmido YEplac181-LAC4. SS=señal de secreción. PGK=Fosfoglicerato quinasa. p=Promotor. T=Terminador. LAC4=gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*. 2  $\mu$ m=origen de replicación en *S. cerevisiae*. LEU2=marcador auxotrófico. Amp r=gen que confiere resistencia a la ampicilina. ori=origen de replicación bacteriano.

Se observó una acumulación intracelular de  $\beta$ -galactosidasa asociada al crecimiento, como cabía esperar de una proteína expresada bajo un promotor constitutivo. Los niveles intracelulares de actividad enzimática fueron 3,5 veces superiores en la cepa LHDP1/YEplac181-LAC4 que en la cepa LD1/YEplac181-LAC4. Esto se puede atribuir a una reducción de la degradación de la  $\beta$ -galactosidasa debido a las mutaciones *pep4* y *prb1* más



que a un incremento en la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa (la estabilidad del plásmido fue ligeramente superior en la cepa LD1).



**Figura 4. 2:** Producción de  $\beta$ -galactosidasa intracelular y liberación después de un incremento de temperatura de 25°C a 37°C (símbolos en negro y línea continua) por las cepas de *S. cerevisiae* LD1/YEplac181-LAC4 (A) y LHDP1/YEplac181-LAC4 (B). El momento en que se realizó el cambio de temperatura está indicado por una flecha. Se mantuvo un cultivo control a 25°C (símbolos en blanco y línea discontinua). Cuadrados: medida del crecimiento a 600 nm de absorbancia. Triángulo: Actividad  $\beta$ -galactosidasa intracelular. Círculo: Actividad  $\beta$ -galactosidasa en el medio de cultivo, estos valores de actividad están multiplicados por cinco.

Cuando los cultivos alcanzaron un valor de absorbancia a 600 nm de 2 en el caso de la cepa LHDP1 y de 4 en la cepa LD1, se aumentó la temperatura a 37°C para conseguir la expresión del fenotipo mutante (Figura 4.2). Como se describe en Fuente *et al.* (1993), a las 8 horas después del cambio de temperatura, los valores de absorbancia continúan incrementando a pesar de que la viabilidad celular disminuye un 20% de sus valores iniciales. Es probable que una fracción de la población celular siga creciendo mientras que otra esté presumiblemente lisando, debido a una respuesta diferente atribuible al estado fisiológico heterogéneo de las células en el momento del cambio de temperatura. Esta expresión no sincronizada del fenotipo mutante trae consigo una población de células parcialmente lisadas.

Hasta las 6 horas después del cambio de temperatura, los niveles de actividad enzimática extracelular se incrementaron ligeramente (cerca de cuatro veces si se comparan con un cultivo control a 25°C) pero aún tras el aumento, la actividad extracelular representó menos del 10% de los valores intracelulares, observándose un posterior decrecimiento en los valores de actividad extracelular hasta alcanzar de nuevo los valores iniciales. Esto se puede atribuir, al menos en parte, a la liberación de proteasas vacuolares y a la consiguiente degradación proteolítica (Fuente *et al.*, 1993, Álvarez *et al.*, 1994), ya que este efecto fue más pronunciado en el caso de la cepa LD1/YEplac181-LAC4.

Los bajos valores de  $\beta$ -galactosidasa liberada después de la lisis inducida por el cambio de temperatura pueden ser también atribuibles a la desnaturalización enzimática debido a la temperatura y al pH del medio. La vida media de la  $\beta$ -galactosidasa purificada de *K. lactis* a 40°C se estimó que estaba comprendida entre 1,6 minutos en agua destilada y 146 minutos en tampón fosfato-K<sup>+</sup>, pH 7,3 (Cavaille y Combes, 1995). También, como

se ha comentado anteriormente, valores de pH por debajo de 6,5 o por encima de 7,5 causan un descenso en la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* (Siso y Doval, 1994). Por tanto, durante varias horas a 37°C y a un pH inadecuado puede destruirse una parte considerable de la actividad enzimática. Para comprobar si el pH de los cultivos tuvo alguna influencia en la baja actividad  $\beta$ -galactosidasa en el medio de cultivo después de que la temperatura se aumentó a 37°C, se realizó un nuevo cultivo de la cepa deficiente en proteasas LHDP1/YEplac181-LAC4 en un fermentador con un volumen de trabajo de 2 litros, a 25°C y manteniendo el pH a 7,0. Cuando se alcanzó una absorbancia a 600 nm de 4,5 se cambió la temperatura a 37°C. Los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa en el medio de cultivo después del cambio de temperatura, de nuevo, no sobrepasaron el 10% de los valores intracelulares. Sin embargo a pH 7,0 el descenso en actividad  $\beta$ -galactosidasa después del pico conseguido en el medio a 37°C fue menos brusco (Figura 4.3).

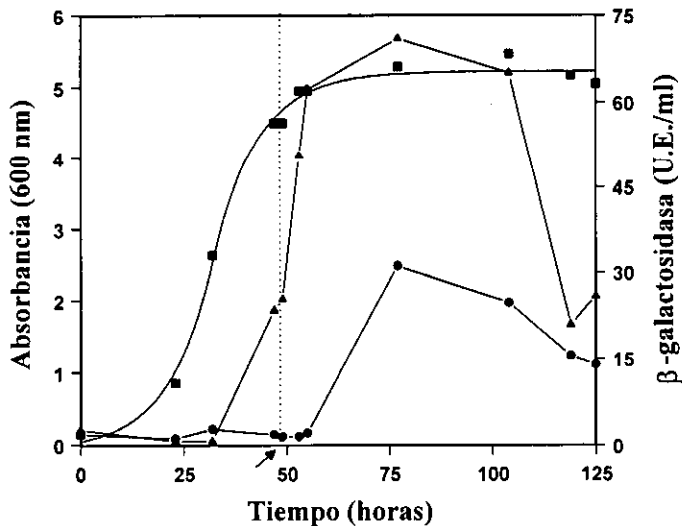
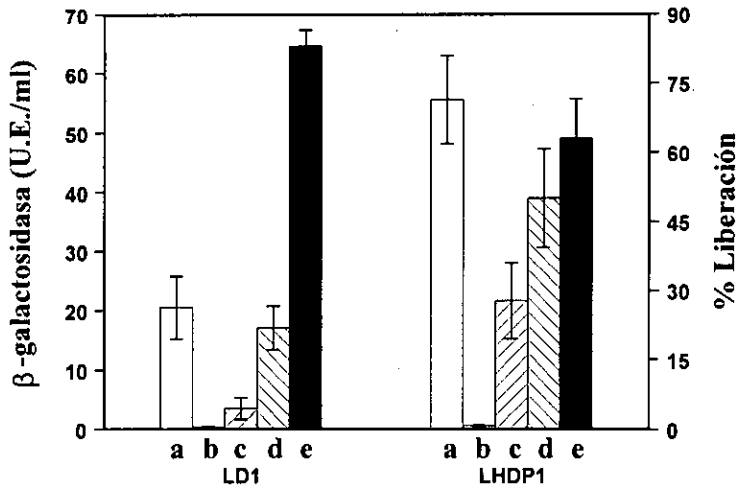


Figura 4. 3: Producción de  $\beta$ -galactosidasa intracelular y liberación después de un incremento de temperatura de 25°C a 37°C (indicado por una flecha y una línea vertical discontinua) por la cepa de *S. cerevisiae* LHDP1/YEplac181-LAC4 en un cultivo en fermentador en el cual el pH se mantuvo a 7,0. Los símbolos son iguales que en la figura 4.2. Los datos de actividad  $\beta$ -galactosidasa extracelular están multiplicados por 5.

#### 4. 1. 2. Liberación de proteínas por choque osmótico.

El fenotipo lítico sensible a la temperatura determinado por *lyt2-1* puede ser complementado mediante estabilización osmótica con sorbitol (Álvarez *et al.*, 1995). Para examinar la posibilidad de alcanzar una liberación proteica mediante un tratamiento tan simple como un choque osmótico, se incubaron las dos cepas transformadas en YPD a 37°C pero protegidas con sorbitol 1 M. Cuando se alcanzó una absorbancia a 600 nm de 2,6 a 2,9, las células se precipitaron por centrifugación y se resuspendieron en un volumen igual de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, determinándose la actividad  $\beta$ -galactosidasa antes y después del choque osmótico (Figura 4.4).



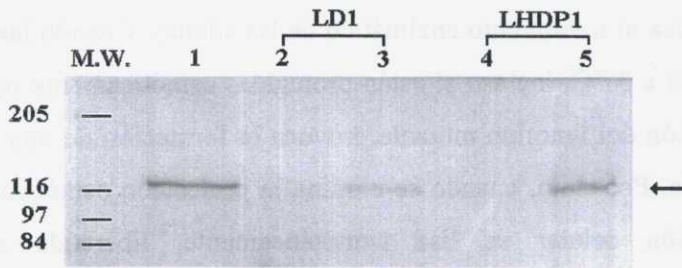
**Figura 4. 4:** Liberación de  $\beta$ -galactosidasa intracelular por las cepas de *S. cerevisiae* LD1/YEplac181-LAC4 y LHDP1/YEplac181-LAC4 después de un choque osmótico. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó: (a) en células creciendo a 37°C en presencia de sorbitol 1 M, (b) en el medio de cultivo protegido osmóticamente, (c) en células después del choque osmótico, (d) en el sobrenadante después del choque osmótico, (e) porcentaje de  $\beta$ -galactosidasa liberada. Los valores representan la media de 7 (LD1) y 10 (LHDP1) cultivos diferentes. Las comparaciones están basadas en el *test t* de Student a un nivel de significación del 95%.

En el medio de cultivo antes del choque osmótico se detectaron porcentajes del 0,37% de actividad  $\beta$ -galactosidasa. De nuevo, los niveles intracelulares de actividad enzimática fueron superiores en el caso de la cepa LHDP1/YEplac181-LAC4 que en el caso de la cepa LD1/YEplac181-LAC4. Después del choque osmótico, se determinó un 63% de actividad  $\beta$ -galactosidasa liberada en el medio hipotónico para el caso de la cepa LHDP1/YEplac181-LAC4, y un 83% para la cepa LD1/YEplac181-LAC4. Las determinaciones de actividad enzimática estuvieron en consonancia con las medidas de concentración proteica en el medio de cultivo.

Estos resultados sugieren que el choque osmótico aplicado a las cepas de *S. cerevisiae* LHDP1 y LD1 se puede usar para la liberación de proteínas intracelulares heterólogas de elevado peso molecular con buenos rendimientos. Aunque la cepa deficiente en proteasas, LHDP1, presentó una proporción de proteína liberada un 20% menor que la cepa LD1, demostró ser más eficiente que esta última, porque mantuvo unos niveles intracelulares de proteína heteróloga unas 3,5 veces superiores, siendo, por tanto, los valores absolutos de proteína extracelular (liberada) después del choque osmótico cerca de 3 veces superiores.

Para la identificación positiva de la actividad  $\beta$ -galactosidasa encontrada en los sobrenadantes de lisis de las cepas de *S. cerevisiae* como el producto del gen *LAC4*, se realizó un análisis por *Western-blot* (Figura 4.5). Se detectó, en geles de SDS-PAGE, una banda con la misma movilidad electroforética que la  $\beta$ -galactosidasa purificada de *K. lactis*, en extractos celulares obtenidos mediante tratamiento con ultrasonidos de las cepas LD1/YEplac181-LAC4 y LHDP1/YEplac181-LAC4. No se pudo detectar ninguna banda en el medio extracelular de las mismas cepas creciendo a 37°C en presencia de sorbitol. Sin embargo, cuando las células

de ambas cepas creciendo en el medio estabilizado osmóticamente fueron transferidas a un medio hipotónico, se confirmó la liberación de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* por la aparición de una banda en el análisis del *Western-blot*.



**Figura 4. 5:** Análisis por *western-blot* de la  $\beta$ -galactosidasa producida por las cepas de *S. cerevisiae* LD1/YEplac181-LAC4 y LHDP1/YEplac181-LAC4 y liberación por choque osmótico. Medio de cultivo antes (calles 2, 4) y después (calles 3, 5) del choque osmótico. Control de la  $\beta$ -galactosidasa purificada de extractos crudos de *K. lactis* por cromatografía de afinidad (calle 1). Se cargaron 20  $\mu$ g de proteína total en la calle 1 para la electroforesis, 45  $\mu$ g en las calles 3, 5 y 85  $\mu$ g en las calles 2, 4.

De estos datos se puede deducir que la utilización de las cepas de *S. cerevisiae* LD1 y LHDP1 para la liberación de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*, después de la expresión del fenotipo lítico por aumento de la temperatura, no tiene apenas ningún efecto sin la realización de un choque osmótico. Esto es plausible porque la población celular lisa sólo parcialmente de una manera asincrónica después del cambio de temperatura. Las proteínas liberadas se mantienen a 37°C durante varias horas en el medio de cultivo, degradándose en función de su estabilidad relativa. Por tanto, la inducción de la expresión del fenotipo lítico únicamente mediante un aumento de temperatura, aunque se aplicó con éxito a la liberación de proteínas heterólogas de hasta 25 kDa (Álvarez et

al, 1994), no se puede generalizar a proteínas relativamente inestables con pesos moleculares superiores como hemos visto en este capítulo. No obstante, la liberación mediante choque osmótico constituye una manera fácil y eficiente de obtener altos rendimientos de  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* en el medio extracelular sin necesidad de realizar ninguna rotura mecánica ni tratamiento enzimático de las células. Cuando las levaduras se cultivan a 37°C, incluso si están protegidas osmóticamente por sorbitol, la expresión del fenotipo mutante provoca la formación de una pared celular alterada. Por tanto, cuando se elimina la protección osmótica, casi toda la población celular se lisa simultáneamente, liberando el contenido intracelular. Esto facilita la recuperación de la proteína que se puede mantener a bajas temperaturas, a un pH adecuado y protegida de la degradación. Además, el uso de la cepa LHDP1 hace posible obtener niveles absolutos de proteína mayores y también minimiza posteriores reacciones proteolíticas. La utilización de este sistema parece particularmente interesante para proteínas como la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*, ya que las preparaciones comerciales presentan un costo añadido importante debido a los procesos de extracción y a la baja estabilidad.

#### 4. 2. UTILIZACIÓN DE CEPAS SUPER-SECRETORAS.

Se han usado las siguientes cepas de *S. cerevisiae* con un fenotipo super-secretor: CGY1463 (MAT $\alpha$ , *ura3-52*, *leu2-3.112*, *pep4-3*, *ssc1-1*, *ssc2-1*, GAL<sup>+</sup>), CGY1465 (MAT $\alpha$ , *ura3-52*, *leu2-3.112*, *ssc1-1*, GAL<sup>+</sup>), CGY1468 (MAT $\alpha$ , *ura3-52*, *leu2-3.112*, *pep4-3*, *ssc2-1*, GAL<sup>+</sup>) y CGY1585 (MAT $\alpha$ , *ura3-52*, *leu2-3.112*, *ssc1-1*, gal<sup>-</sup>). Estas cepas fueron

transformadas con el plásmido YEplac181-LAC4 (Figura 4.1). Como cepa control se utilizó la CGY339 (MAT $\alpha$ , *ura3-52*, *his4-29*, *pep4-3*, GAL<sup>+</sup>) transformada con el plásmido pSPGK1-LAC4 (Figura 3.3) al que previamente se le insertó el fragmento de 1,9 kb conteniendo el 2 *micron* para la replicación en *S. cerevisiae*. Los intentos de transformación con este último plásmido de las 4 cepas de *S. cerevisiae* con el fenotipo supersecretor resultaron infructuosos, no pudiéndose precisar con certeza la causa de ello.

Se realizaron cultivos en medio YPD a 30°C determinando la actividad  $\beta$ -galactosidasa tanto intracelular como extracelular. Al igual que en las cepas que lisan a temperaturas no permisivas se observó una acumulación de la actividad enzimática intracelular asociada al crecimiento, presentando de 1,3 a 2 veces mayor actividad intracelular aquellas cepas con la mutación *pep4-3* probablemente debido a una reducción en la degradación de la  $\beta$ -galactosidasa.

Los porcentajes de secreción a las 48 horas pueden verse en la tabla 4.1. A partir de este período de tiempo, los porcentajes de secreción disminuyeron en todos los casos, pero manteniendo la proporción entre las diferentes cepas ensayadas.

**Tabla 4. 1:** Porcentaje de actividad enzimática secretada por los mutantes supersecretores a las 48 horas de cultivo en medio YPD.

	Cepa	Genotipo	% Secreción enzimática
1	CGY339	Silvestre	0,45%
2	CGY1463	<i>Ssc1-1, ssc2-1</i>	1,04%
3	CGY1465	<i>Ssc1-1</i>	0,67%
4	CGY1468	<i>Ssc2-1</i>	0,49%

Al igual que para el caso de la pro-uroquinasa humana (Melnick *et al.*, 1990), aunque los valores obtenidos en este trabajo son muy bajos, la mutación *ssc1-1* parece promover más eficientemente la secreción que la



mutación *ssc2-1*. Además como describió Smith *et al.* (1985) el efecto de las mutaciones *ssc1-1* y *ssc2-1* parece ser aditivo, así el doble mutante (*ssc1-1, ssc2-1*) mejora de 1,55 a 2,1 veces los porcentajes de secreción obtenidos por las cepas con una única mutación y 2,3 veces la secreción obtenida por la cepa silvestre.

La estabilidad del plásmido a las 120 horas de cultivo resultó ser de aproximadamente un 42% para la cepa CGY339, un 64% para la cepa CGY1463, un 72% para la cepa CGY1465 y un 41% para la cepa CGY1468.

Aunque los mutantes super-secretorees parecen promover ligeramente la secreción de la  $\beta$ -galactosidasa no se alcanzaron los valores descritos para otras proteínas por otros autores (Tabla 4.2). Varias razones podrían explicar estos porcentajes bajos de secreción, la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* es una proteína muy grande, unos 124 kDa cada subunidad (apartado 1.2.3), comparada con el resto de las proteínas secretadas que, además, originariamente son extracelulares y no intracelulares como la  $\beta$ -galactosidasa. Por otra parte, en nuestro caso se utilizó un plásmido episomal y está descrito que la integración en un cromosoma mejora la eficiencia de la secreción (Smith *et al.*, 1985).

Tabla 4. 2: Porcentajes de secreción de diferentes proteínas conseguidos por mutantes super-secretorees de *S. cerevisiae*.

Proteína	Origen *	Tamaño (kDa)	% Secreción	Referencia
Pro-uroquinasa	Humano (E)	53	66	Melnick <i>et al.</i> , 1990
Hormona crecimiento	Bovino (E)	42	10	Smith <i>et al.</i> , 1985
Proquimosina	Bovino (E)	41	80	Smith <i>et al.</i> , 1985

\* (E) Proteína extracelular.

#### 4. 2. 1. Secreción en la cepa CGY1585.

La cepa CCY1585 creciendo en YPD a 30°C, se comenta aparte ya que mostró porcentajes superiores de secreción asociada al crecimiento, alcanzando valores de actividad enzimática en el medio de cultivo con respecto a la actividad intracelular del 10% al llegar a la fase estacionaria. Estos porcentajes de secreción se mantuvieron durante más de 100 horas (Figura 4.6).

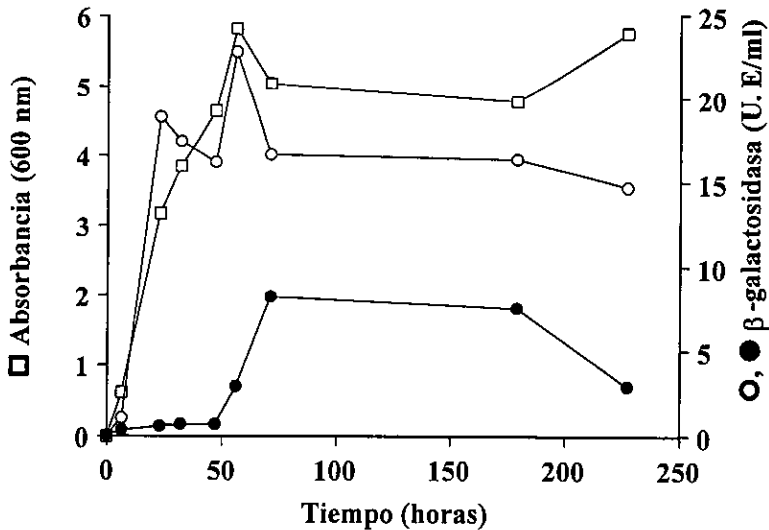
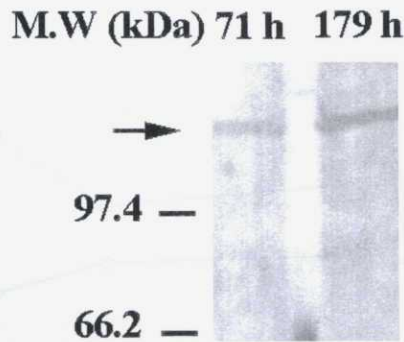


Figura 4. 6: Cepa de *S. cerevisiae* mutante para el gen *sscl-1* CGY1585/YEplac181-LAC4 creciendo en medio YPD. El crecimiento se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm (cuadrado). La actividad  $\beta$ -galactosidasa se midió tanto intracelularmente (círculo blanco) como extracelularmente (círculo negro). Los valores de la actividad enzimática extracelular están multiplicados por cinco.

La determinación de la estabilidad plasmídica dio como resultado, al cabo de 227 horas de cultivo, un valor del 75%.

Mediante *western-blot* (Figura 4.7) se analizó el medio de cultivo recogido a diferentes intervalos de tiempo (y concentrado hasta 20 veces) de la cepa CGY1585/YEplac181-LAC4 creciendo en YPD. Se reveló una banda que se corresponde con la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*.



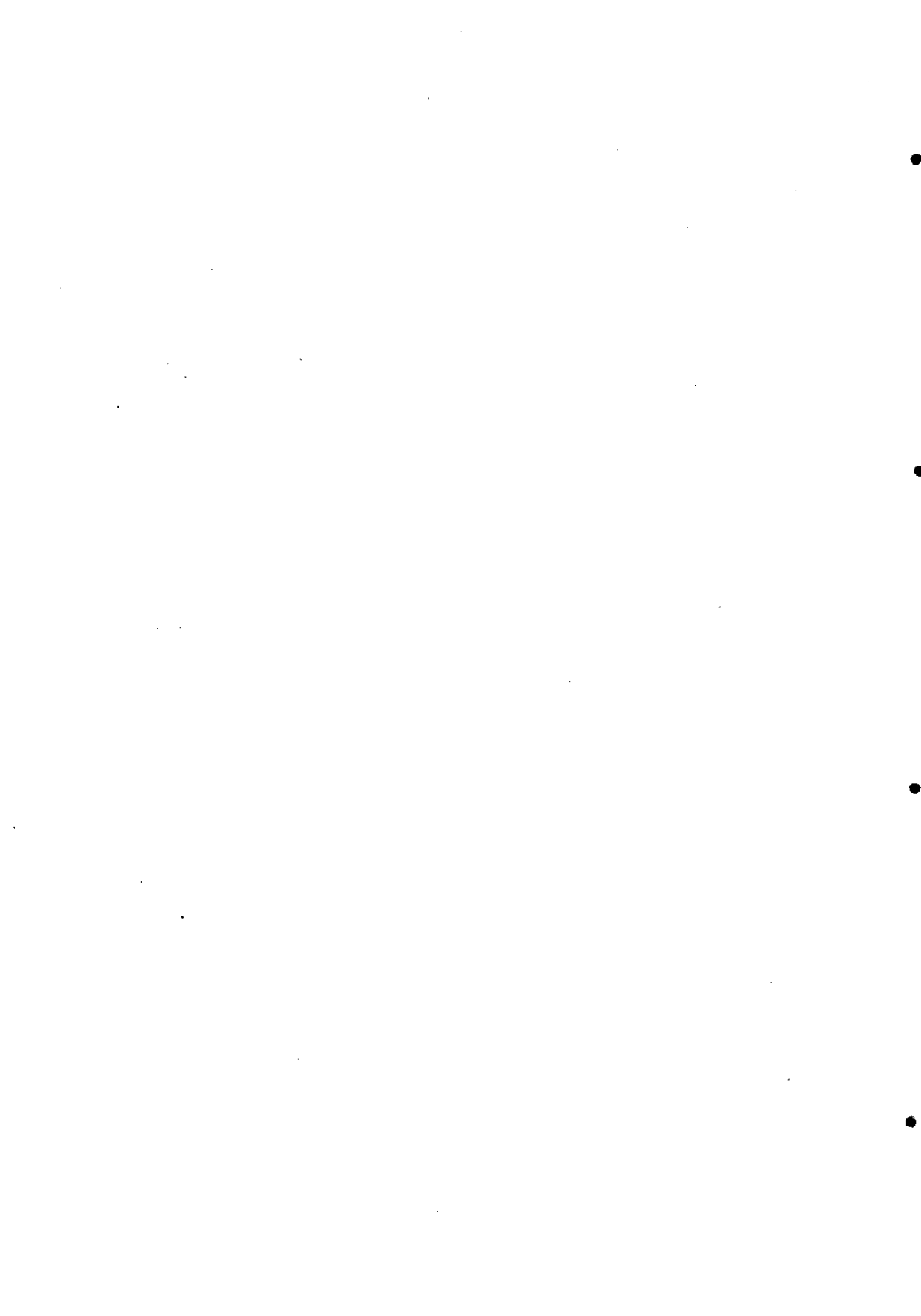
**Figura 4. 7:** Análisis mediante *western-blot* del medio de cultivo de la cepa CGY1585/YEplac181-LAC4 creciendo en YPD a las 71 y 179 horas. Se cargó en las dos calles 20  $\mu$ g de proteína total.

El peso molecular de la  $\beta$ -galactosidasa estimado a partir del *western-blot* fue de aproximadamente 122 kDa; de nuevo, la proteína no parece verse afectada por la glicosilación. Está descrito que a las proteínas secretadas por mutantes *ssc1* les faltan las modificaciones de los oligosacáridos unidos a ellas que se producen durante el paso a través del aparato de Golgi (Rudolph *et al.*, 1989). No es de extrañar, por tanto, que además de lo comentado para la cepa BJ3505/YEpFLAG1-BC (apartado 3.2.2), en este caso la proteína no se encuentre glicosilada.

La inexistencia de fenómenos apreciables de lisis celular se comprobó mediante observación al microscopio óptico a diferentes horas del cultivo.

El comportamiento diferente de la cepa CGY1585 con respecto al resto de las cepas super-secretoras parece venir dado por el fenotipo Gal<sup>-</sup> ya que la cepa de igual fenotipo pero Gal<sup>+</sup> (CGY1465) no alcanzó en ningún caso los porcentajes de secreción conseguidos por la primera. El fenotipo Gal<sup>-</sup> podría estar implicado de alguna manera, aún no lo suficientemente aclarada, en facilitar la secreción de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*.

El gen *SSC1* es idéntico al *PMR1*, que codifica para una ATPasa dependiente de calcio (Rudolph *et al.*, 1989) y, como se ha comentado anteriormente, los mutantes *ssc1* presentan alteraciones en el patrón de glicosilación proteico. Recientemente se han aislado mutantes de *K. lactis* con un patrón alterado en la glicosilación proteica que afecta a la morfogénesis de la pared celular (Uccelletti *et al.*, 1999). Por tanto, la mutación *ssc1* unida a un fenotipo Gal<sup>-</sup> podría tener efectos aditivos e incrementar los porcentajes de secreción en medios sin galactosa (ya que en medios con galactosa, como se expondrá en el capítulo siguiente, disminuyen los porcentajes de secreción), por estar afectando de alguna manera en los procesos de glicosilación de proteínas y estos a su vez en la formación de la pared celular.



## 5. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* QUE UTILIZAN LACTOSA.

Un objetivo de especial interés en Biotecnología es el desarrollo de microorganismos capaces de convertir el suero de leche en productos útiles. Como se ha comentado en la introducción, la levadura conocida de mayor capacidad fermentadora, *Saccharomyces cerevisiae*, carece de lactosa permeasa y de  $\beta$ -galactosidasa intracelular con lo cual es incapaz de fermentar directamente la lactosa a etanol. Las células de *S. cerevisiae* pueden crecer sobre la mezcla de glucosa y galactosa obtenida después de una hidrólisis química o enzimática de la lactosa, pero manifiestan un crecimiento diaúxico y una baja producción de etanol (Porro *et al.*, 1992 b).

Con la ayuda de las técnicas de ADN recombinante se han podido construir, mediante diferentes estrategias, cepas de *S. cerevisiae* capaces de metabolizar la lactosa. Sreekrishna y Dickson (1985) consiguieron cepas de *S. cerevisiae* capaces de crecer en lactosa al transformar dicha levadura con un plásmido integrativo que contenía los genes *LAC4* ( $\beta$ -galactosidasa) y *LAC12* (lactosa permeasa) de *Kluyveromyces lactis*. Obtuvieron un transformante con varias copias en tandem de los genes en una localización inespecífica del genoma, pero este transformante presentó un crecimiento lento y un fenotipo inestable.

Otra aproximación consistió en el uso de una cepa de *S. cerevisiae* transformada con un plásmido que contenía el gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* (*lacZ*) fusionado a la secuencia señal de secreción del gen de la glucoamilasa II (Vanoni *et al.*, 1989; Porro *et al.*, 1992 a). A pesar de conseguir un porcentaje de secreción de la enzima de hasta un 70% en el

espacio periplásmico, lo que permitía la hidrólisis de la lactosa extracelular y su utilización por las células, la velocidad de crecimiento fue muy lenta.

Un tercer intento se basó en usar el gen *lacZ* clonado bajo el control de un promotor de *S. cerevisiae* inducible por galactosa (Porro *et al.*, 1992 b). Las cepas superproductoras de la  $\beta$ -galactosidasa intracelular fueron capaces de crecer en lactosa debido a un cierto grado de lisis celular que liberó suficiente enzima para producir la hidrólisis extracelular del azúcar. La lisis celular fue provocada por la sobreexpresión del activador transcripcional de levaduras (*GAL4*).

Un cuarto acercamiento consistió en el uso del gen de la  $\beta$ -galactosidasa extracelular de *Aspergillus niger* expresado en *S. cerevisiae* bajo el control del promotor constitutivo de la alcohol deshidrogenasa (*ADHI*) (Kumar *et al.*, 1992; Ramakrishnan y Hartley, 1993). La levadura transformada secretó un 40% al medio de cultivo y creció en permeado de lactosuero.

En una aproximación más reciente (Rubio-Teixeira *et al.*, 1998) se obtuvo una cepa diploide de *S. cerevisiae* capaz de metabolizar la lactosa por construcción, primero, de cepas haploides con múltiples integraciones en la región codificadora del ribosómico (*locus RDNI*) de los genes *LAC4* y *LAC12* bajo el control de un promotor inducible por galactosa. Las cepas resultantes se cruzaron con una cepa silvestre, seleccionando dos cepas cruzadas de *mating* opuesto y fusionándolas para obtener un diploide de crecimiento rápido y  $Lac^+$ .

Con todos estos antecedentes bibliográficos y dado el indudable interés del tema, se decidió comprobar si los diferentes transformantes de *S. cerevisiae* obtenidos a lo largo de este trabajo, que contenían la  $\beta$ -

galactosidasa de *K. lactis* fusionada a diferentes secuencias señal de secreción, eran capaces de crecer en medios con lactosa.

### 5. 1. Cultivos de *S. cerevisiae* recombinantes en lactosa.

Para realizar los cultivos se emplearon las 4 cepas de *S. cerevisiae* con el fenotipo super-secretor (apartado 4.2), las 2 cepas que lisan a temperaturas no permisivas (apartado 4.1) y la cepa PEP4-1a (*MAT $\alpha$* , *leu2*, *ura3*, *pep4-3*) transformadas con el plásmido YEplac181-LAC4 (Figura 4.1), además de la cepa CGY339 transformada con el plásmido pSPGK1-LAC4-2 $\mu$ m (apartado 4.2) y la cepa BJ3505 transformada con el YE $\phi$ FLAG1-BC (apartado 3.2).

Primeramente, se realizaron cultivos en un medio CM sin el correspondiente aminoácido (leucina, uracilo o triptófano según el caso) empleado como marcador auxotrófico. Cuando alcanzaron la fase de crecimiento estacionaria se utilizaron para inocular matraces *Erlenmeyer* de 250 ml de capacidad conteniendo 100 ml de YPL a dos concentraciones diferentes de lactosa, al 4%, concentración similar a la que se encuentra en el suero de leche, y al 6%. Todos los cultivos ensayados se realizaron a 30°C, con una agitación orbital de 250 r.p.m y partiendo de una absorbancia a 600 nm inicial de 0,05. Se determinaron los valores de absorbancia a 600 nm, actividad  $\beta$ -galactosidasa extracelular e intracelular, consumo de lactosa y producción de etanol a diferentes intervalos de tiempo.

Todas las cepas ensayadas fueron capaces de crecer en lactosa, aunque presentaron diferencias en su comportamiento en función de su genotipo y del plásmido con el que fueron transformadas (Figura 5. 1).



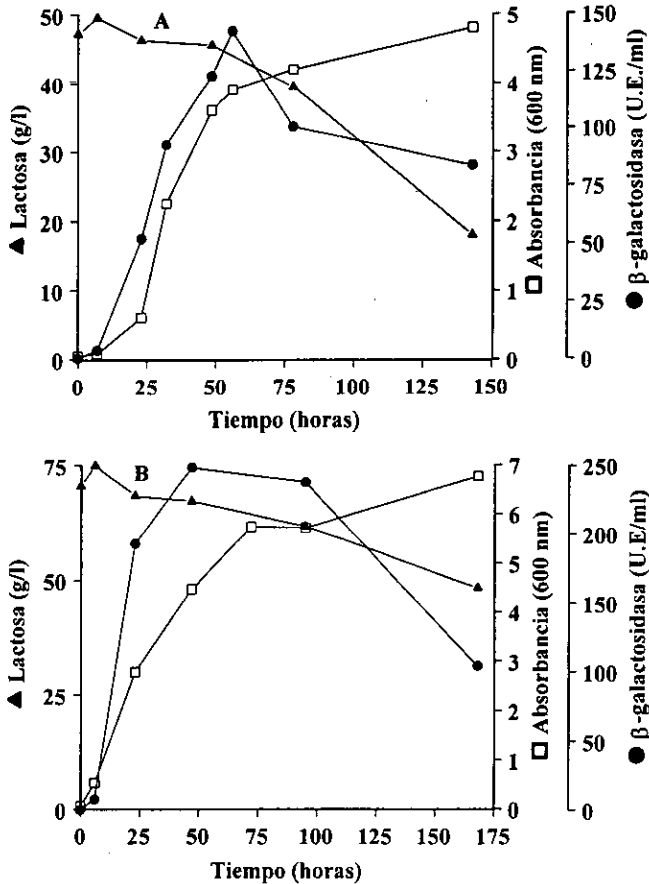


**Figura 5. 1:** Porcentaje de consumo de lactosa por las diferentes cepas de *S. cerevisiae* empleadas. (1) BJ3505, (2) LHDP1, (3) LD1, (4) CGY1463, (5) CGY1465, (6) CGY1585, (7) CGY1468, (8) CGY339, (9) PEP4-1a. En azul se muestran los cultivos con lactosa al 6% y en rojo los cultivos al 4% de lactosa. En todos los casos la medida se realizó a las 168 horas de cultivo, salvo para las cepas BJ3505 y LHDP1, en lactosa al 4%, que se hizo a las 143 horas.

## 5. 2. Cepa de *S. cerevisiae* BJ3505.

De todas las cepas utilizadas, la cepa BJ3505 fue la que presentó uno de los mayores consumos de lactosa al finalizar el tiempo de cultivo ensayado, consumiendo 29,3 g a las 143 horas para los cultivos al 4% de lactosa y 22,1 g a las 168 horas para los cultivos al 6% de lactosa (Figura 5.1). Presentó un tiempo de duplicación de unas 6,8 horas en el primer caso y de 8,2 horas en el segundo. Este buen comportamiento en comparación con las otras cepas se puede explicar porque fue también la que mostró una mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa tanto intracelular como extracelular. Aunque la media de los porcentajes de secreción para los dos cultivos a dos niveles de lactosa oscilaron entre el 2% al inicio del cultivo, 0,3% a las 23 horas y 0,1% al final del cultivo, la actividad enzimática en el medio de cultivo en valores absolutos fue la más alta conseguida, obteniéndose una media para los dos cultivos a las 23 horas de 0,23 U.E/ml. La enzima

liberada permitiría la hidrólisis de la lactosa extracelularmente y, por tanto, su consumo por las células (Figura 5.2).



**Figura 5. 2:** Crecimiento y producción de  $\beta$ -galactosidasa intracelular por la cepa de *S. cerevisiae* BJ3505/YEpFLAG1-BC en YPL (4%) (A) y en YPL (6%) (B).

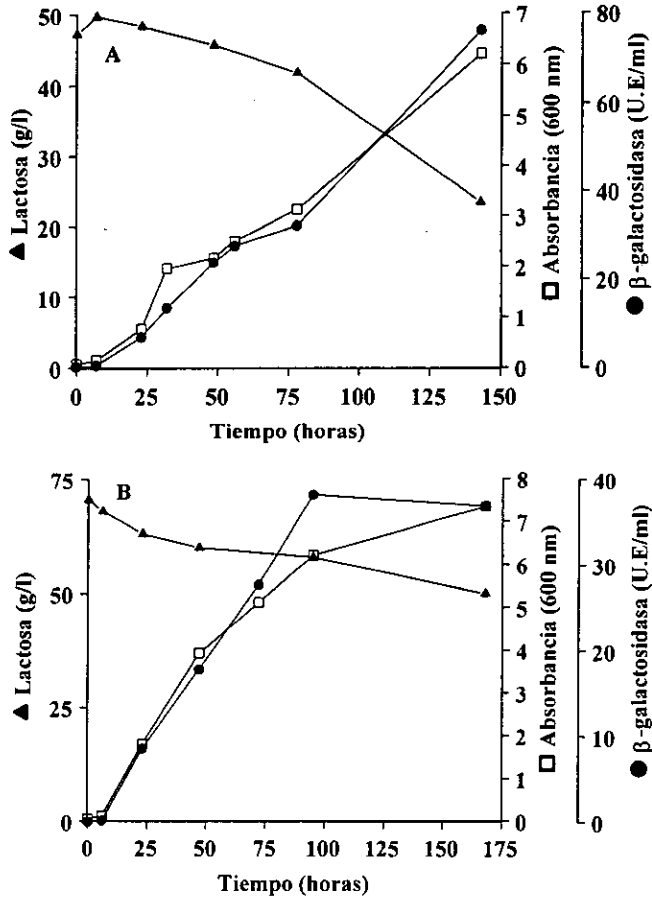
La actividad  $\beta$ -galactosidasa intracelular conseguida fue de 20 a 30 veces inferior en medio YPL (4%) y de 10 a 15 veces menor en medio YPL (6%) que en el medio YPHSM (apartado 3.2.2). El promotor ADH2, es un promotor reprimido por glucosa, la hidrólisis de la lactosa producida por la  $\beta$ -galactosidasa extracelular libera glucosa y galactosa. Así, la glucosa presente en el medio reprimiría el promotor ADH2, bajando, por tanto, los

niveles de  $\beta$ -galactosidasa producidos, como se puede observar que empieza a suceder en los dos cultivos al cabo de las 48-56 horas de cultivo (Figura 5.2).

### **5. 3. Cepas de *S. cerevisiae* que lisan a temperaturas no permisivas.**

Con respecto a las cepas que lisan a temperaturas no permisivas, aunque como se ha comentado en el capítulo precedente (apartado 4.1.1) el porcentaje de secreción no fue importante (el medio con lactosa no mejoró el resultado), fue suficiente para permitir el crecimiento en lactosa (Figuras 5.3 y 5.4). Por otra parte, no se puede descartar la existencia de cierto grado de lisis celular, pues si bien los cultivos no se realizaron a 37°C, fueron hechos a 30°C y no a 25°C como sería recomendable para evitar con mayor seguridad la lisis de una parte de estas levaduras.

La cepa LHDP1 consumió la lactosa más eficientemente (50,23%) que la LD1 (24,4%) para los cultivos al 4% de lactosa, siendo el consumo para los cultivos al 6% de lactosa, el 28,96% y el 12,34% respectivamente (Figura 5.1). Como hemos visto, el genotipo deficiente en proteasas de la cepa LHDP1 permite valores superiores de actividad enzimática con respecto a la cepa LD1 (apartado 4.1.1), en un medio con lactosa se aumentó esta diferencia, obteniendo, a la misma absorbancia (aproximadamente 1,8), 9 veces más de actividad en el caso de los cultivos en YPL (4%) y cerca de 83 veces más para los cultivos en YPL (6%). Además también presentó, en valores absolutos, una mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa en el medio de cultivo, una media para los dos cultivos a los dos niveles de lactosa de 0,13 U.E/ml a las 78 horas frente a 0,04 U.E/ml conseguido por la cepa LD1, lo que permitiría un porcentaje de hidrólisis de la lactosa mayor y por tanto un mejor crecimiento.



**Figura 5.3:** Cultivo y producción de  $\beta$ -galactosidasa intracelular de la cepa de *S. cerevisiae* LHDP1/YEplac181-LAC4 creciendo en medio YPL (4%) (A) y en medio YPL (6%) (B).

Contrariamente a lo que ocurrió con la cepa BJ3505, que en medios con 6% de lactosa aumentó en casi 2 veces la actividad  $\beta$ -galactosidasa intracelular, en este caso para las dos cepas ensayadas, en medios con concentraciones mayores de lactosa disminuyó casi la mitad de la actividad enzimática intracelular.

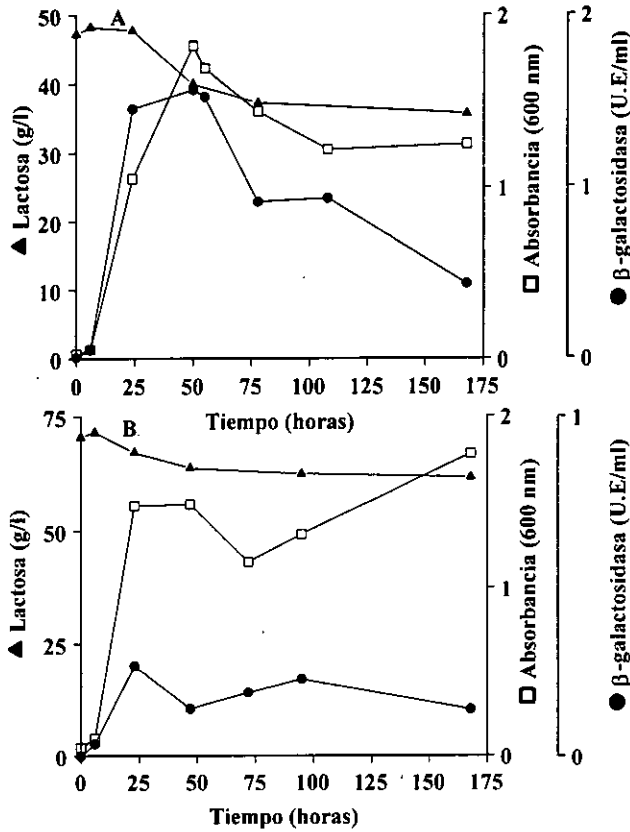


Figura 5. 4: Cultivo y producción de  $\beta$ -galactosidasa intracelular de la cepa de *S. cerevisiae* LD1/YEplac181-LAC4 creciendo en medio YPL (4%) (A) y en medio YPL (6%) (B).

#### 5. 4. Cepas super-secretoras de *S. cerevisiae*.

A diferencia de los resultados obtenidos en el capítulo precedente (apartado 4.2) por la cepa CGY1585 que mostró los mejores porcentajes de secreción en medio YPD, el comportamiento de dicha cepa en medio YPL, para las dos concentraciones de lactosa, fue diferente (Figuras 5.5 y 5.6). Como se ha comentado, la presencia de galactosa, que proviene de la hidrólisis de la lactosa, en el medio de cultivo podría ser suficiente para restaurar el fenotipo Gal<sup>+</sup> y por tanto, de alguna manera no bien conocida, afectaría a los porcentajes de secreción de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*,

haciendo que disminuyesen. Con respecto a la cepa CGY1463 que presenta las mutaciones *ssc1-1* y *ssc2-1*, consiguió un mayor consumo de lactosa, alcanzando un valor del 35% para el medio YPL (4%) y del 32,6% para el YPL (6%) y porcentajes de secreción más elevados, obteniendo al inicio del cultivo una media del 43% para ambas concentraciones de lactosa, a las 48 horas un 12,5% y disminuyendo hasta el 0,84% al final del cultivo.

El comportamiento de las cepas con mutaciones *ssc1-1* fue mejor, de nuevo, que el mostrado por la cepa CGY1468 con mutación *ssc2-1*. En este caso la media de los porcentajes de secreción para las dos cepas con mutaciones *ssc1-1* (CGY1465 y CGY1585) y para las dos concentraciones de lactosa, oscilaron entre el 23% inicialmente, 2% a las 48 horas y el 0,82% al termino del cultivo.

La cepa CGY1468 con mutación *ssc2-1* presentó una media en los porcentajes de secreción para los dos cultivos a las dos concentraciones de lactosa del 6,25% al inicio, 0,33% a las 48 horas y del 0,41% al finalizar el cultivo.

El medio de cultivo parece ejercer una gran influencia sobre los valores de secreción alcanzados, pues en medios con YPD se consiguieron porcentajes menores de secreción que los que se alcanzaron en cultivos en YPL (salvo para el caso de la cepa CGY1585 como se ha comentado). Sin embargo, aunque los porcentajes de secreción fueron mayores, la actividad  $\beta$ -galactosidasa intracelular descendió una media de 3,4 veces con respecto a la alcanzada por los mutantes super-secretores creciendo en YPD. Esto explicaría que, aunque el porcentaje de secreción fue mayor, los niveles absolutos de actividad alcanzados en el medio de cultivo fueron más pequeños pues el valor de actividad intracelular fue también bajo. Estos niveles bajos, en valores absolutos, de actividad extracelular traerían consigo un consumo menor de lactosa del esperado.

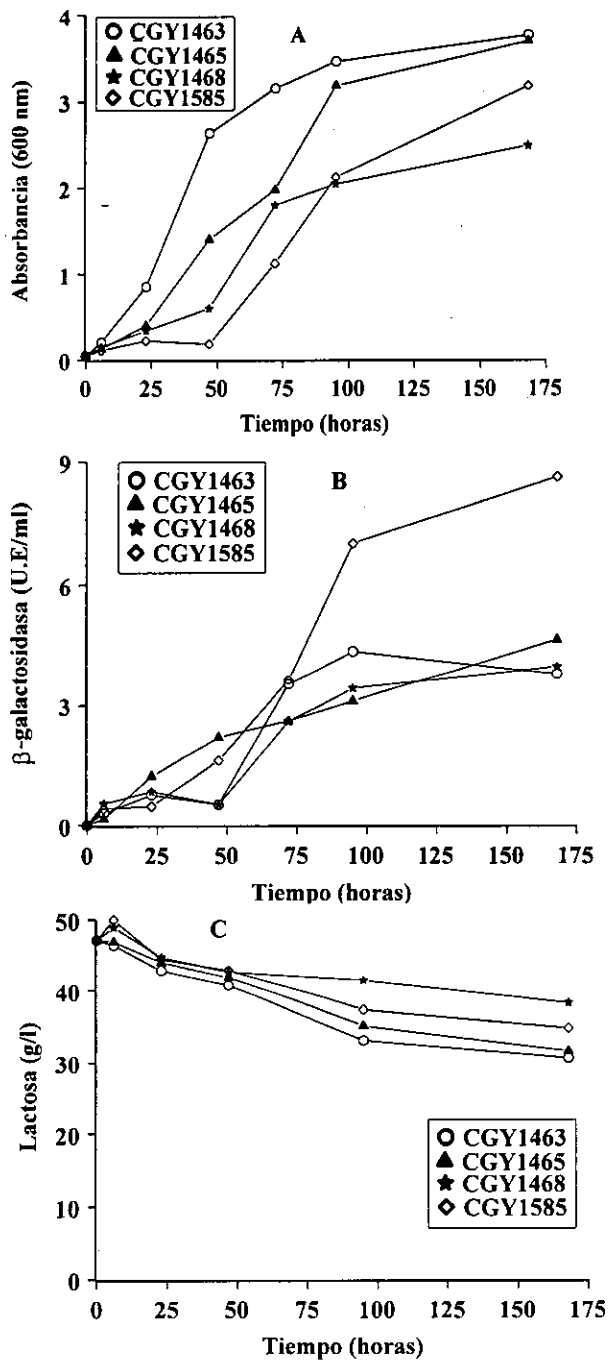
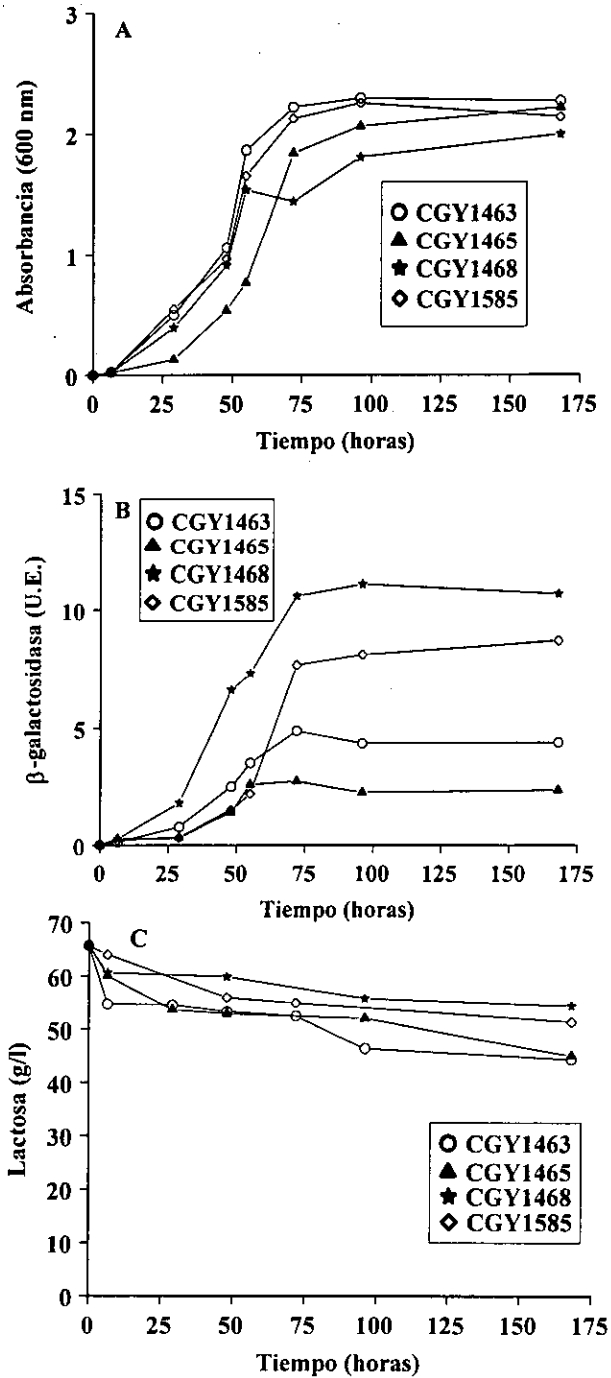


Figura 5. 5: Cultivo de las cepas super-secretoras de *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido Yeplac181-LAC4 en YPL (4%). (A) Valores de absorbancia a 600 nm, (B) Producción de  $\beta$ -galactosidasa intracelular, (C) Consumo de lactosa.



**Figura 5. 6:** Cultivo de las cepas super-secretoras de *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido YepLac181-LAC4 en YPL (6%). (A) Valores de absorbancia a 600 nm, (B) Producción de  $\beta$ -galactosidasa intracelular, (C) Consumo de lactosa.



### 5. 5. Cepas de *S. cerevisiae* CGY339 y PEP4-1a.

Las cepas CGY339 y PEP4-1a mostraron un consumo de lactosa similar al finalizar el cultivo siendo del 10,04% para la cepa CGY339 creciendo en YPL (4%) y el 7% para la cepa PEP4-1a. En cultivos con lactosa al 6% fue del 10,4% para la primera y del 11,3% para la segunda (Figuras 5.7 y 5.8).

La cepa PEP4-1a, para las dos concentraciones de lactosa (Figura 5.7), parece presentar cierto crecimiento diáuxico, a las 95 horas hay una caída de la absorbancia incrementándose posteriormente.

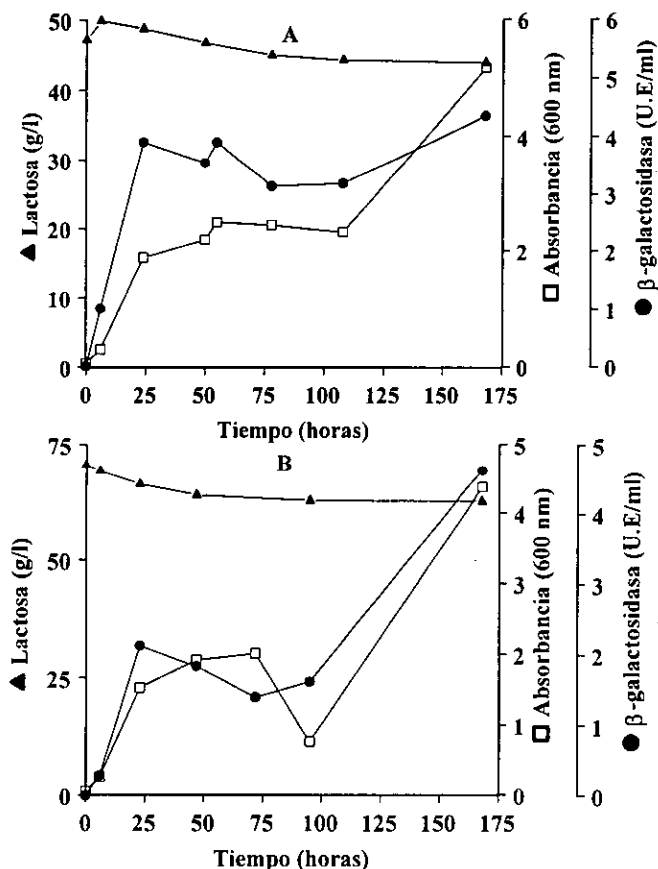


Figura 5. 7: Cultivo y producción de  $\beta$ -galactosidasa intracelular de la cepa de *S. cerevisiae* PEP4-1a/YEplac181-LAC4 en YPL (4%) (A) y YPL (6%) (B).

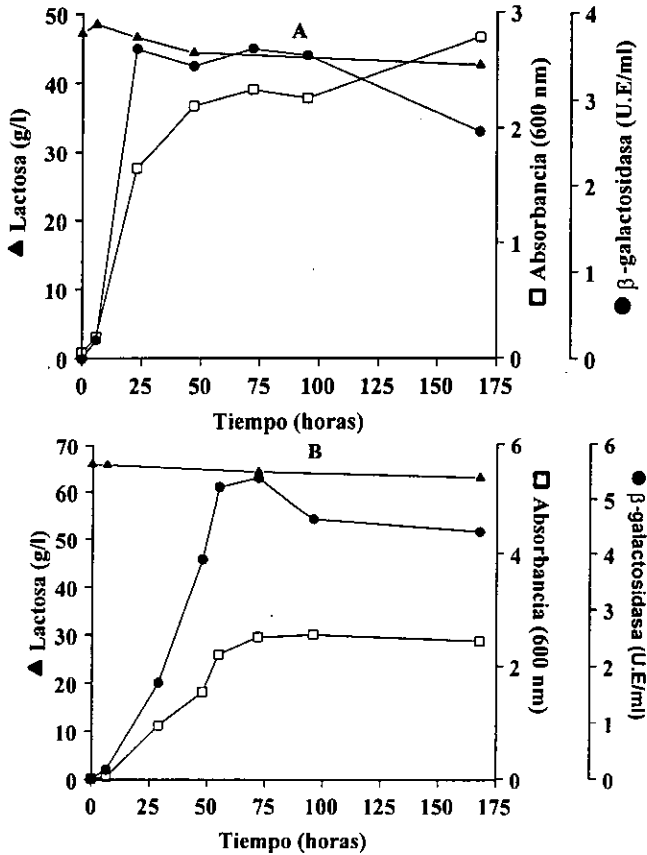


Figura 5. 8: Cultivo y producción de  $\beta$ -galactosidasa intracelular de la cepa de *S. cerevisiae* CGY339/pSPGK1-LAC4 en YPL (4%) (A) y YPL (6%) (B).

### 5. 6. Producción de etanol.

En todos los cultivos se determinó la producción de etanol, observándose la presencia en el medio de cultivo de tan sólo una pequeña cantidad de etanol durante la fase de crecimiento, el cual era parcialmente consumido en fases posteriores en algunos cultivos. En general en casi todas las cepas utilizadas, en medios con concentraciones de lactosa mayores, y por tanto con una limitación de oxígeno mayor, se incrementó

ligeramente la producción de etanol. La cepa LD1 presentó valores de etanol mayores que los conseguidos por el resto de las cepas empleadas (Figura 5.9 y 5.10).

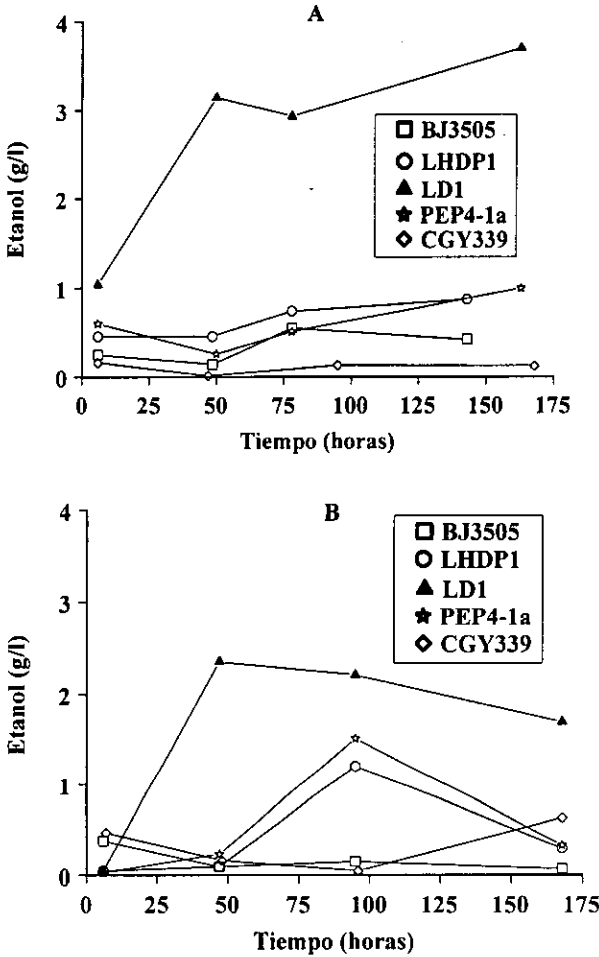


Figura 5. 9: Producción de etanol de las distintas *Saccharomyces* transformadas utilizadas en este trabajo. Datos correspondientes a los cultivos en YPL (4%) (A) y en YPL (6%) (B).

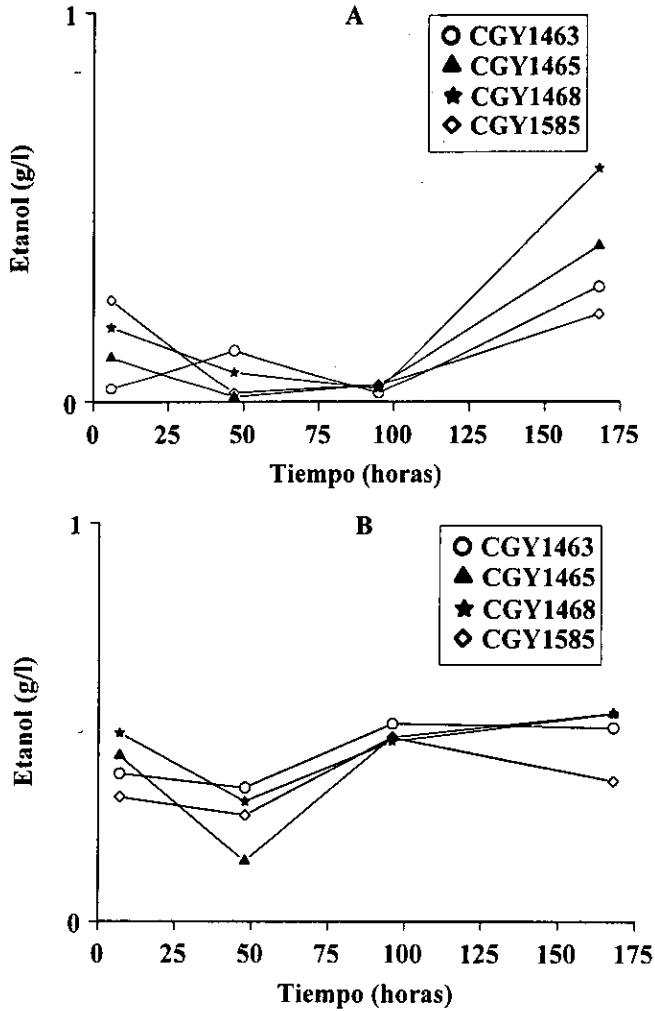


Figura 5. 10: Producción de etanol de las cepas super-secretoras. Datos correspondientes a los cultivos en YPL (4%) (A) y en YPL (6%) (B).

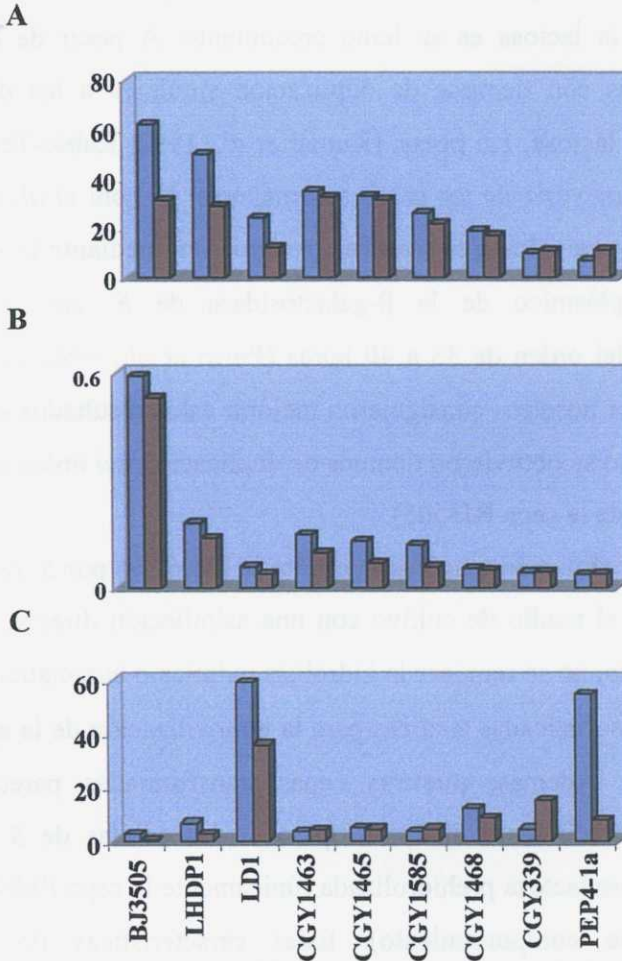
Los bajos rendimientos de etanol conseguidos están en consonancia con los datos previos de la bibliografía. Porro *et al.*, (1992 b) obtuvo resultados similares de producción de etanol por cepas de *S. cerevisiae* transformadas con la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* bajo el control de un

promotor inducible por galactosa, cuando usaba medios ricos, equivalentes al YPL, mientras que el crecimiento en un medio mínimo (YNB-Lactosa) aumentó la producción de etanol en la fase estacionaria de crecimiento. También, Rubio-Teixeira *et al.*, (1998) con su cepa diploide de *S. cerevisiae* capaz de metabolizar la lactosa, en medios con este disacárido obtuvieron bajas producciones de etanol. Quedaría por comprobar si en medios mínimos las cepas utilizadas en este trabajo mejoran la producción de etanol.

Como hemos visto a lo largo de este capítulo todas las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas fueron capaces de crecer en lactosa. Aunque no se puede desestimar la existencia de cierto crecimiento a partir de los componentes del extracto de levadura, sobre todo inicialmente, en todos los casos, incluso en el peor de ellos, hubo consumo de lactosa (del 6,93% al 63%), que corresponden a 29,3 g y 3,3 g de este disacárido. Las cepas pudieron crecer incluso a concentraciones altas de lactosa, del orden del 6%, lo que no parece que produjese efectos inhibitorios evidentes sobre el crecimiento o el consumo de lactosa. Incluso, en las cepas super-secretoras, la CGY339 y la PEP4-1a, aumentó ligeramente la lactosa consumida al aumentar la concentración.

Aunque el porcentaje de secreción de  $\beta$ -galactosidasa conseguido por todas las cepas en el medio de cultivo no fue excesivamente alto, permitió la utilización de la lactosa. En la figura 5.11, se puede observar que el consumo de lactosa está en relación directa con los niveles absolutos de actividad  $\beta$ -galactosidasa existentes en el medio de cultivo a lo largo del mismo, aquellas cepas que mostraron mayores niveles de actividad enzimática fueron las que consumieron más lactosa (se repitieron los datos

de la figura 5.1 para permitir una comparación más fácil). A pesar de esto, no se puede descartar, que un porcentaje de la enzima quede retenida en el espacio periplásmico y, dado que la lactosa puede atravesar la pared celular, que se produjese allí la hidrólisis del disacárido.



**Figura 5. 11:** Figura resumen del porcentaje de consumo de lactosa por las diferentes cepas de *S. cerevisiae* empleadas (A), de la media de los valores absolutos a lo largo del cultivo de actividad  $\beta$ -galactosidasa (U.E/ml) secretada (B) y del porcentaje de etanol producido con respecto al teórico, considerando que se pueden producir 4 moles de etanol por mol de lactosa consumida (C). En azul se muestran los cultivos con lactosa al 4%, mientras que en rojo se indican los cultivos con 6% de lactosa.

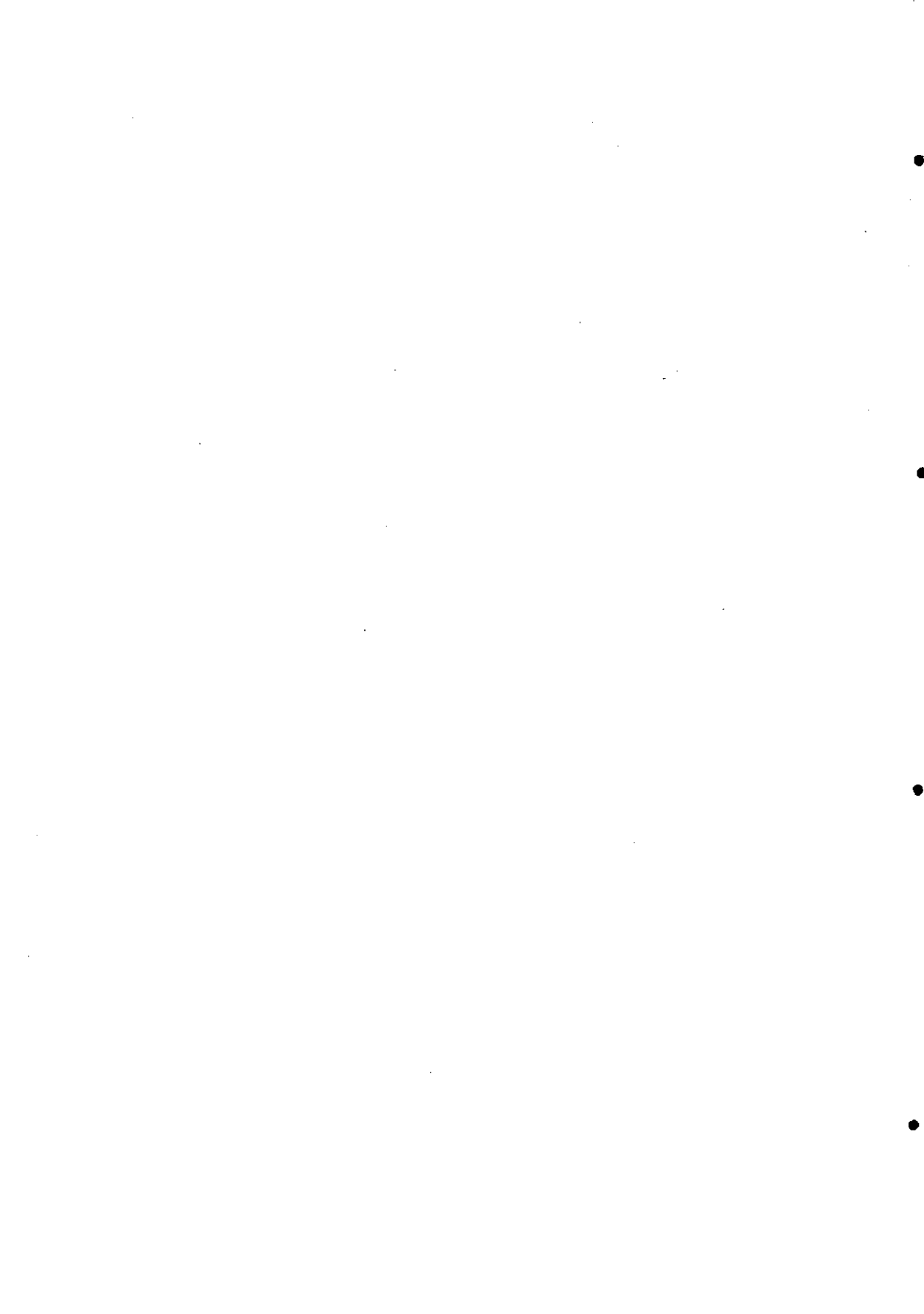
Las cepas LD1 y PEP4-1a, fueron las únicas que presentaron porcentajes de producción de etanol con respecto al teórico por encima del 50%, pero como se ha comentado anteriormente los niveles absolutos alcanzados fueron bajos.

Un problema general a casi todas estas cepas de *S. cerevisiae* que metabolizan la lactosa es su lento crecimiento. A pesar de que se han logrado cepas con tiempos de duplicación similares a los de *K. lactis* creciendo en lactosa, 1,6 horas, (Kumar *et al.*, 1992; Rubio-Teixeira *et al.*, 1998), en la mayoría de los casos son mayores. Vanoni *et al.* (1989), con una estrategia parecida a la nuestra consiguieron, mediante la secreción al espacio periplásmico de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, tiempos de duplicación del orden de 35 a 40 horas (Porro *et al.*, 1992 b). Las cepas empleadas por nosotros consiguieron mejorar estos resultados en todos los casos e incluso se obtuvieron tiempos de duplicación del orden de 6,8 horas (para el caso de la cepa BJ3505).

La aproximación empleada permite la hidrólisis por *S. cerevisiae* de la lactosa en el medio de cultivo con una asimilación directa, en un solo paso. Por tanto, no se requiere la hidrólisis química o enzimática previa del disacárido ni sofisticadas técnicas para la inmovilización de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Además, nuestras cepas transformadas parece que no muestran el crecimiento diaúxico típico de las células de *S. cerevisiae* creciendo sobre lactosa prehidrolizada (únicamente la cepa PEP4-1a podría presentar este comportamiento). Estas características de las cepas recombinantes presentan ventajas biotecnológicas interesantes ya que favorecen una transformación eficiente de la lactosa en biomasa u otros metabolitos de interés, siendo de potencial utilidad para el aprovechamiento del lactosuero.

## **5. CONCLUSIONES.**





---

1. Se ha purificado la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* de un extracto crudo obtenido mediante tratamiento con ultrasonidos y de una preparación comercial (Maxilact LX-5.000). Se encontró que la enzima estaba compuesta de monómeros de 124 kDa y que era activa en forma dimérica y tetramérica, dependiendo la preponderancia de cada una de las formas de las condiciones de ensayo. La enzima purificada resultó adecuada para ser usada como antígeno para inducir la producción de anticuerpos policlonales.

La caracterización inmunológica mostró la existencia de reactividad cruzada entre anticuerpos contra la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* y la  $\beta$ -galactosidasa de una levadura relacionada, *K. fragilis*, y viceversa, pero no con otras  $\beta$ -galactosidasas de origen bacteriano, fúngico o animal.

2. El sistema propuesto para producir  $\beta$ -galactosidasa, con la levadura *Kluyveromyces lactis* en fermentaciones en estado sólido sobre carozo de maíz humedecido con suero de leche desproteínizado, supone una mejora de hasta un 152% en el rendimiento de producción de dicha enzima en relación con los cultivos líquidos tradicionales, permitiendo reducir el costo de la preparación enzimática. El cambio de cultivos líquidos tradicionales a sólidos parece no promover la secreción de la  $\beta$ -galactosidasa por *K. lactis*.

3. Se ha construido el plásmido pSPGK1-LAC4 que presenta el gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* unido a la señal de secreción de la toxina *killer* de la misma levadura. Este plásmido se ha utilizado para evaluar la secreción de la  $\beta$ -galactosidasa en cepas de *K. lactis* deficientes en la producción de dicha enzima, observándose que si bien la levadura era

capaz de producir  $\beta$ -galactosidasa, ésta era mayoritariamente intracelular. Los mayores porcentajes de secreción (en torno al 50%) se obtuvieron al inicio de la fase de crecimiento exponencial de los cultivos, cuando la actividad  $\beta$ -galactosidasa total es todavía baja, disminuyendo hasta un 10% en fases posteriores del cultivo.

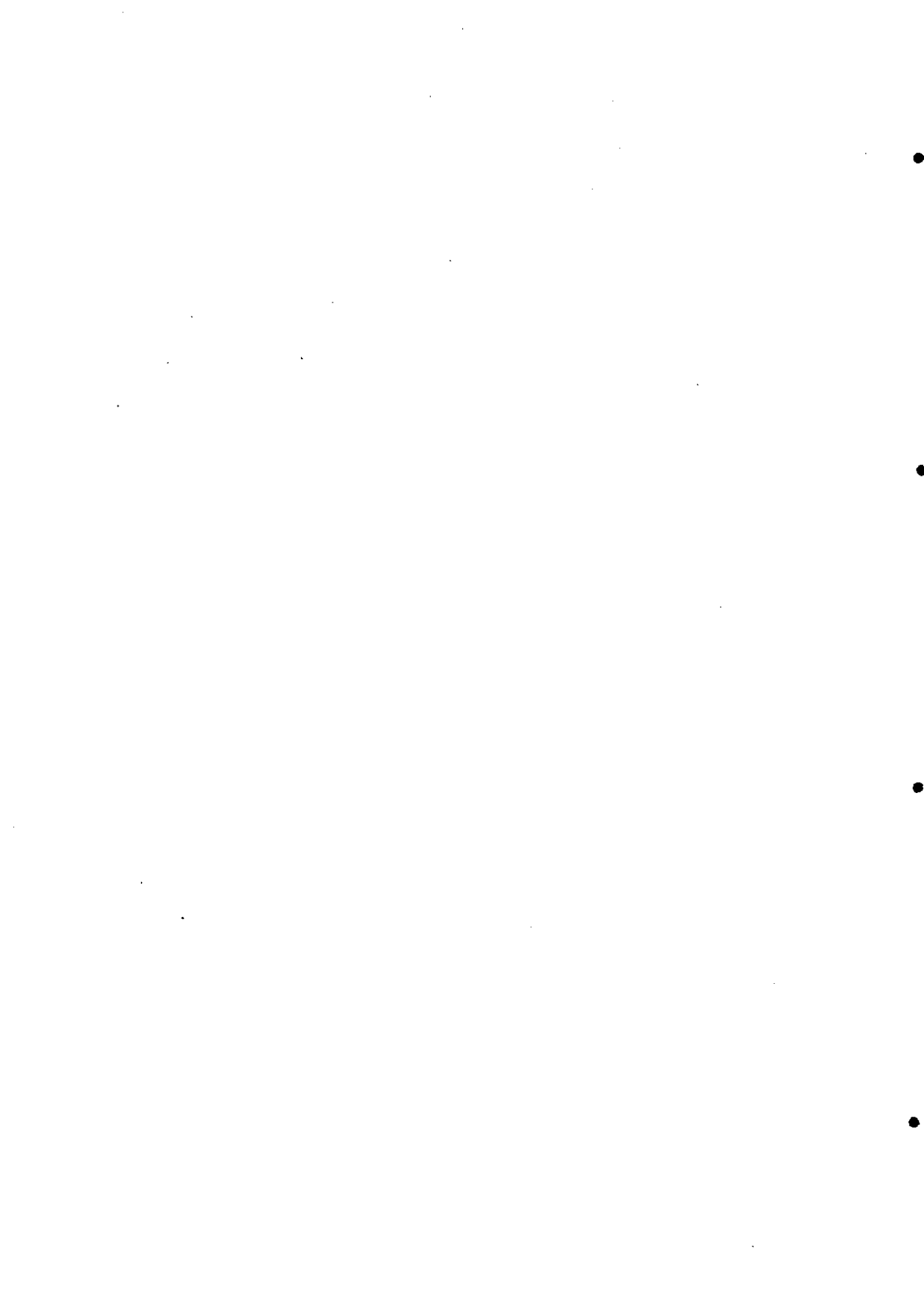
La eliminación de los 10 primeros aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína aunque no afectó a la actividad enzimática, no supuso un incremento en el porcentaje de secreción heteróloga en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, al igual que la adición de un aminoácido estabilizante a dicho extremo tampoco incrementa la secreción en *K. lactis*.

La región C-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus niger* parece complementar una deleción de la mitad C-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis*, e incrementa ligeramente los porcentajes de secreción, aunque la actividad de la proteína híbrida es muy baja.

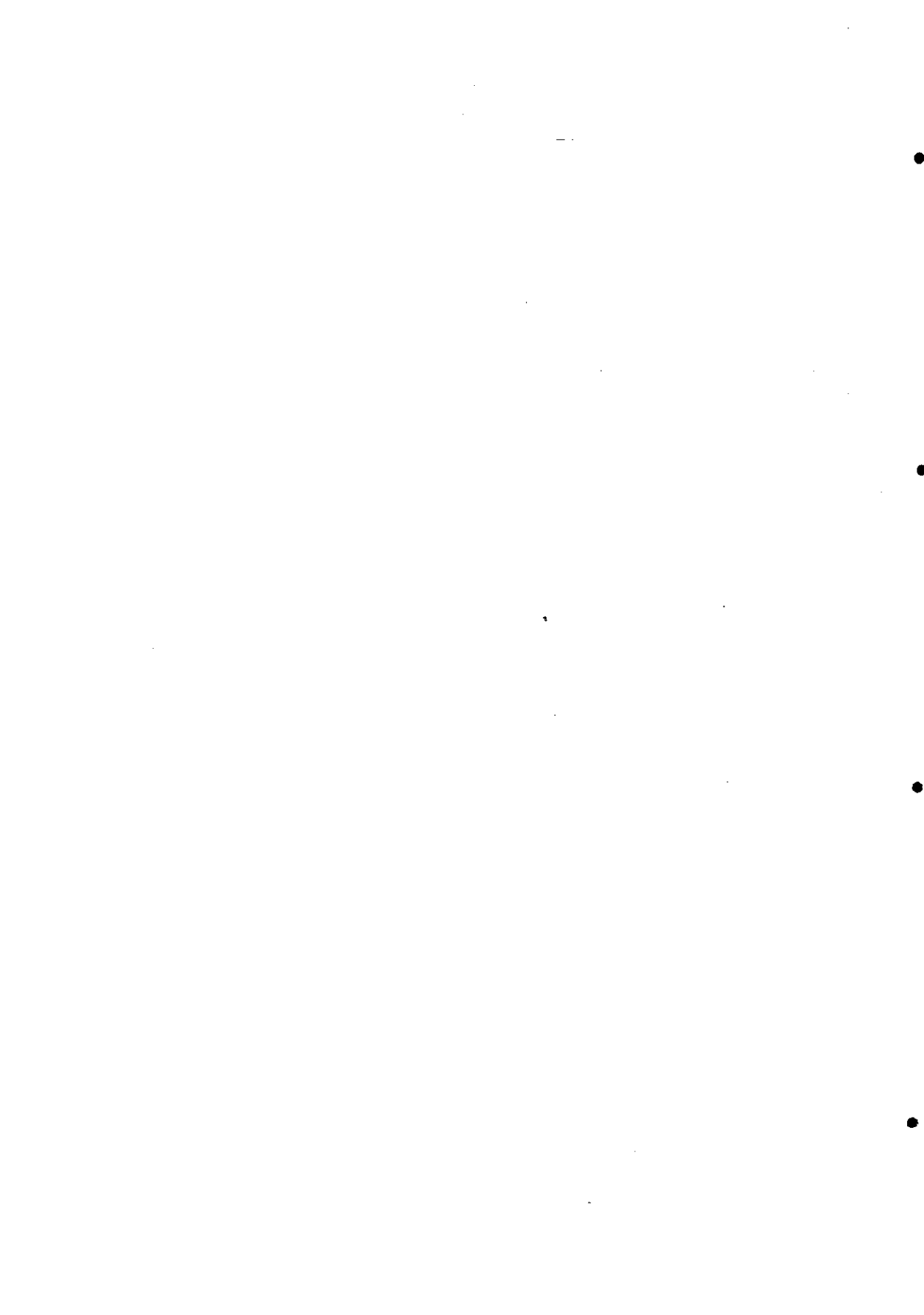
4. El uso de cepas mutantes de *S. cerevisiae* deficientes en la integridad celular constituye una manera eficiente de obtener altos rendimientos de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* en el medio de cultivo mediante choque osmótico, sin necesidad de rotura mecánica y/o tratamiento enzimático de las células. La liberación de la enzima alcanzó porcentajes entre el 63% y el 83%. La cepa LHDP1 (deficiente en proteasas) aunque presentó menor porcentaje de secreción fue más eficiente que la LD1 ya que mantuvo unos valores absolutos de proteína extracelular después del choque osmótico cerca de 3 veces superiores respecto a los valores alcanzados por la cepa LD1.

El empleo de cepas super-secretoras de *S. cerevisiae* con el fenotipo Gal<sup>-</sup> permitió mantener los porcentajes de secreción de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* en torno al 10% durante más de 100 horas.

5. Las cepas de *S. cerevisiae* transformadas con un plásmido que contiene el gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* fusionado a una señal de secreción fueron capaces de crecer en medios con lactosa. Se evita así la necesidad de realizar una prehidrólisis química o enzimática del disacárido, constituyendo una alternativa para el aprovechamiento del suero de leche.



## **6. BIBLIOGRAFÍA.**



- AALTO, M.K., RONNE, H., KERÄNEN, S. (1993). Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J.*, **12**: 4095-4104.
- AALTO, M.K., JÄNTTI, J., ÖSTLING, J., KERÄNEN, S. & RONNE, H. (1997). Mso1p: a yeast protein that functions in secretion and interacts physically and genetically with Sec1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 73331-73336.
- AIDOO, K.E., HENDRY, R. & WOOD, B.J.B. (1982). Solid substrate fermentations. *Advances in applied microbiology*, **28**: 201-237.
- ALI, A.A.A. & MOHAMED-ROUSHDY, I. (1998). Fermentation of milk permeate by proteolytic bacteria for protease production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **74**: 85-93.
- ALTHOFF, S., SELINGER, D. & WISE, J.A. (1994). Molecular evolution of SRP cycle components: functional applications. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 1933-1947.
- ÁLVAREZ, P., SAMPEDRO, M., MOLINA, M. & NOMBELA, C. (1994). A new system for the release of heterologous proteins from yeast based on mutant strains deficient in cell integrity. *Journal of Biotechnology*, **38**: 81-88.
- ÁLVAREZ, P., SÁNCHEZ, M., MOLINA, M. & NOMBELA, C. (1995). Release of virus-like particles by osmotic shock from a mutant strain of yeast deficient in cell integrity. *Biotechnology techniques*, **9**: 441-444.
- ANON., (1983). Les produits obtenus à partir du lactosérum. *Revue laitière française.*, **422**: 44-47.
- ARIDOR, M. & BALCH, W.E. (1996). Principles of selective transport: coat complexes hold the key. *Trends in Cell Biology*, **6**: 315-320.
- ATHÈS, V. & COMBES, D. (1998). Influence of additives on high pressure stability of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* and invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**: 532-537.



- ATHÈS, V., LANGE, R. & COMBES, D. (1998). Influence of polyols on the structural properties of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase under high hydrostatic pressure. *Eur. J. Biochem.*, **255**: 206-212.
- AURIA, R., PALACIOS, J. & REVAH, S. (1992). Determination of the interparticular effective diffusion coefficient for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in solid state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **39**: 898-902.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. & STRUHL, K. (1995). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, Inc.
- BAE, C.S., YANG, D.S., CHANG, K.R., SEONG, B.L. & LEE, J. (1998). Enhanced secretion of human granulocyte colony-stimulating factor directed by a novel hybrid fusion peptide from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* at high cell concentration. *Biotechnology and Bioengineering*, **57**: 600-609.
- BALDARI, C., MURRAY, J.A.H., GHIARA, P., CESARENI, G. & GALEOTTI, C.L. (1987). A novel leader peptide which allows efficient secretion of a fragment of human interleukin 1 $\beta$  in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, **6**: 229-234.
- BARBERIS, S. & GENTINA, J.C. (1998). Effect of dissolved oxygen level on lactase production by *Kluyveromyces fragilis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **73**: 71-73.
- BARINAGA, M. (1993). Secrets of secretion revealed. An extraordinary confluence of three lines of research, culminating last month, shows that the same mechanism governs key communication processes in cells from yeasts to the human brain. *Science*, **260**: 487-489.
- BARKER, T.,W. & WORGAN, J.T. (1981). The utilisation of palm oil processing effluents as substrates for microbial protein production by the fungus *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11**: 234-40.

- BARLOWE, C. (1997). Coupled ER to Golgi transport reconstituted with purified cytosolic proteins. *The Journal of Cell Biology*, **139**: 1097-1108.
- BARR, P.J., BRAKE, A.J. & VALENZUELA, P. (1989). En: *Yeast Genetic Engineering*. (Davies, J.E., Ed.). Butterworths, USA.
- BECERRA, M. (1995). Construcción de un plásmido de secreción de  $\beta$ -galactosidasa y estudio de su expresión en *Kluyveromyces lactis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidade da Coruña.
- BECERRA, M. & SISO, M.I.G. (1996). Yeast  $\beta$ -galactosidase in solid-state fermentations. *Enzyme Microb. Technol.*, **19**: 39-44.
- BECERRA, M., CERDÁN, E. & SISO, M.I.G. (1997). Heterologous *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase production and release by *Saccharomyces cerevisiae* osmotic-remedial thermosensitive autolytic mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1335**: 235-241.
- BECERRA, M., CERDÁN, E. & SISO, M.I.G. (1998 a). Micro-scale purification of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric forms are active. *Biotechnology Techniques*, **12**: 253-256.
- BECERRA, M., CERDÁN, E. & SISO, M.I.G. (1998 b). Dealing with different methods for *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase purification. *Biological Procedures Online*, **1**: 48-58.
- BEDNAREK, S.Y., ORCI, L. & SCHEKMAN, R. (1996). Traffic COPs and the formation of vesicle coats. *Trends in Cell Biology*, **6**: 468-473.
- BELEM, M.A.F. & LEE, B.H. (1997). Production of RNA derivatives by *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. *Food Science and Technology International*, **3**: 437-444.
- BELEM, M.A.F., GIBBS, B.F. & LEE, B.H. (1997). Enzymatic production of ribonucleotides from autolysates of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Journal of Food Science*, **62**: 851-857.

- BELEM, M.A.F. & LEE, B.H. (1998). Oligosaccharides extracted from cell walls of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Biotechnology Techniques*, **12**: 229-233.
- BELEM, M.A.F., GIBBS, B.F. & LEE, B.H. (1999). Proposing sequences for peptides derived from whey fermentation with potential bioactive sites. *J. Dairy Sci*, **82**: 486-493.
- BENNET, M.K. & SCHELLER, R.H. (1993). The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 2559-2563.
- BERNFELD, P. (1951). Enzymes of starch degradation and synthesis. *Adv. Enzymol.*, **12**: 379-427.
- BERRUGA, M.I., JASPE, A. & SANJOSE, C. (1997). Selection of yeast strains for lactose hydrolysis in dairy effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **40**: 119-123.
- BERRY, D.R., RUSSELL, I. & STEWART, G.G. (1987). En *Yeast biotechnology*. pp: 401-424. Ed BERRY, D.R. Allen & Unwin. London.
- BHUSHAN, B., DOSNJH, N.S., KUMAR, K. & HOONDAL, G.S. (1994). Lipase production from an alkalophilic yeast sp. by solid state fermentation. *Biotechnology Letters*, **16**: 841-842.
- BIERMANN, L. & GLANTZ, M.D. (1968). Isolation and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Saccharomyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **167**: 373-377.
- BLANC, P. & GOMA, G. (1989). Propionic acid and biomass production using continuous ultrafiltration fermentation of whey. *Biotechnology Letters*, **11**: 189-194.
- BLONDEAU, K., BOZE, H., JUNG, G., MOULIN, G. & GALZY, P. (1994). Physiological approach to heterologous human serum albumin production by *Kluyveromyces lactis* in chemostat culture. *Yeast*, **10**: 1297-1303.

- BÓDALO, A., GÓMEZ, E., GÓMEZ, J.L., BASTIDA, J., MÁXIMO, M.F. & DÍAZ, F. (1991). A comparison of different methods of  $\beta$ -galactosidase immobilization. *Proc. Biochem.*, **26**: 349-353.
- BOHLMANN, J.T., CAMESELLE, C., NUÑEZ, M.J. & LEMA, J.M. (1998). Oxalic acid production by *Aspergillus niger*. Part II: Optimisation of fermentation with milk whey as carbon source. *Bioprocess Engineering*, **19**: 337-342.
- BOLIVAR, F. & BACKMAN, K. (1979). Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.*, **68**: 245.
- BONIFACINO, J.S. & WEISSMAN, A.M. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**: 19-57.
- BOYD, D. & BECKWITH, J. (1990). The role of charged aminoacids in the localization of secreted and membrane proteins. *Cell*, **62**: 1031-1033.
- BOX, G.E.P., HUNTER, W.G. & HUNTER, J.S. (1989). En: *Estadística para investigadores*. Reverté, Barcelona.
- BRADFORD, M.M. (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.
- BRADY, D., MARCHANT, R., McHALE, L. & McHALE, A.P. (1995). Isolation and partial characterization of  $\beta$ -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**: 696-699.
- BRAKE, A.J., MERRYWEATHER, J.P., COIT, D.G., HEBERLEIN, U.A., MASIARZ, F.R., MULLENBACH, G.T., URDEA, M.S., VALENZUELA, P. & BARR, P.J. (1984).  $\alpha$ -Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 4642-4646.

- BRUMMER, M.H., KIVINEN, K., JÄNTTI, J., SÖDERLUND, H. & KERÄNEN, S. (1999). *S. cerevisiae sec1* mutants: identification, cloning and functional characterization. *Current Genetics*, **35**: 415.
- BUCKHOLZ, R.G. & GLEESON, M.A.G. (1991). Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology*, **9**: 1067-1072.
- BUI, D.M., KUNZE, I., HORSTMANN, C., SCHMIDT, T., BREUNING, K.D. & KUNZE, G. (1996). Expression of the *Arxula adenivorans* glucoamylase gene in *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, **45**: 102-106.
- CAMESELLE, C., BOHLMANN, J.T., NÚÑEZ, M.J., LEMA, J.M. (1998). Oxalic acid production by *Aspergillus niger*. Part I: Influence of sucrose and milk whey as carbon source. *Bioprocess Engineering*, **19**: 247-252.
- CANNEL, E & MOO-YOUNG, M. (1980 a). Solid-state fermentation systems I. *Process Biochemistry*, **15**: 2-7.
- CANNEL, E & MOO-YOUNG, M. (1980 b). Solid-state fermentation systems II. *Process Biochemistry*, **15**: 24-28.
- CASTELLI, L.A., MARDON, C.J., STRIKE, P.M., AZAD, A.A. & MACREADI, I.G. (1994). High level secretion of correctly processed  $\beta$ -lactamase from *Saccharomyces cerevisiae* using a high copy number secretion vector. *Gene*, **142**: 113-117.
- CASTILLO, F.J. (1990). Lactose metabolism by yeasts. En *Yeast biotechnology and biocatalysis*, pp: 297-320. Ed. Hubert Verachtert. René De Mot. Marcel Dekker, Inc. USA.
- CASTILLO, M.R., GUTIÉRREZ-CORREA, M., LINDEN, J.C. & TENDERDY, R.P. (1994). Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. *Biotechnology letters*, **16**: 967-972.
- CAVILLE, D. & COMBES, D. (1995). Characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **22**: 55-64.

- CAVILLE, D. & COMBES, D. (1998). Irreversible high pressure inactivation of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: comparison with thermal inactivation. *Journal of Biotechnology*, **61**: 85-93.
- CHAMPAGNE, C.P. & GOULET, J. (1988). Growth of baker's yeast (*Sacharomyces cerevisiae*) in lactose-hydrolyzed cheese whey ultrafiltrate. *Can. Ins. Food Sci. Technol. J.*, **21**: 545-548.
- CHANG, C-C., PARK, C-S. & RYU, D.D.Y. (1998). Improvement of heterologous protein productivity through a selected bioprocess strategy and medium design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **74**: 173-189.
- CHEN, S., WEST, R.W. Jr, MA, J., JOHNSON, S.L., GANS, H. & WOLDEHAWARIAT, G. (1993). *TSF1* to *TSF6*, required for silencing the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL* genes, are global regulatory genes. *Genetics*, **134**: 701-716.
- CHIARINI, L., MARA, L. & TABACCHIONI, S. (1992). Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**: 461-464.
- CHRISPEELS, M.J. & FAYE, L. (1998). Rien en sert de produire, il faut glycosyler. *Biofutur*, **184**: 53-57.
- CHUNG, B.H., NAM, S.W., KIM, B.M. & PARK, Y.H. (1996). Highly efficient secretion of heterologous proteins from *Saccharomyces cerevisiae* using inulinase signal peptides. *Biotechnology and Bioengineering*, **49**: 473-479.
- CHUNG, B.H., KIM, B.M. & NAM, S.W. (1996). The use of inulinase pre-pro leader peptide for secretion of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, **18**: 627-632.
- CHUNG, D.-K., SHIN, D.-H., KIM, B.-W., NAM, J.-K., HAN, I.-S. & NAM, S.-W. (1997). Expression and secretion of *Clostridium thermocellum* endoglucanase A gene (*celA*) in different *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology Letters*, **19**: 503-506.

- COHEN, S.N., CHANG, A.C.Y. & HSU, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 2110-2114.
- COLLINS, R.N., BRENNWALD, P., GARRENT, M., LAURING, A. & NOVICK, P. (1997). Interactions of nucleotide release factor Dee4p with Sec4p in the post-Golgi secretory pathway of yeast. *J. Biol. Chem.*, **272**: 18281-18289.
- COLOMBAN, A., ROGER, L. & BOYAVAT, P. (1993). Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration, and cell recycling. *Biotechnol. Bioengng.*, **42**: 1091-1098.
- COMPAGNO, C., TURA, A., RANZI, B.M. & MARTEGANI, E. (1993). Bioconversion of lactose/whey to fructose diphosphate with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Bioengng.*, **42**: 398-400.
- COTON, S.G. (1976). Recovery of dairy waste. En *Food from waste*, pp: 221-229. Ed. G.G. Birch, K.J. Parker & J.T. Morgan. Applied Science Publishers. England.
- COUGHLIN, R.W. & CHARLES, M. (1980). Applications of lactose and immobilized lactase. En *Immobilized Enzymes for Processing*, pp: 153-175. De. W.H. Pitcher, Inc. USA.
- DA SILVA, N.A. & BAILEY, J.E. (1991). Influence of plasmid origin and promoter strength in fermentations of recombinant yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, **37**: 318-324.
- DALBEY, R.E., LIVELY, M.O., BRON, S. & VAN DIJL, J.M. (1997). The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Science*, **6**: 1129-1138.
- DALEV, P.G. (1994). Utilization of waste whey as a protein source for production of iron proteinate: an antianemic preparation. *Biores. Technol.*, **48**: 75-77.

- DAS, R.C., SHULTZ, J.L. & LEHMAN, D.J. (1989).  $\alpha$ -Factor leader sequence directed transport of *Escherichia coli*  $\alpha$ -galactosidase in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen Genet.*, **218**: 240-248.
- DAS, S. & HOLLENBERG, C.P. (1982). A high-frequency transformation system for the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Genet.*, **6**: 123-128.
- DE BAETSELIER, A., VASAVADA, A., DOHET, P., HA-THI, V., DE BEUKELAER, T., ERPICUM, T., DE CLERK, L., HANOTIER, J. & ROSENBERG, S. (1991). Fermentation of a yeast producing *A. niger* glucose oxidase: scale-up, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Bio/Technology*, **9**: 559-561.
- DE CAMILLI, P., EMR, S.D., McPHERSON, P.S. & NOVICK, P. (1996). Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science*, **271**: 1533-1539.
- DECLEIRE, M., DE CAT, W. & VAN HUYNH, N. (1986). Appearance of cell-bound  $\beta$ -galactosidase activity in *Kluyveromyces bulgaricus* resting cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**: 323-325.
- DENDENE, K., GHIHARD, L., NICOLAS, S. & BARIOU, B. (1994). Kinetics of lactose isomerisation to lactulose in an alkaline medium. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **61**: 37-42.
- DE NOBEL, J.G., KLIS, F.M., MUNNIK, T., PRIEM, J. & VAN DEN ENDE, H. (1990 a). An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **6**: 483-490.
- DE NOBEL, J.G., KLIS, F.M., PRIEM, J., MUNNIK, T. & VAN DEN ENDE, H. (1990 b). The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**: 491-499.
- DE NOBEL, T. G. & BARNETT, J. A. (1991). Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast* **7**: 313-323.



- DICKSON, R.C., DICKSON, L.R. & MARKIN, J.S. (1979). Purification and properties of an inducible  $\beta$ -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.*, **Jan**: 51-61.
- DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J.A. & LIMA, N. (1997). Rapid and sensitive detection of  $\beta$ -galactosidase producing yeasts by using microtiter plate assay. *Biotechnology Techniques*, **11**: 399-402.
- DORTA, B., BOSCH, A., ARCAS, J. & ERTOLA, R. (1994). Water balance in solid-state fermentation without forced aeration. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**: 562-565.
- DOVAL, S.S. (1992). Sacarificación del lactosuero con células inmovilizadas de *Kluyveromyces lactis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidade da Coruña.
- DUBOIS, M., GILES, U.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356.
- EGERTON, M., ZUECO, J. & BOYD, A. (1993). Molecular characterization of the SEC1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: subcellular distribution of a protein required for yeast protein secretion. *Yeast*, **9**: 703-713.
- ELROD-ERICKSON, M. & KAISER, C.A. (1996). Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations. *Molecular Biology of the Cell*, **7**: 1043-1058.
- ERICKSON, R.P. & STEERS, J.R.E. (1970). Comparative study of isoenzyme formation of bacterial  $\beta$ -galactosidase. *J. Bacteriol.*, **102**: 79-84.
- EVANS, M.T.A. & GORDON, J.F. (1980). Whey Proteins. En *Applied Protein Chemistry*, pp: 31-67. Ed. R.A. Grant. Applied Science Publishers. England.
- FENTON, D.M. (1982). Solvent treatment for  $\beta$ -D-galactosidase release from yeast cells. *Enzyme Microb. Technol.*, **4**: 229-232.

- FERMIÑAN, E. & DOMÍNGUEZ, A. (1998). Heterologous protein secretion directed by a repressible acid phosphatase system of *Kluyveromyces lactis*: characterization of upstream region activating sequences in the *KLPH05* gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 2403-2408.
- FERNÁNDEZ, M., PÉREZ-CORREA, J.R., SOLAR, I. & AGOSIN, E. (1996). Automation of a solid substrate cultivation pilot reactor. *Bioprocess Engineering*, **16**: 1-4.
- FERRO-NOVICK, S. & NOVICK, P. (1993). The role of GTP-binding proteins in transport along the exocytic pathway. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, **9**: 575-599.
- FLEER, R., YEH, P., AMELLAL, N., MAURY, Y., FOUNIER, A., BACCHETTA, F., BADUEL, P., JOUNG, G., L'HOTE, H., BECQUART, J., FUKUHARA, H. & MAYAUX, J.F. (1991 a). Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. *Biotechnology*, **9**: 968-975.
- FLEER, R., CHEN, X.J., AMELLAL, N., YEH, P., FOURNIER, A., GUINET, F., GAULT, N., FAUCHER, D., FOLLIARD, F., FUKUHARA, H. & MAYAUX, J. F. (1991 b). High-level of correctly processed recombinant human interleukin-1 $\beta$  in *Kluyveromyces lactis*. *Gene* **107**: 285-295.
- FODA, M.S. (1981). Production of fungal enzymes and proteins from high salt cheese wheys. *J. Sci. Food Agric.* **32**: 1109-1114.
- FRIEND, B.A. & SHAHANI, K.M. (1979). Whey fermentation. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, **14**: 143-155.
- FUENTE, J.M. de la, VAZQUEZ, A., GONZÁLEZ, M., SÁNCHEZ, M., MOLINA, M. & NOMBELA, C. (1993). Expression of mutations and protein release by yeast conditional autolytic mutants in batch and continuous cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**: 763-769.

- FUJIMOTO, H., MIYASATO, M., ITO, Y., SASAKI, T. & AJISAKA, K. (1998). Purification and properties of recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Glycoconjugate Journal*, **15**: 155-160.
- GARCIA-GARIBAY, M., GÓMEZ-RUIZ, L. & BARZANA, E. (1987). Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology Letters*, **9**: 411-416.
- GARDNER, D. (1989). New technologies in the conversion of whey to high protein products. *Modern Dairy* **68**: 15-17.
- GEKAS, V. & LOPEZ-LEIVA, M. (1985). Hydrolysis of lactose: a literature review. *Proc. Biochem.*, **20** (1): 2-12.
- GIETZ, R.D. & SUGINO, A. (1988) *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking restriction sites. *Gene*, **74**: 527-534.
- GONZÁLEZ, R.R. & MONSAN, P. (1991). Purification and some characteristics of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus fonsecaeus*. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 349-352.
- GOWTHAMAN, M.K., RAGHAVA RAO, K.S.M.S., GHILDYAL, N.P. & KARANTH, N.G. (1995). Estimation of  $K_L a$  in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. *Process Biochemistry*, **30**: 9-15.
- GUARENTE, L. (1983). Yeast promoters and *lacZ* fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods in Enzymology*, **101**: 181-191.
- GUY, E.J. & BINGHAM, E.W. (1978). Properties of  $\beta$ -galactosidase of *Saccharomyces lactis* in milk and milk products. *J.Dairy. Sci.* **61**: 147-151.
- GRAEME, A. R. (1991). Protein targeting in yeast. *Journal of General Microbiology*, **137**: 1765-1773.

- HAGUENAUER-TSAPIS, R. (1992). Protein-specific features of the general secretion pathway in yeast: the secretion of acid phosphatase. *Mol. Microbiol.*, **6**: 573-579.
- HAHN-HÄGERDAL, B. (1986). Water activity: a possible external regulator in biotechnical processes. *Enzyme Microb. Technol.*, **8**: 322-327.
- HALL, G.M. & IGLESIAS, O. (1997). Functional properties of dried milk whey. *Food Science and Technology International.*, **3**: 381-383.
- HANAHAH, H., JESSE, J. & BLOOM, R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.*, **24**: 63-112.
- HARMSSEN, M.M., LANGEDIJK, A.C., TUINEN, E., GEERSE, R.H., RAUÉ, H.A. & MAAT, J. (1993). Effect of a *pmr1* disruption and different signal sequences on the intracellular processing and secretion of *Cyamopsis tetragonoloba*  $\alpha$ -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **125**: 115-123.
- HARSAY, E. & BRETSCHER, A. (1995). Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *The Journal of Cell Biology*, **131**: 297-310.
- HENSING, M.C.M., BANGMA, K.A., RAAMSDONK, L.M., HULSTER, E., DIJKEN, J.P. & PRONK, J.T. (1995). Effects of cultivation conditions on the production of heterologous  $\alpha$ -galactosidase by *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**: 58-64.
- HERSHKO, A. & CIECHANOVER, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**: 425-79.
- HESEL TINE, C.W. (1972). Solid state fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, **14**: 517-532.
- HIGGINS, D.G., BLEASBY, A.J. & FUCHS, R. (1992). CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Cabios*, **8**: 189-191.
- HIJARRUBIA, M.J., CASQUEIRO, J., GUTIÉRREZ, S., FERNÁNDEZ, F.J. & MARTÍN, J.F. (1997). Characterization of the *bip* gene of

*Aspergillus awamori* encoding a protein with an HDEL retention signal homologous to the mammalian BiP involved in polypeptide secretion. *Curr. Genet.*, **32**: 139-146.

HUYNH, T.V., YOUNG, R.A. & DAVIS, R.W. (1985). En *DNA cloning*, vol. 1. Ed. Glover, D.M. IRL Press Limited. Oxford.

IGLESIAS, R., LEIRO, J., UBEIRA, F.M., SANTAMARINA, M.T. & SANMARTÍN, M.L. (1993). Anisakis simplex: antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice. *Parasite Immunol.* **15**: 243-250.

ILLANES, A., RUI, A., ZUÑIGA, M.E., AGUIRRE, C., O'REILLY, S. & CUROTO, E. (1990). Immobilization of lactase for the continuous hydrolysis of whey permeate. *Bioprocess Engineering.* **5**: 257-262.

INCHAURRONGO, V.A., YANTORNO, O.M. & VOGET, C.E. (1994). Yeast growth and  $\beta$ -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose limited synthetic medium. *Proc. Biochem.*, **29**: 47-54.

IRAZOQUI, G. & BATISTA-VIEIRA, F. (1994). Immobilization of  $\beta$ -galactosidase (*K. lactis*) on solid phase Ni(II)-quelate. *Biotechnol. Technol.*, **8**: 233-238.

ISMAIL, S.A., MABROUK, S.S. & MAHONEY, R.R. (1997). Purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Mucor pusillus*. *Journal of Food Biochemistry*, **21**: 145-162.

ITO, H., FUKUDA, Y., MURATA, K. & KIMURA, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**: 163-168.

ITOH, T., SUZUKI, M. & ADACHI, S. (1982). Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from lactose-fermenting yeasts. *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 899-904.

JACOBSON, R.H., ZHANG, X.-J., DUBOSE, R.F. & MATTHEWS, B.W. (1994). Three-dimensional structure of  $\beta$ -galactosidase from *E. coli*. *Nature*, **369**: 761-766.

- JEONG, Y.S., VIETH, W.R. & MATSUURA, T. (1991). Fermentation of lactose to ethanol with recombinant yeast in an immobilized yeast membrane bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**: 587-590.
- JIANG, Y., SCARPA, A., ZHANG, L., STONE, S., FELICIANO, E., FERRO-NOVICK, S. (1998). A high copy suppressor screen reveals genetic interactions between BET3 and a new gene. Evidence for a novel complex in ER-to-Golgi transport. *Genetics*, **149**: 833-841.
- JIGAMI, Y., MURAKI, M., HARADA, N. & TANAKA, H. (1986). Expression of synthetic human-lysozyme gene in *Saccharomyces cerevisiae*: use of a synthetic chicken-lysozyme signal sequence for secretion and processing. *Gene*, **43**: 273-279.
- JOHNSON, A.E. (1997). Protein translocation at the ER membrane: a complex process becomes more so. *Trends in Cell Biology*, **7**: 90-95.
- JONG, S.C. & EDWARDS, M.L.S. (Eds.). (1990). *American Type Culture Collection Catalogue of Yeasts*. 18th de. Rockville, M.D., pp. 39.
- JULIUS, D., BRAKE, A., BLAIR, L., KUNISAWA, R. & THORNER, J. (1984 a). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast pre-pro- $\alpha$ -factor. *Cell*, **37**: 1075-1089.
- JULIUS, D., SCHEKMAN, R. & THORNER, J. (1984 b). Glycosylation and processing of pre-pro- $\alpha$ -factor through the yeast secretory pathway. *Cell*, **36**: 309-318.
- JUNGNIKEL, B., RAPOPORT, T.A. & HARTMANN, E. (1994). Protein translocation: common themes from bacteria to man. *FEBS Lett.*, **346**: 73-77.
- JWANNY, E.W., RASHAD, M.M. & ABDU, H.M. (1995). Solid state fermentation of agricultural wastes into food through *Pleurotus* cultivation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **50**: 71-78.

- KAHLON, S.S. & MALHOTRA, S. (1986). Production of gibberellic acid by fungal mycelium immobilized in sodium alginate. *Enzyme Microb. Technol.*, **8**: 613-616.
- KAREL, S.F., LIBICKI, S.B. & ROBERSTON, C.R. (1985). The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chem. Eng. Sci.*, **40**: 1321-1354.
- KARINE, B., HÉLÈNE, B., MOULIN, J.G. & GALZY, P. (1994). Physiological approach to heterologous human serum albumin production by *Kluyveromyces lactis* in chemostat culture. *Yeast*, **10**: 1297-1303.
- KEMP, D.L. & QUICKENDEN, J. (1989). Whey processing for a profit-worthy alternative. En: *Resources and Applications of Biotechnology*. The New Wave. (R. Greenshields, ed.), The MacMillan Press Ltd, England, pp: 323-331.
- KENGEN, W.M., LUESINK, E.J., STAMS, J.M. & ZEHNDER, J.B. (1993). Purification and characterization of an extremely thermostable  $\beta$ -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Eur. J. Biochem.* **213**: 305-312.
- KESHAVARZ, E., HOARE, M. & DUNNHILL, P. (1987). Biochemical engineering aspects of cell disruption. En: *Separations for biotechnology*, (Verrall, M.S. & Hudson, M.J., eds.). Ellis Horwood Series, Chichester/England, Cap. 3.
- KIM, S.H., LIM, K.P. & KIM, H.S. (1997). Differences in the hydrolysis of lactose and other substrates by  $\beta$ -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *J. Dairy Sci.*, **80**: 2264-2269.
- KLEBE, R. J., HARRIS, J. V., SHARP, Z.D. & DOUGLAS, M.G. (1983). A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene*, **25**: 333-341.
- KONECNY, P., BROWN, R.J., WILLIAM, H.S. (1994). Chromatographic purification of immunoglobulin G from bovine milk whey. *J. Chromatogr. A.*, **673**: 45-53.

- KOSIKOWSKI, F.V. (1979). Whey utilization and whey products. *J. Dairy Sci.* **62**: 1149-1160.
- KOTYLAK, Z. & EL-GEWELY, M.R. (1991). A genetic analysis of an alpha-amylase super-secretor in yeast; implications for the regulatory pathway. *Curr. Genet.* **20**: 181-184.
- KOZEMPEL, M. & KURANTZ, M. (1994 a). The isomerization kinetics of lactose to lactulose in the presence of borate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **59**: 25-29.
- KOZEMPEL, M. & KURANTZ, M. (1994 b). A continuous reactor system for production of lactulose. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **59**: 265-269.
- KUMAR, P.K.R. & LONSANE, B.K. (1987). Extraction of gibberellic acid from dry mouldy bran produced under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **October**: 139-143.
- KUMAR, P.K.R. & LONSANE, B.K. (1989). Microbial production of gibberellins: State of the art. *Adv. Appl. Microbiol.*, **28**: 30-140.
- KUMAR, V., RAMAKRISHNAN, S., TEERI, T.T., KNOWLES, J.K.C. & HARTLEY, B.S. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase grow on whey permeate. *Bio/Technology*, **10**: 82-85.
- KUMAR, J.V., SHAHBAZI, A. & MATHEW, R. (1998). Bioconversion of solid food wastes to ethanol. *Analyst.*, **123**: 497-502.
- KUSHNER, S.R. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI derived plasmids. En: *Genetic Engineering* (Boyer, H.W. & Nicosia, S., eds.), Elsevier. Amsterdam. Pp. 17-23.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-683.
- LAMMERTYN, E. & ANNÉ, J. (1998). Modifications of *Streptomyces* signal peptides and their effects on protein production and secretion. *FEMS Microbiology Letters*, **160**: 1-10.



- LARRIBA, G. (1993). Translocation of proteins across the membranes of the endoplasmic reticulum: a place for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **9**: 441-463.
- LEIRO, J., TORANZO, A.E., ESTEVEZ, J., LAMAS, J., BARJA, J.L. & UBEIRA, F.M. (1996). The humoral immune response of turbot to recently isolated pathogenic *Enterococcus* strains. Cross-reactivity with other Gram-positive bacteria. *Veterinary Microbiology*, **48**: 29-39.
- LEIS, R., TOJO, R., PAVÓN, P. & DOUWES, A. (1997). Prevalence of lactose malabsorption in Galicia. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **25**: 296-300.
- LEPAROUX, S., PADRINES, M., PLACIER, G. & COLAS, B. (1997). Characterization of a strictly specific acid  $\beta$ -galactosidase from *Achatina achatina*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1336**: 522-532.
- LEWIS, M.J., SWEET, D.J. & PELHAM, H.R.B. (1990). The *ERD2* gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell*, **61**: 1359-1363.
- LIND, D.L., DANIEL, R.M., COWAN, D.A. & MORGAN, H.W. (1989).  $\beta$ -galactosidase from a strain of the anaerobic thermophile *Thermoanaerobacter*. *Enzyme Microb. Technol.*, **11**: 180-186.
- LONSANE, B.K., GHILDYAL, N.P., BUDIATMAN, S. & RAMAKRISHNA, S.V. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, **7**: 258-265.
- LÓPEZ-LEIVA, M.H. & GUZMÁN, M. (1995). Formation of Oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. *Process Biochemistry*, **30**: 757-762.
- LORENZO CIMADEVILLA, F. (1988). Determinación y caracterización de los vertidos de una industria láctea. Tesina de Licenciatura. Universidad de Santiago de Compostela.
- LOWRY, C.V., WEISS, J.L., WALTHALL, A. & ZITOMER, R.S. (1983) Modulator sequences mediate oxygen regulation of *CYC1* and neighbouring gene in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **80**: 151-155.

- MACPHERSON, J. M. & KHACHATOURIANS, G.G. (1991). Partial purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase produced by *Beauveria bassiana*. *Biotechnol and Appl. Biochem.* **13**: 217-230.
- MACHADO, K.M.G. & LINARDI, U.R. (1990). Production of amylase and  $\beta$ -galactosidase by yeasts. *Arq. Biol. Tecnol.*, **33**: 247-253.
- MACREADIE, I.G., CASTELLI, L.A., WARD, A.C., STARK, M.J.R. & AZAD, A.A. (1993). Secretion of  $\beta$ -lactamase from *K. lactis* using pePS1, a convenient episomal vector designed for the secretion of foreign proteins. *Biotechnol. Lett.* **15**: 213-218.
- MAMMARELLA, E.J. & RUBIOLO, A.C. (1996). Response surface methodology to optimize  $\beta$ -galactosidase immobilization using a combination of hydrocolloids as the supporting matrix. *Biotechnol. Prog.*, **12**: 612-617.
- MANSOUR, M.H., GHALY, A.E., BEN-HASSAN, R.M. & NASSAR, M.A. (1993). Modeling batch production of single cell protein from cheese whey. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **43**: 1-13.
- MARGOT, A., FLASCHEL, E. & RENKEN, A. (1994). Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis. Correlation of base consumption with soluble nitrogen content. *Proc. Biochem.*, **29**: 257-262.
- MARTIN, T.F.J. (1998). Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation and membrane trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**: 231-64.
- MARWAHA, S.S. & KENNEDY, J.F. (1988). Review: whey-polution problem and potential utilization. *International J. Food Sci. Technol.*, **23**: 323-336.
- MATTLACK, K.E.S., MOTHENS, W. & RAPOPORT, T.A. (1998). Protein translocation: tunnel vision. *Cell*, **92**: 381-390.

- MAULLU, C., LAMPIS, G., BASILE, T., INGIANNI, A., ROSSOLINI, G.M. & POMPEI, R. (1999). Production of lysozyme-enriched biomass from cheese industry by-products. *J. Appl. Microbiol.*, **86**: 182-186.
- MAWSON, A.J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Biores. Technol.* **47**: 195-203.
- MBUYI-KALALA, A., SCHNEK, A.G. & LEONIS, J. (1988). Separation and characterization of four enzyme forms of  $\beta$ -galactosidase from *Saccharomyces lactis*. *Eur. J. Biochem.*, **178**: 437-443.
- MELNICK, L.M., TURNER, B.G., PUMA, P., PRICE-TILLOTSON, B., SALVATO, K.A., DUMAIS, D.R., MOIR, D.T., BROEZE, R.J. & AVGERINOS, G.C. (1990). Characterization of a nonglycosylated single chain urinary plasminogen activator secreted from yeast. *The journal of biological chemistry*, **265**: 801-807.
- MÉNDEZ, R., BLÁZQUEZ, R., LORENZO, F. & LEMA, J.M. (1989). Anaerobic treatment of cheese whey: start-up and operation. *Water Sci. Technol.*, **21**: 1857-1860.
- MESSING, J. (1979). A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13. *Recomb. DNA Terch. Bull.*, **2**: 43.
- MILLARD, C. & CHARLES, S.M. (1990). Preparation of extracts from prokaryotes. En: *Methods in enzymology*. Vol. 182, Cap. 12 (Murray P. Deutscher, ed.). Academic Press, Inc., San Diego, California.
- MOROSOLI, R., SHARECK, F. & KLUEPFEL, D. (1997). Protein secretion in streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, **146**: 167-174.
- MOTHES, W., JUNGNICHEL, B., BRUNNER, J. & RAPOPORT, T.A. (1998). Signal sequence recognition in cotranslational translocation by protein components of the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of Cell Biology*, **142**: 355-364.
- MOULIN, G. & GALZY, P. (1984). Whey, a potential substrate for biotechnology. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **1**: 347-374.

- MÜLLER, S., SANDAL, T., KAMP-HANSEN M. P. & DALBOGE, H. (1998). Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, **14**: 1267-1283.
- MUNISWARAN, P.K.A., SELVAKUMAR, P. & CHARYULU, N.C.L.N. (1994). Production of cellulases from coconut coir pith in solid state fermentation. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **60**: 147-151.
- MUNISWARAN, P.K.A. & CHARYULU, N.C.L.N. (1994). Solid substrate fermentation of coconut coir pith for cellulase production. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**: 436-440.
- MURADO, M.A., GONZÁLEZ, M.P., TORRADO, A. & PASTRANA, L.M. (1997). Amylase production by solid state culture of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model. *Proc. Biochem.*, **32**: 35-42.
- NACKEN, V., ACHSTETTER, T. & DEGRYSE, E. (1996). Probing the limits of expression levels by varying promoter strength and plasmid copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **175**: 253-260.
- NADER de MACIAS, M.E., MANCA de NADRA, M.C., STRASSER de SAAD, A.M., HOLGADO, P.R. & OLIVER, G. (1983). Isolation and purification of beta-galactosidase of *Lactobacillus murinus* CNRZ 313. *Current Microbiology*, **9**: 99-104.
- NAM, S-W., YODA, K. & YAMASAKI, M. (1993). Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, **15**: 1049-1054.
- NEUHOFF, V., STAMM, R. & EIBK, H. (1985). Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis* **6**: 427-448.
- NOLAN, A.M., BARRON, N., BRADY, T., McAREE, T., SMITH, D., McHALE, L. & McHALE, A.P. (1994). Ethanol production at 45° by an alginate-immobilized, thermotolerant strain of *Kluyveromyces*

- marxianus* following growth on glucose-containing media. *Biotechnol. Lett.*, **16**: 849-852.
- NORTON, S., LACROIX, C. & VUILLEMARD, J.-C. (1994). Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**: 457-466.
- NOTHWEHR, S.F. & STEVENS, T.H. (1994). Sorting of membrane proteins in the yeast secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, **269**: 10185-10188.
- NOVICK, P., COLLINS, R., WALCH-SOLIMENA, C., DU ELKIND, N.B., FINGER, F.P., GUO, W., GROTE, E. & CARR, C. (1999). Spatial regulation of exocytosis in yeast. *Current Genetics*, **35**: 168.
- OUCHTERLONY, Ö. & NILSSON, L.A. (1986). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En *Immunochemistry*, vol 1, Cap. 32. Ed. Weir, D. M. Blackwell scientific publications, Oxford. U.K.
- OUTINEN, M., TOSSAVAINEN, O., TUPASELA, T., KOSKELA, P., KOSKINEN, H., RANTAMÄKI, P., SYVÄOJA, E.-L., ANTILA, P. & KANKARE, V. (1996). Fractionation of proteins from whey whit different pilot scale processes. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, **29**: 411-417.
- ORTEGA-LÓPEZ, J., MORALES-RAMOS, L.H., MONTES, M.C. & MAGAÑA-PLAZA, I. (1993). Lactose hydrolysis by immobilized  $\beta$ -galactosidase on nylon-6: a novel spin-basket reactor. *Biotechnol. Lett.*, **7**: 775-780.
- OVSEJEVI, K., GRAZÚ, V. & BATISTA-VIERA, F. (1998).  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* immobilized on to thiosulfinate/thiosulfonate supports for lactose hydrolysis in milk and dairy by-products. *Biotechnology Techniques*, **12**: 143-148.
- PAIFER, E., MARGOLLES, E., CREMATA, J., MONTESINO, R., HERRERA, L. & DELGADO, J.M. (1994). Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast*, **10**: 1415-1419.

- PANDEY, A. (1991). Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. *Process Biochemistry*, **26**: 355-361.
- PANDEY, A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, **27**: 109-117.
- PASTRANA, L., GONZÁLEZ, M.P., PINTADO, J. & MURADO, M.A. (1995). Interactions affecting gibberellic acid production in solid-state culture. A factorial study. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**: 784-790.
- PASTRANA, L. (1996). Fundamentos de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, **1**: 4-12.
- PATEL, C. & MADAMWAR, D. (1996). Biomethanation of a mixture of salty cheese whey and poultry waste or cattle dung. A study of effect of temperature and retention time. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **60**: 159-166.
- PAUL, D., CHATTERJEE, B.P. & GUHA, A.K. (1998). Some biochemical changes during fermentation of food yeast *Kluyveromyces fragilis* in whey. *Biochemical Archives*, **14**: 43-48.
- PELHAM, H.R.B. & MUNRO, S. (1993). Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. *Cell*, **75**: 603-605.
- PENG, R., GRABOWSKI, R., DE ANTONI, A. & GALLWITZ, D. (1999). A COPII component binds to the cis-Golgi t-SNARE in a Sar1p-independent manner. *Current Genetics*, **35**: 426.
- PENTTILÄ, M.E, SUIHKO, M.-L., LEHTINEN, U., NIKKOLA, M. & KNOWLES, K.C. (1987). Construction of brewer's yeasts secreting fungal endo- $\beta$ -glucanase. *Curr. Genet.*, **12**: 413-420.
- PEREA, A., UGALDE, U., RODRÍGUEZ, I. & SERRA, J.L. (1993). Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversion processes. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**: 418-423.

- PFEFFER, S.R. (1996). Transport vesicle docking: SNAREs and associates. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**: 441-461.
- PIGNATELLI, R., VAI, M., ALBERCHINA, L. & POPOLO, L. (1998). Expression and secretion of  $\beta$ -galactosidase in *Saccharomyces cerevisiae* using the signal sequences of GgpI, the major yeast glycosylphosphatidylinositol-containing protein. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **27**: 81-88.
- PINTADO, J., TORRADO, A., GONZÁLEZ, M.P. & MURADO, M.A. (1998). Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of *Aspergillus niger* on polyurethane foams. *Enzyme Microb. Technol.*, **23**: 149-156.
- POCH, O, L'HOTE, H., 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.
- PORRO, D., MARTEGANI, E., RANZI, B.M. & ALBERGHINA, L. (1991). Heterologous gene expression in continuous cultures of budding yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 632-636.
- PORRO, D., MARTEGANI, E., RANZI, B.M. & ALBERGHINA, L. (1992 a). Development of high cell density cultures of engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells able to grow on lactose. *Biotechnology Letters*, **14**: 1085-1088.
- PORRO, D., MARTEGANI, E., RANZI, B.M. & ALBERGHINA, L. (1992 b). Lactose/Whey utilization and ethanol production by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. & Bioeng.* **39**: 799-805.
- PORTACCIO, M., STELLATO, S., ROSSI, S., BENCIVENGA, U., MOHY ELDIN, M.S., GAETA, F.S. & MITA, D.G. (1998). Galactose competitive inhibition of  $\beta$ -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) immobilized on chitosan and nylon supports. *Enzyme Microb. Technol.*, **23**: 101-106.

- PRIETO, B., FRANCO, I. & CARBALLO, J. (1997). Los quesos de Galicia: características tecnológicas, bioquímicas, microbiológicas y organolépticas. *Alimentaria*, **Diciembre**: 29-37.
- PRITCHARD, D.I., MAIZELS, R.M., BEHNKE, J.M. & APPLEBY, P. (1984). Stage-specific antigens of *Nematospiroides dubius*. *Immunology*, **53**: 325-335.
- PROTOPOPOV, V., GOVINDAN, B., NOVICK, P. & GERST, J.E. (1993). Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell*, **74**: 855-861.
- RALPH, B.J. (1976). Solid substrate fermentations. *Food technology in Australia*, **July**: 247-251.
- RAMAKRISHNAN, S. & HARTLEY, B.S. (1993). Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 4230-4235.
- RAMESH, M.V. & LONSANE, B.K. (1987). Solid state fermentation for production of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus megaterium* 16M. *Biotechnology Letters*, **9**: 323-328.
- RAPIN, J.-D., MARISON, I.W., VON STOCKAR, U. & REILLY, P.J. (1994). Glycerol production by yeast fermentation of whey permeate. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**: 143-150.
- RAPOPORT, T.A. (1992). Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science*, **258**: 931-941.
- RAPOPORT, T.A., JUNGnickel, B. & KUTAY, U. (1996). Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**: 271-303.
- REID, G.A. (1991). Protein targeting in yeast. *Journal of General Microbiology*, **137**: 1765-1773.
- RÍOS, S., PEDREGOSA, A.M., MONISTROL, I.F. & LABORDA, F. (1993). Purification and molecular properties of an  $\alpha$ -galactosidase



- synthesized and secreted by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, **112**: 35-42.
- ROBBINS, C.W. & LEHRSCHE, A. (1998). Cheese whey as a soil conditioner. En: *Books in soils, plants and the environment* (Wallace, Terry & Dekker, M., eds). USA. Cap. 6.
- ROBINSON, M.S. (1997). Coats and vesicle budding. *Trends in Cell Biology*, **7**: 99-102.
- RODRÍGUEZ, L., NARCIANDI, R.E., ROCA, H., CREMATA, J., MONTESINOS, R., RODRÍGUEZ, E., GRILLO, J.M., MUZIO, V., HERRERA, L.S. & DELGADO, J.M. (1996). Invertase secretion in *Hansenula polymorpha* under the *AOX1* promoter from *Pichia pastoris*. *Yeast*, **12**: 815-822.
- ROMANOS, M.A., SCORER, C.A. & CLARE, J.J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, **8**: 423-488.
- ROSE, M., WINSTON, F. & HIETER, P. (1990). *Methods in yeast genetics. A laboratory course manual*. Cold Spring Harbour. New York. CSH Lab. Press.
- ROSSINI, D., PORRO, D., BRAMBILLA, L., VENTURINI, M., RANZI, B.M., VANONI, M. & ALBERGHINA, L. (1993). In *Saccharomyces cerevisiae*, protein secretion into the growth medium depends on environmental factors. *Yeast*, **9**: 77-84.
- ROTHMAN, J.E. & ORCI, L. (1992). Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature*, **355**: 409-415.
- ROTHMAN, J.E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, **372**: 55-63.
- ROUKAS, T. & KOTZEKIDOU, P. (1991). Production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells. *Enzyme. Microb. Technol.* **13**: 33-38.
- ROUSSOS, S., OLMOS, A., RAIMBAULT, M., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. & LONSANE, B.K. (1991). Strategies for large

- scale inoculum development for solid state fermentation system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Techniques*, **5**: 415-420.
- RUBIO-TEXEIRA, M., CASTRILLO, J.I., ADAM, A.C., UGALDE, U.O. & POLAINA, J. (1998). Highly efficient assimilation of lactose by a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**: 827-837.
- RUDOLPH, H.K., ANTEBI, A., FINK, G.R., BUCKLEY, C.M., DORMAN, T.E., LEVITRE, J., DAVIDOW, L.S., MAO, J. & MOIR, D.T. (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMR1*, a member of a  $Ca^{2+}$  ATPase family. *Cell*, **58**: 133-145.
- RUOHONEN, L., TOIKKANEN, J., TIEAHO, V., OUTOLA, M., SODERLUND, H. & KERANEN, S. (1997). Enhancement of protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae* by overproduction of sso protein, a late-acting component of the secretory machinery. *Yeast*, **13**: 337-351.
- RUSSELL, I. (1986). Will a recombinant DNA yeast be able to solve whey disposal problems?. *Trends in Biotech.* **49**: 107-108.
- RUSTOM, I.Y.S., FODA, M.I. & LÓPEZ-LEIVA, M.H. (1998). Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis – analysis of factors. *Food Chemistry*, **62**: 141-147.
- SAKAGUCHI, M. (1997). Eukaryotic protein secretion. *Current Opinion in Biotechnology*, **8**: 595-601.
- SAKAI, A., SHIMIZU, Y. & HISHINUMA, F. (1988). Isolation and characterization of mutants which show an oversecretion phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **119**: 499-506.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T. & FRITSCH, E.F. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SÁNCHEZ, M., BECKERICH, J.-M., GAILLARDIN, C., DOMÍNGUEZ, A. (1997). Isolation and cloning of the *Yarrowia lipolytica* SEC65

- gene, a component of the signal recognition particle displaying homology with the human *SRP19* gene. *Gene*, **203**: 75-84.
- SANDRA, L.W. (1994). From the elephant to *E. coli*: SRP-dependent protein targeting. *Cell*, **77**: 787-790.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, S.A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., TREJO-HERNÁNDEZ, M.R., LONSANE, B.K., NAVARRO, J.M., ROUSSOS, S., DUFOUR, D. & RAIMBAULT, M. (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Proc. Biochem.*, **29**: 13-24.
- SCHEKMAN, R. & ORCI, L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science*, **271**: 1526-1532.
- SHANKARANAND, V.S., RAMESH, M.V. & LONSANE, B.K. (1992). Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. *Process Biochemistry*, **27**: 33-36.
- SHAYWITZ, D.A., ESPENSHADE, P.J., GIMENO, R.E. & KAISER, C. A. (1997). COPII Subunit interactions in the assembly of the vesicle coat. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**: 25413-25416.
- SHELIKOFF, M., SINSKEY, A.J. & STEPHANOPOULOS, G. (1996). A modeling framework for the study of protein glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering*, **50**: 73-90.
- SHERMAN, F., FINK, G.R. & LAWRENCE, C.W. (1979). *Methods in yeast genetics*. CSH Laboratory.
- SHEU, D.-C., LI, S.-Y., DUAN, K.-J. & CHEN, C.W. (1998). Production of galactooligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase immobilized on glutaraldehyde-treated chitosan beads. *Biotechnology Techniques*, **12**: 273-276.

- SIENKIEWICZ, T. & RIEDEL, C.-L. (1990). *Whey and Whey Utilization*. Verlag Th. Mann, Germany.
- SISO, M.I.G., CERDÁN, E., FREIRE-PICOS, M.A., RAMIL, E., BELMONTE, E.R. AND TORRES, A.R. (1992). Permeabilization of *Kluyveromyces lactis* cells for milk whey saccharification: a comparison of different treatments. *Biotechnol. Lett.*, **6**: 289-292.
- SISO, M.I.G. (1994).  $\beta$ -galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* on milk whey: batch versus fed-batch cultures. *Proc. Biochem.*, **29**: 565-568.
- SISO, M.I.G. & DOVAL, S.S. (1994). *Kluyveromyces lactis* immobilization on corn grits for milk whey lactose hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**: 303-310.
- SISO, M.I.G. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores. Technol.*, **57**: 1-11.
- SLEEP, D., BELFIELD, G.P. & GOODEY, A.R. (1990). The secretion of human serum albumin from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using five different leader sequences. *Bio/Technology*, **8**: 42-46.
- SMITH, R.A., DUNCAN, M.-J. & MOIR, D.T. (1985). Heterologous protein secretion from yeasts. *Science*, **229**: 1219-1224.
- SMITHERS, G.W., BALLARD, J., COPELAND, A.D., DE SILVA, K.J., DIONYSIUS, D.A., FRANCIS, G.L., GODDARD, C., GRIEVE, P.A., MCINTOSH, G.H., MITCHELL, I.R., PEARCE, J. & REGESTER, G.O. (1996). New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, **79**: 1454-1459.
- SÖLLNER, T., BENNETT, M.K., WHITEHEART, S.W., SCHELLER, R.H., ROTHMAN, J.E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion. *Cell*, **75**: 409-418.
- SOMKUTI, G.A. & HOLSINGER, V.H. (1997). Microbial technologies in the production of low-lactose dairy foods. *Food science and technology international*, **3**: 163-169.

- SOO-WAN, N., YODA, K. & YAMASAKI, M. (1993). Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters*, **15**: 1049-1054.
- SREEKRISHNA, K & DICKSON, R.C. (1985). Construcción of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7909-7913.
- STEPHENS, C. (1998). Protein secretion: getting folded proteins across membranes. *Current Biology*, **8**: R578-R581.
- STEVENSON, E.M., LAW, A.J.R. & LEAVER, J. (1996). Heat-induced aggregation of whey proteins is enhanced by addition of thiolated  $\beta$ -casein. *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 2825-2828.
- STRED'ANSKÝ, M., TOMÁSKA, M., STURDIK, E. & KREMNIČKY, R. (1993). Optimization of  $\beta$ -galactosidase extraction from *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**: 1063-1065.
- STRICKLAND, J.D.H. & PARSONS, T.R. (1968). A practical handbook of sea water analysis. *J. Fish. Res. Board Canada*, vol 167.
- SURVE, S.S. & MAHONEY, R.R. (1994). Kinetic stabilization of *Kluyveromyces marxianus*  $\beta$ -galactosidase by histidine and other aminoacids. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **20**: 55-65.
- SZCZODRAK, J., SZEWCZUK, D., ROGLASKI, J. & FIEDUREK, J. (1997). Selection of yeast strain and fermentation conditions for high-yield ethanol production from lactose and concentrated whey. *Acta Biotechnol.*, **1**: 51-61.
- TEASDALE, R.D. & JACKSON, M.R. (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**: 27-54.
- TIN, C.S.F. & MAWSON, A.J. (1993). Ethanol production from whey in a membrane recycle bioreactor. *Proc. Biochem.*, **28**: 217-221.

- TOUNAGA, M., ISHIBASHI, M., TATSUDA, D. & TOKUNAGA, H. (1997). Secretion of mouse  $\alpha$ -amilasa from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, **13**: 699-706.
- TOLDRA, F. & LEQUERICA, J.L. (1986). Reactores con microorganismos inmovilizados. *Rev. Agroquím. Technol. Aliment.*, **26**: 349-364.
- TOOZE, S., SEETHALER, G. & SHIELDS, D. (1998). The slippery slopes of secretion. *Trends in Cell Biology*, **8**: 211-213.
- TORRADO, A., GONZÁLEZ, M.P. & MURADO, M.A. (1998). pH regulation in solid state culture through the initial ratio between oxidized and reduced sources of nitrogen. A model applicable to the amylase production by *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology Techniques*, **12**: 411-415.
- TORRALBA, S., PEDREGOSA, A.M., DE LUCAS, J.R., DÍAZ, M.S., MONISTROL, I.F. & LABORDA, F. (1996). Effect on the microtubule inhibitor methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) on production and secretion of enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Mycol. Res.*, **100**: 1375-1382.
- TORRES, L., MARTÍN, H., GARCÍA-SAEZ, M.I., ARROYO, J., MOLINA, M., SÁNCHEZ, M. & NOMBELA, C. (1991). A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol. Microbiol.*, **5**: 2845-2854.
- TSCHOPP, J.F., SVERLOW, G., KOSSON, R., CRAIG, W. & GRINNA, L. (1987). High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, **5**: 1305-1308.
- UCELLETTI, D., FARINA, F., MORLUPI, A. & PALLESCHI, C. (1999). Mutants of *Kluyveromyces lactis* with altered protein glycosylation are affected in cell wall morphogenesis. *Res Microbiol.* **150**: 5-12.
- VAD, R., MOE, E., SAGA, K., KVINNSLAND, A.M.V. & OYEN, T.B. (1998). High-level production of human parathyroid hormone (hPTH) by induced expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein expression and purification*, **13**: 396-402.

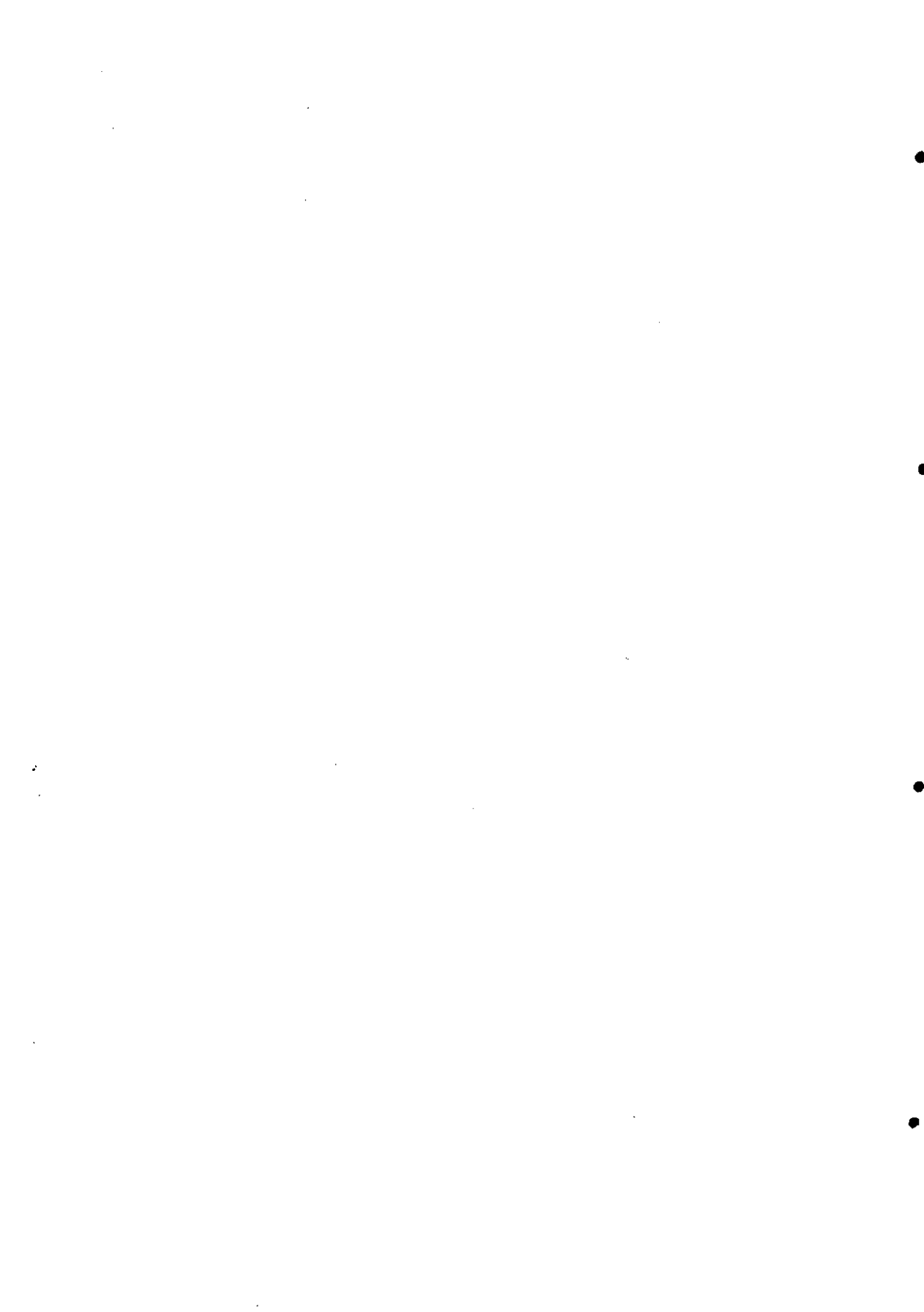
- VAITUKAITIS, J.L. (1981). Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injections. En *Methods in Enzymology*, vol 73, pag: 46-52 (Langone, J.J. & Vunakis, H., eds.). Academic Press. New York.
- VAN den BERG, J., V.der LAKEN, K.J., V. Ooyen, J.J., RENNIERS, T.C.H.M., RIETVELD, K., SHAAP, A., BRAKEE, A.J., BISHOP, R.J., SCHULTZ, K., MOYER, D., RICHMAN, M. & SHUSTER, J.R. (1990). *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology*, **8**: 135-139.
- VAN HUYNH, N. & DECLEIRE, M. (1982). Les cellules entieres de *Kluyveromyces bulgaricus* comme source de  $\beta$ -galactosidase. Comparaison avec l'activite de l'extrait acellulaire. *Rev. Ferment. Indust. Alim.*, **37**: 153-157.
- VANONI, M., PORRO, D., MARTEGANI, E. & ALBERGHIN, L. (1989). Secretion of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase in *Saccharomyces cerevisiae* using the signal sequence from the glucoamylase encoding STA2 gene. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **164**: 1331-1338.
- VARSHAVSKY, A. (1996). The N-end rule: Functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 12142-12149.
- VELLA, M. & GREENWELL, P. (1997). Purification and partial characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Tritrichomonas foetus*. *Glycoconjugate Journal*, **14**: 883-887.
- VENTURINI, M., MORRIONE, A., PISARRA, P., MARTEGANI, E. & VANONI, M. (1997). In *Saccharomyces cerevisiae* a short amino acid sequence facilitates excretion in the growth medium of periplasmic proteins. *Molecular Microbiology*, **23**: 997-1007.
- WALSH, D.J. & BERGQUIST, P.L. (1997). Expression and secretion of a thermostable bacterial xylanase in *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 3297-3300.

- WALTER, P. & JOHNSON, A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**: 87-119.
- WANG, Z. & DA SILVA, N.A. (1993). Improved protein synthesis and secretion through medium enrichment in a stable recombinant yeast strain. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 95-102.
- WEETALL, H.H., HAVEWACA, N.B., PACHER, W.H. DETAR, C.C. VANN, W.P. & YAVERBAUM, S. (1974). The preparation of immobilized lactase and its use in the enzymatic hydrolysis of acid whey. *Biotechnol. & Bioeng.*, **16**: 295-313.
- WIACEK-ZYCHLINSKA, A., CZAKAJ, J. & SAWICKA-ZUKOWSKA, R. (1994). Xylanase production by fungal strains in solid state fermentations. *Bioresource Technology*, **49**: 13-16.
- WITTRUP, K.D. & BENIG, V. (1994). Optimization of aminoacid supplements for heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Tech.*, **8**: 161-166.
- YANG, S.T. & SILVA, E.M. (1995). Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *J. Dairy Sci.*, **78**: 2541-2562.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J. & MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**: 103-119.
- YELLORE, V. & DESAI, A. (1998). Production of poly-3-hydroxybutyrate from lactose and whey by *Methylobacterium* sp. ZP24. *Letters in Applied Microbiology*, **26**: 391-394.
- YVES, P.V. (1979). Le lactoserum. *Revue laitiere Française*, **372**: 27-39.
- ZADOW, J.G. (1992). En: Whey and lactose processing. Elsevier Science Publishers. England.



- ZAYED, G. & ZAHRAN, A.S. (1991). Lactic acid production from salt whey using free and agar immobilized cells. *Letters in Applied Microbiology*, **12**: 241-243.
- ZHENG, N. & GIERASCH, L.M. (1996). Signal sequences: the same yet different. *Cell*, **86**: 849-852.
- ZHU, Y., SMITS, J.P., KNOL, W. & BOL, J. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnology letters*, **16**: 643-648.
- ZITOMER, R.S. & HALL, B.D. (1976). Yeast cytochrome c messenger RNA in vitro translation and specific immunoprecipitation of the *CYC1* gene product. *J. Biol. Chem.*, **251**: 6320-6326.

## **7. ANEXO.**





# Yeast $\beta$ -galactosidase in solid-state fermentations

M. Becerra and M. I. González Siso

*Departamento de Biología Celular e Molecular, Universidade da Coruña, A Coruña, Spain*

*A simple and economical system is proposed for producing  $\beta$ -galactosidase with the yeast *Kluyveromyces lactis* in solid-state fermentations on corn grits or wheat bran moistened with deproteinized milk whey. By means of a full-factorial design, we studied some conditions that improve this production. Results of liquid- and solid-state cultures were compared with the latter proving to be more effective. We have demonstrated that changing from liquid- to solid-state cultures does not promote  $\beta$ -galactosidase secretion by *Kluyveromyces lactis*.*

**Keywords:** Solid-state fermentations; *Kluyveromyces lactis*;  $\beta$ -galactosidase; milk whey

## Introduction

The enzymatic hydrolysis of lactose to glucose and galactose with  $\beta$ -galactosidase (E.C.3.2.1.23) constitutes the basis of the most promising biotechnological processes currently being developed to exploit the sugar content of milk whey, a by-product of cheese-making whose disposal now constitutes a considerable pollution problem.<sup>1,2</sup> The industrial development of such processes has hitherto been limited by the high costs associated with  $\beta$ -galactosidase production; *Kluyveromyces* yeasts are the most important source of this enzyme.<sup>3-5</sup>

The selection of an inexpensive and easily available substrate together with a suitable producer microorganism, optimization of culture conditions, and effective downstream processing are essential to reduce the cost of enzyme preparation.<sup>6</sup> Up to now, yeast  $\beta$ -galactosidase has mostly been obtained through liquid-state fermentation. The improvement of  $\beta$ -galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* in liquid fermentation and use in saccharifying milk whey lactose have been the subjects of previous research.<sup>7-10</sup>

Solid-state fermentation (SSF) systems have generated much interest in recent years because they offer several

economical and practical advantages: higher product concentration, improved product recovery, very simple cultivation equipment, reduced wastewater output, lower capital investment, and lower plant operation costs.<sup>6,11-13</sup> However, we know of no reports on yeast  $\beta$ -galactosidase production in solid-state cultures.

In this work, we propose a simple and economical system and optimize some conditions for  $\beta$ -galactosidase production by *K. lactis* in solid-state cultures on corn grits or wheat bran moistened with deproteinized milk whey.

## Materials and methods

### Milk whey

Milk whey was obtained from a local dairy plant (Quegalsa, Ferrol, A Coruña). Prior to use, proteins were removed by centrifugation (15 min at 10,000 rpm) under sterile conditions after precipitation by autoclave treatment at 121°C for 15 min. In order to obtain higher initial levels of lactose in the cultures, milk whey was concentrated by lyophilization up to fivefold.

### Microorganism and culture conditions

*Kluyveromyces lactis* NRRL-Y1140 was used, and for solid supports, corn grits of two average diameters (0.2 and 0.8 mm; specific areas 3.18 and 0.88 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, respectively) and wheat bran were chosen. The supports (1 g 100 ml<sup>-1</sup> Erlenmeyer flask) were first autoclaved and then moistened with 3 ml of liquid phase (sterile-distilled water or concentrated deproteinized milk whey). As inocula, 1 ml of a liquid preculture on milk whey (30°C, 250 rpm, 20 h) was used. When higher inocula were required, cells were concentrated up to tenfold by centrifugation. Cultures were incubated at 30°C with orbital shaking at 250 rpm.

Address reprint requests to Dr. M. I. G. Siso, Departamento de Biología Celular e Molecular, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira, s/n 15071-A Coruña, Spain  
Received 31 January 1995; revised 1 August 1995; accepted 29 August 1995

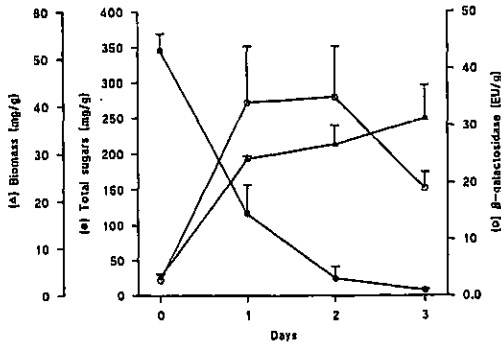
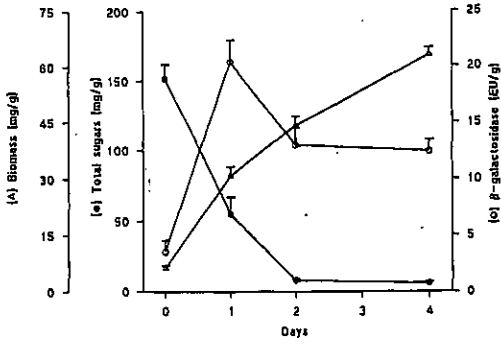


Figure 1 Solid-state culture of *K. lactis* on corn grits moistened with concentrated milk whey up to two initial lactose levels: 150 mg lactose g<sup>-1</sup> support (top) and 350 mg lactose g<sup>-1</sup> support (bottom). Results represent the average of three (top) and four (bottom) different cultures. Vertical rods indicate standard errors

Samples were taken at different times and analyzed for β-galactosidase activity, total and reducing sugars, and biomass. The support in each Erlenmeyer was washed 5 times with 2 ml distilled

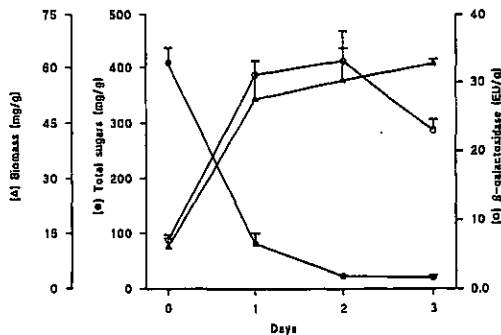


Figure 2 Solid-state culture of *K. lactis* on wheat bran moistened with concentrated milk whey up to a level of 350 mg lactose g<sup>-1</sup> support. Results are the average of four different cultures. Vertical rods indicate standard errors

water in order to extract cells and dissolve remaining sugars. The liquid phases obtained from each Erlenmeyer were joined and centrifuged to separate the yeasts. The pellet was used to determine intracellular β-galactosidase activity and biomass. In the supernatant, extracellular β-galactosidase activity and total and reducing sugars were determined.

### β-galactosidase activity

To determine β-galactosidase activity, the method of Guarante<sup>14</sup> was used. Liberated o-nitrophenol (ONP) was measured spectrophotometrically at 420 nm (extinction coefficient of 4,500 l mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>).<sup>15</sup>

One enzyme unit (EU) is defined as the quantity of enzyme that catalyzes the liberation of 1 mmol of ONP from ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside per min under assay conditions. EU are expressed per g of support.

### Sugars and biomass

Total sugars were determined by the method of Dubois *et al.*<sup>16</sup> and reducing sugars by the method of Bernfeld<sup>17</sup> both with glucose as standard.

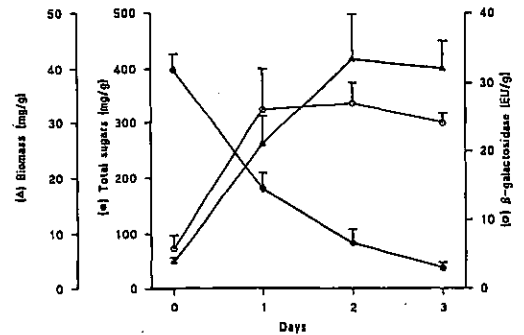
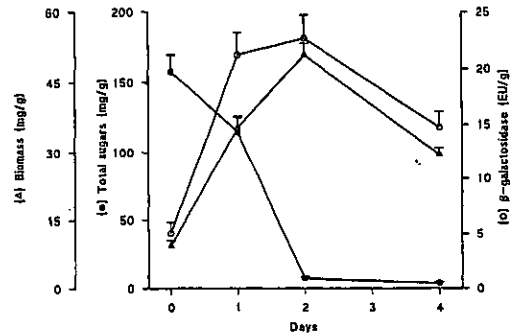


Figure 3 Liquid-state culture of *K. lactis* on concentrated milk whey up to two initial lactose levels: 50 mg lactose ml<sup>-1</sup> (top) and 150 mg lactose ml<sup>-1</sup> (bottom). Substrate (3 ml) plus 1 ml of inoculum was shaken in a 25-ml Erlenmeyer flask at 30°C and 250 rpm. Results represent the average of three (top) and four (bottom) different cultures. Vertical rods indicate standard errors

Table 1 Yields of biomass and  $\beta$ -galactosidase in the various cultures analyzed (mean  $\pm$  SE)

Culture	$Y_{x/s}$ biomass consumed sugars <sup>-1</sup> mg/mg <sup>-1</sup>	$Y_{p/x}$ $\beta$ -galactosidase biomass <sup>-1</sup> EU mg <sup>-1</sup>	
a	Liquid—150 mg lactose	0.32 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.04
b	Liquid—350 mg lactose	0.14 $\pm$ 0.01	0.81 $\pm$ 0.09
c	Corn grits—150 mg lactose g <sup>-1</sup>	0.43 $\pm$ 0.04	0.67 $\pm$ 0.05
d	Corn grits—350 mg lactose g <sup>-1</sup>	0.12 $\pm$ 0.02	1.07 $\pm$ 0.07
e	Wheat bran—350 mg lactose g <sup>-1</sup>	0.17 $\pm$ 0.02	0.61 $\pm$ 0.11

Statistical comparisons by means of unpaired Student's *t*-tests ( $\alpha = 0.05$ ). Sample size: Three for data in rows a,c and four for data in rows b, d, e.

<sup>a</sup>At the point of maximum biomass.

<sup>b</sup>At the point of maximum  $\beta$ -galactosidase.

Yeast biomass was determined by weighing after overnight drying at 60°C. In the case of wheat bran as support, the weight corresponding to support compounds (that are extracted joined to biomass and not metabolized by the yeast) was subtracted through a control of support without cells.

Values of sugars and biomass are given in mg g<sup>-1</sup> of support.

#### Statistical methods

To study the combined influence of three culture variables on  $\beta$ -galactosidase production by *K. lactis*, a full-factorial design was used. An optimum point was sought according to the method of the maximum slope.<sup>18-20</sup> Statistical calculations were done with the program *Statgraphics* 6.0 (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation).

All statistical comparisons were by means of unpaired Student's *t*-tests ( $\alpha = 0.05$ ).

#### Results and discussion

To evaluate the capacity of corn grits and wheat bran to serve, supplement-free, as nutrients and/or substrates to promote the synthesis of  $\beta$ -galactosidase by *K. lactis*, a set of cultures was performed by adding 3 ml of distilled water (the previously estimated quantity that the supports could absorb without leaving free water) and 1 ml of inoculum derived from a culture of deproteinized milk whey to 1 g of support (corn grits or wheat bran). In such conditions, sugars available to the yeast were scarce and neither significant growth nor  $\beta$ -galactosidase production was observed throughout the assayed period of time (up to 96 h).

Cultures were made by adding deproteinized milk whey (concentrated to obtain approximate levels of 150 and 350 mg of lactose in 3 ml of liquid phase) and 1 ml of inoculum to 1 g of the supports. The results are shown in *Figures 1* and *2*. When deproteinized milk whey was used as substrate for the SSF on corn grits or wheat bran, significant growth and  $\beta$ -galactosidase production levels by *K. lactis* were obtained, with nearly all the available sugars being utilized in the assayed period of time.

Although it is not usual to utilize liquid cultures with such large inocula, for comparative purposes, cultures were made with the same conditions as described above but without support (*Figure 3*).

In *Table 1*, estimated yields in biomass from substrate ( $Y_{x/s}$ ) and  $\beta$ -galactosidase from biomass ( $Y_{p/x}$ ) are shown.

Observed  $Y_{p/x}$  values for cultures on corn grits were significantly higher than corresponding values for wheat-bran cultures and liquid cultures at the same sugar level. These results show that the solid-state process on corn grits was more effective. Therefore, this situation was deemed more interesting for our purposes.

In the case of corn grits, while  $Y_{p/x}$  for higher lactose level cultures was significantly higher than for lower lactose level cultures,  $Y_{x/s}$  was significantly higher for lower lactose level cultures.

In searching for the conditions that maximize  $\beta$ -galactosidase production by *K. lactis* in the solid-state cultures on corn grits presented here, we studied the influence of three variables (initial lactose level, amount of inoculum, and incubation time at 30°C) and their interactions on this response by means of a full-factorial design whose range and coding criteria of variables are given in *Table 2*. Shown in *Table 3* are the experimental matrix, the results obtained for the response ( $\beta$ -galactosidase activity) and other culture parameters, and the coefficients of the variables showing the significant coefficients in the function of the Student's *t*-test at a 95% significance level. The adequacy of the first-order model is proven by the estimation of the curvature (*Table 3*). This parameter represents the sum of the coefficients of the three variables squared and, in the case studied here, is negligible. The system can be represented by the following codified equation (significance tested by Fisher *F*-test) in

Table 2 Experimental domain and codification of the variables used in the full-factorial design

Coded values	Natural values		
	Time (h)	Sugars (mg g <sup>-1</sup> )	Inoculum (mg g <sup>-1</sup> )
-1	22	150	2
0	44	300	7
+1	66	450	12

Codification:  $V_c = (V_n - V_0)/\Delta V_n$ ; Decodification  $V_n = V_0 + (\Delta V_n \cdot V_c)$  where  $V_c$  = coded value,  $V_n$  = natural value,  $V_0$  = natural value in the center of the experimental domain,  $\Delta V_n$  = increment of  $V_n$  corresponding to one unit of  $V_c$ .

**Table 3** Experimental results of the full-factorial design (2<sup>3</sup>) for the study of  $\beta$ -galactosidase production by *Kluyveromyces fragilis* in solid-state cultures and analysis of the significance and adequacy of the proposed model. Variables according to table 2.

T	S	I	Biomass (mg g <sup>-1</sup> )	Sugars (mg g <sup>-1</sup> )	Observed $\beta$ G (EU <sup>-1</sup> g)	Expected $\beta$ G (EU g <sup>-1</sup> )	Standardized residuals	Coefficients	t	Significance level ( $\alpha = 0.05$ )	
1	1	1	54	11	13.82	14.47	-1.40	Constant	12.55	34.58	0.0000
2	-1	1	54	13	28.12	28.32	-0.36	T	-3.42	-7.70	0.0006
3	1	-1	40	10	11.45	12.11	-1.4	S	4.16	9.37	0.0002
4	-1	-1	42	45	11.75	11.95	-0.36	I	3.13	7.04	0.0009
5	1	-1	34	9	5.90	6.10	-0.36	T · S	-0.23	-0.47	0.6626 N.S.
6	-1	-1	28	19	13.15	13.81	-1.4	T · I	-1.98	-4.42	0.0069
7	1	-1	24	9	3.62	3.82	-0.36	S · I	1.56	3.50	0.0172
8	-1	-1	24	31	9.15	9.81	-1.4	T · S · I	-1.53	-3.45	0.0182
9	0	0	42	11	13.50	12.55	0.75				
10	0	0	41	10	14.80	12.55	3.04 <sup>a</sup>				
11	0	0	44	10	12.75	12.55	0.15				
12	0	0	41	13	12.60	12.55	0.04				

Curvature: (13.41-12.12)  $\pm$  1.26 = 1.29  $\pm$  1.26 (N.S.)

M $\beta$ G<sub>o</sub> = Mean  $\beta$ G observed values in experiments 1-8

M $\beta$ G<sub>c</sub> = Mean  $\beta$ G observed values in experiments 9-12 (center of the domain)

N.S. = not significant

M $\beta$ G<sub>c</sub> = 12.12

M $\beta$ G<sub>o</sub> = 13.41

<sup>a</sup>1 residual beyond 3  $\sigma$

#### Analysis of variance of the full regression

Source	Sum of squares	DF	Mean squares	F ratio	P value
Model	379.882	6	63.3137	40.0682	0.0005
Error	7.900	5	1.580		
Total (Corr.)	387.783	11			

R-squared (Adj. for d.f.) = 0.955    Std. error of est. = 1.257.

which only the interaction between time and initial sugar (lactose) level failed to influence the response:

$$\beta G = 12.55 - 3.42 T + 4.16 S + 3.13 I - 1.96 T I + 1.56 S I - 1.54 T S I \quad (1)$$

Some of the more representative surface responses corresponding to this equation are represented in Figure 4. These surfaces are planes defined by pairs of variables having the third variable fixed (values -1, +1). As can be seen in Figure 4, the response increases in each situation of our experimental domain when initial sugar levels and inoculum are increased (positive coefficient) and when time is reduced (negative coefficient). The highest value of the response is obtained in the corner S = +1, I = +1, T = -1. To find an optimum positioned outside of the experimental domain, the method of maximum slope was applied, increasing the values of the variables proportionately to their coefficients (0.5 codified units for the smaller coefficient) in the direction of the increase of the response. An exception was made with time. Out of the experimental domain (results of initial cultures support this hypothesis) the response could not be higher with increased initial sugar levels for very short incubation times (10 h or less). Moreover, reducing the time involves leaving high levels of nonutilized

sugars. Other limits are presented by inoculum and milk whey concentration because a) the need to concentrate cells from liquid culture or milk whey would negatively influence the economy of the process, thereby adding to the fermentation cost; b) lactose crystallization would prevent a greater concentration of milk whey from obtaining the desired initial concentration of lactose in the required liquid phase volume; and c) a larger inoculum or substrate (milk whey) volume would be detrimental to growth because the free excess liquid present in unabsorbed form would give rise to an additional diffusional barrier and lead to a decrease in growth and enzyme production. Inoculum amount controls the initial lag phase with lower inoculum lengthening the lag phase.<sup>21</sup> In fact, preliminary cultures made with a higher liquid phase produced negative results (data not shown). Hence, the initial theoretical conditions of 550 mg of lactose and 14.5 mg of biomass were analyzed, but increased up to threefold the incubation time suggested by the maximum slope method. The results obtained (Figure 5) show maximum  $\beta$ -galactosidase activity under such conditions at 28 h.

Secretion of microbial enzymes in solid-state cultures that are intracellular in liquid cultures has been described.<sup>22</sup> This possibility was studied using unsupplemented cultures

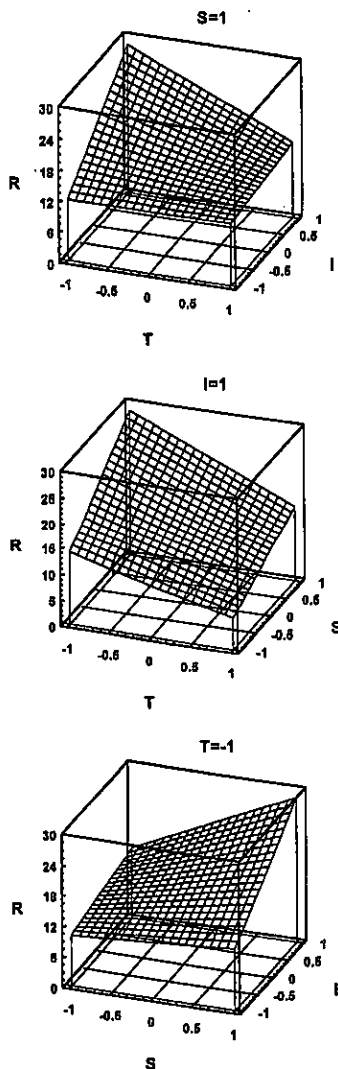


Figure 4 Response surfaces obtained in the studied solid-state fermentations according to the experimental plan defined in Table 3. R = response ( $\beta$ -galactosidase activity). Names and values of variables are in Table 2

and cultures supplemented with Tween-80, because  $\beta$ -galactosidase secretion would facilitate the process of enzyme preparation.

As displayed in Table 4, the secretion level does not exceed 10% even with the higher concentration of Tween-80 both in liquid- and solid-state cultures; therefore, we may affirm that changing from liquid- to solid-state cultures does not promote  $\beta$ -galactosidase secretion by *K. lactis* into the culture medium.

The aeration of moist solid medium is one of the critical factors governing productivity in solid-state fermentations.<sup>23,24</sup> Since values obtained for  $Y_{x/s}$  mainly from cultures with higher levels of sugars (Table 1) are typical of fermentative metabolism, we also evaluated the possibility of increasing  $Y_{x/s}$  and therefore of  $\beta$ -galactosidase, by changing to a more oxidative metabolism in performing cultures with forced aeration. However in these, even when air was prehumidified, evaporation was very high and it was difficult to maintain the humidity adequate for yeast growth.

The effect of particle size (and therefore porosity and specific surface area) on solid-state fermentations must also be taken into account. Porosity greatly influences the diffusion of air, nutrients, and products to and from the microorganism. A larger particle diameter favors these factors although the surface area for growth may be smaller. Consequently, a compensation between the two factors must be sought.<sup>6,21,24,25</sup> However, when we tried a higher diameter support (0.8 mm) in order to reduce biomass compaction, no significant differences were evident in  $\beta$ -galactosidase production with the 0.2 mm particles. This problem requires further, more detailed study.

## Conclusion

The data presented here indicate that inexpensive and easily available materials such as corn grits moistened with de-proteinized milk whey can be effectively used as substrate for the production of  $\beta$ -galactosidase by *K. lactis*, thereby contributing to a reduction in the production cost of this enzyme. To our knowledge, this is the first report concerning yeast  $\beta$ -galactosidase production in solid-state cultures over low cost materials.

## Acknowledgments

This work has been supported by the grant BIO94.0961 from the CICYT (Spain). M. Becerra is recipient of a fellowship from the Xunta de Galicia (Spain).

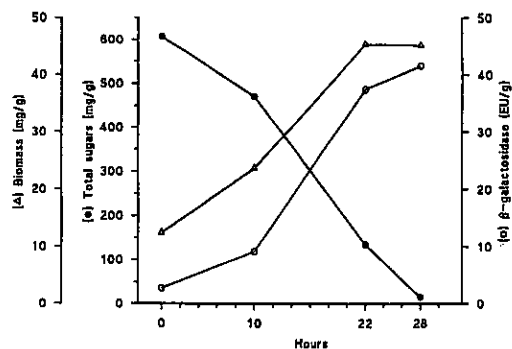


Figure 5  $\beta$ -galactosidase production by *K. lactis* in solid-state fermentation on corn grits moistened with milk whey. Initial level of lactose and inoculum determined by the maximum slope strategy from results of the full-factorial plan



Table 4 Percent of  $\beta$ -galactosidase secretion in liquid- and solid-state cultures supplemented or not with different concentrations of Tween-80

Days of culture	Liquid culture				Corn grits				Wheat bran	
	0% T	0.2% T	0.3% T	0.4% T	0% T	0.2% T	0.3% T	0.4% T	0% T	0.4% T
1	1	2.8	0.05	0.08	0.05	0.03	0.8	3	0.8	9.5
2	0.5	0.7	0.03	0.05	0.56	0.8	5.4	5	1.3	0.5
3	1.9	0.06	0.24	0.04	—	1.9	0.1	3	4.7	2.7

Initial lactose level =  $385 \pm 20 \text{ mg g}^{-1}$ Inoculum =  $6.7 \pm 2.8 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $1 \pm 0.3 \text{ EU g}^{-1}$ 

T is Tween-80

## References

- Sienkiewicz, T. and Riedel, C. L. In: *Whey and Whey Utilization*. Verlag Th. Mann, Germany, 1990
- Castillo, F. J. Lactose metabolism by yeasts. In: *Yeast Biotechnology and Biocatalysis* (Verachert, H. and De Mot, R., Eds.), Marcel Dekker, New York, 1990, 297-320
- Gekas, V. and López Leiva, M. Hydrolysis of lactose: A literature review. *Proc. Biochem.* 1985, 20, 2-12
- Machado, K. M. G. and Linardi, U. R. Production of amylase and  $\beta$ -galactosidase by yeasts. *Arch. Biol. Technol.* 1990, 33, 247-253
- Stred'anský, M., Tomáška, M., Sturdík, E., and Kremnický, L. Optimization of  $\beta$ -galactosidase extraction from *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microb. Technol.* 1993, 15, 1063-1065
- Muniswaran, P. K. A., Selvakumar, P., and Charyulu, N. C. L. N. Production of cellulases from coconut coir pith in solid-state fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1994, 60, 147-151
- Siso, M. I. G., Cerdán, E., Freire Picos, M. A., Ramil, E., Belmonte, E. R., and Torres, A. R. Permeabilization of *Kluyveromyces lactis* cells for milk whey saccharification: A comparison of different treatments. *Biotechnol. Tech.* 1993, 6, 289-292
- Siso, M. I. G.  $\beta$ -galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* on milk-whey: Batch versus fed-batch cultures. *Proc. Biochem.* 1994, 29, 565-568
- Siso, M. I. G., Freire, A., Ramil, E., Belmonte, E. R., Torres, A. R., and Cerdán, E. Covalent immobilization of  $\beta$ -galactosidase on corn grits. A system for lactose hydrolysis without diffusional resistance. *Proc. Biochem.* 1994, 29, 7-12
- Siso, M. I. G. and Suárez Doval, S. *Kluyveromyces lactis* immobilization on corn grits for milk whey lactose hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.* 1994, 16, 303-310
- Kumar, P. K. R. and Lonsane, B. K. Extraction of gibberellic acid from dry moldy bran produced under solid-state fermentation. *Proc. Biochem.* 1987, 22, 139-143
- Zhu, Y., Smits, J. P., Knol, W., and Bol, J. A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Bio-technol. Lett.* 1994, 16, 643-648
- Shankaranand, V. S. and Lonsane, B. K. Ability of *Aspergillus niger* to tolerate metal ions and minerals in a solid-state fermentation system for the production of citric acid. *Proc. Biochem.* 1994, 29, 29-39
- Guarante, L. Yeast promoters and LacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeasts. *Meth. Enzymol.* 1983, 101, 181-189
- Inchaurredo, V. A., Yantorno, O. M., and Voget, C. E. Yeast growth and  $\beta$ -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. *Proc. Biochem.* 1994, 29, 47-54
- Dubois, M., Giles, U. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 1956, 28, 350-356
- Bernfeld, P. Enzymes of starch degradation and synthesis. *Adv. Enzymol.* 1951, 12, 379-427
- Akhazarova, S. and Kafarov, V. In: *Experiment Optimization in Chemistry and Chemical Engineering*. MIR, Moscow, 1982
- Box, G. E. P., Hunter, W. G., and Hunter, J. S. In: *Estadística para Investigadores* Reverté, Barcelona, 1989
- Goupy, J. In: *La méthode Des Plans D'experiences* Bordas, Paris, 1988
- Muniswaran, P. K. A. and Charyulu, N. C. L. N. Solid-substrate fermentation of coconut coir pith for cellulase production. *Enzyme Microb. Technol.* 1994, 16, 436-440
- Shankaranand, V. S., Ramesh, M. V., and Lonsane, B. K. Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. *Process Biochem.* 1992, 27, 33-36
- Saucedo-Castañeda, G., Trejo-Hernández, M. R., Lonsane, B. K., Navarro, J. M., Roussos, S., Dufour, D., and Raimbault, M. On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Proc. Biochem.* 1994, 29, 13-24
- Gowthaman, M. K., Raghava Rao, K. S. M. S., Ghildyal, N. P., and Karanth, N. G. Estimation of *Kla* in a solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. *Proc. Biochem.* 1995, 30, 9-15
- Pandey, A. Recent process developments in solid-state fermentation. *Proc. Biochem.* 1992, 27, 109-117



	A1	12 PATENTE DE INVENCIÓN
		21 NÚMERO DE SOLICITUD
		9600317
		22 FECHA DE PRESENTACIÓN

71 SOLICITANTE(S) UNIVERSIDAD DE A CORUÑA Y, EN SU NOMBRE Y A SU REPRESENTACION, EL RECTOR NACIONALIDAD ESPAÑOLA

DOMICILIO OFICINA DE TRANSFERENCIA DE RESULTADOS DE INVESTIGACION (O.T.R.I.) E.T.S. CAMINOS, CANALES Y PUERTOS / CAMPUS DE ELVIÑA - 15071 A CORUÑA

72 INVENTOR(ES) MARIA ISABEL GONZALEZ SISO Y MANUEL BECERRA FERNANDEZ

73 TITULAR(ES) UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

11 N.º DE PUBLICACION	49 FECHA DE PUBLICACION	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA	GRAFICO ISOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN
-----------------------	-------------------------	--------------------------------------	--

81 Int. Cl. <sup>6</sup> C12N 9/133, 1/22 // (C12N 9/133, C12R 1: 645)

84 TITULO  
PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE LA ENZIMA B-GALACTOSIDASA.

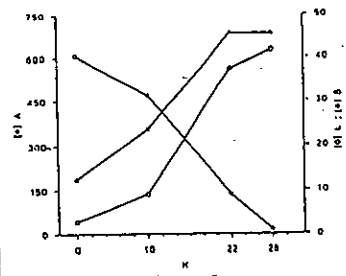
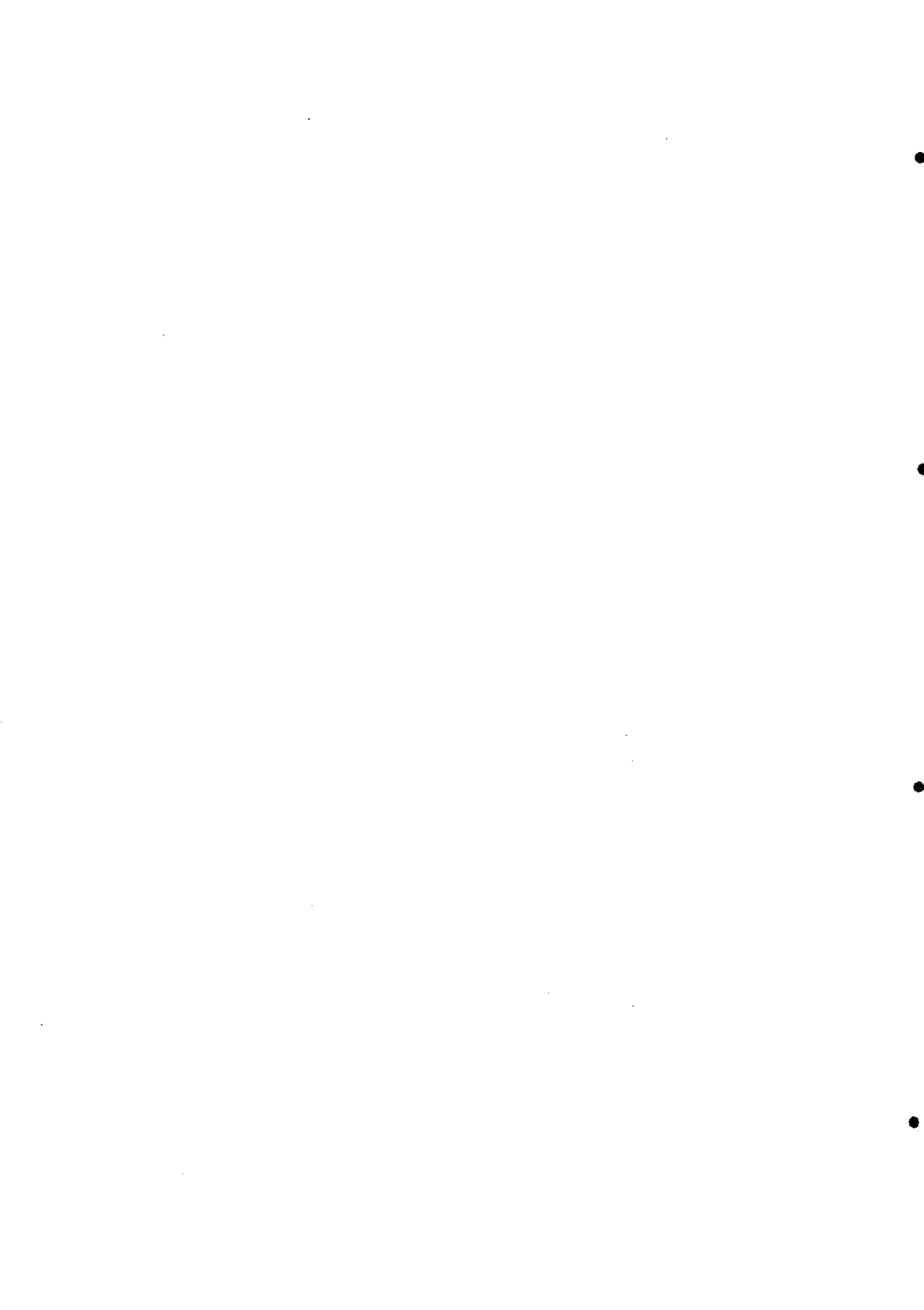


FIGURA 1

87 RESUMEN (APORTACION VOLUNTARIA SIN VALOR JURIDICO)

## PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE LA ENZIMA B-GALACTOSIDASA

Se propone un procedimiento para la producción de la enzima lactasa o β-galactosidasa por levaduras del género *Kluyveromyces* cultivadas en estado sólido sobre gránulos de corazón de la mazorca de maíz, u otros de similares características, humedecidos con suero de leche concentrado que permite reducir los elevados costos de producción de la β-galactosidasa debido a las ventajas económicas de los cultivos en estado sólido con respecto a los cultivos líquidos hasta ahora empleados. La lactasa así obtenida presenta aplicaciones en las industrias farmacéutica y de alimentación.



Rapid report

## Heterologous *Kluyveromyces lactis* $\beta$ -galactosidase production and release by *Saccharomyces cerevisiae* osmotic-remedial thermosensitive autolytic mutants

M. Becerra, E. Cerdán, M.I. González Siso \*

Departamento de Biología Celular e Molecular, Facultad de Ciencias, Campus da Zapateira s/n, 15071-A Coruña, Spain

Received 3 March 1997; revised 27 March 1997; accepted 27 March 1997

### Abstract

The  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* is a high molecular weight protein with commercial interest. A major drawback of its industrial production is the high cost associated with extraction and downstream processing due to its intracellular nature. In this work, the effectiveness of the utilization of *Saccharomyces cerevisiae* LD1 and LHDP1 strains, osmotic-remedial mutants which lyse at 37°C, for the heterologous production and release into the extracellular medium of this protein has been proved. The highest absolute values of released  $\beta$ -galactosidase have been obtained with the protease-deficient strain LHDP1 by osmotic shock.

**Keywords:**  $\beta$ -Galactosidase; Yeast autolytic mutant

$\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside-galactohydrolyase, EC 3.2.1.23), the enzyme which is responsible for lactose hydrolysis into glucose and galactose, has important applications in the fields of medicine (lactose intolerance), food (to prevent lactose crystallization and increase sweetening power in dairy food) and the environmental (cheese whey utilization) (for reviews see [1,2]).

$\beta$ -Galactosidases are widely distributed in nature and microorganisms are the best sources for industrial production. Microbial  $\beta$ -galactosidases are obtained from bacteria, fungi and yeasts, and exhibit different properties depending on their source. Bacterial and yeast enzymes are intracellular and the

most outstanding in terms of technological interest come from the yeasts *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces fragilis*. Research on *Kluyveromyces*  $\beta$ -galactosidase has focused mainly on purification and characterization [3,4], production [5,6], immobilization [7,8], use in milk and whey lactose hydrolysis [9,10]. The use of permeabilized whole cells as catalysts has been proposed as an alternative [11,12] since much of the added cost to commercial yeast  $\beta$ -galactosidase preparations stems from the low stability and intracellular nature of the enzyme which greatly hampers the extraction and purification processes. The most generalized industrial extraction procedures are at present based on mechanical cellular breakage, chemical or enzymatic treatment and require harsh conditions which usually affect protein stability or add impurities to the preparations [13].

An alternative system for release of the intra-

\* Corresponding author. Fax: +34 81 167065; E-mail: bmanamrt@udc.es

cellular protein consists of secretion. Genetic modification, fusing a signal sequence 5' to the gene, has proved to be useful in achieving the secretion of small peptides, but it is specially problematic when high molecular weight proteins such as  $\beta$ -galactosidase are involved. In fact, heterologous secretion of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae*, adding the secretion signals from  $\alpha$ -factor and glucoamylase (*STA2*) genes to *lacZ* gene, has been assayed by several authors [14–16]. In all cases, protein was correctly processed but remained periplasmic as if high molecular weight prevented  $\beta$ -galactosidase (a tetramer of 116 kDa/subunit [17]) from passing through the cell wall. Our previous unpublished research aimed at promoting *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase secretion by fusing a signal sequence to the *LAC4* gene, was also unsuccessful, as the molecular weight of the bacterial and yeast enzyme are in the same range.

A new system to release intracellular proteins of recent publication is based on the utilization of osmotic-remedial yeast strains which lyse at non-permissive temperatures due to the expression of mutations involving the formation of an altered cellular wall. This is an interesting alternative to intracellular protein production and facilitates downstream processing [18,19]. These strains have proved to be useful in the release, following a raise in temperature, both of homologous (alkaline phosphatase) and heterologous (chloramphenicol acetyl transferase) proteins, including molecules as large as virus-like particles, 60 nm in size, by osmotic shock [20]. In this paper, we describe the use of these *S. cerevisiae* mutants [19], kindly provided by Dr. César Nombela, for heterologous *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase production. LD1 (MATa/MAT $\alpha$ , *lyt2-1/lyt2-1*, *leu2-3.112/leu2-3.112*, *his4 $\Delta$ 34/his4 $\Delta$ 34*) is a diploid strain homozygotic for the mutant allele *lyt2-1* that determines autolysis when cells grow at the non-permissive temperature 37°C [21,22] and LHDP1 (MATa, *lyt2-1*, *ade2*, *leu2-3.112*, *pep4::HIS3*, *prb1 $\Delta$ 1.6R*) is a haploid strain with reduced protease activity due to *pep4* and *prb1* mutations [23–25] which also presents the mutant allele *lyt2-1*.

LD1 and LHDP1 strains were transformed by the lithium acetate procedure of Ito et al. [26] with plasmid YEplac118-LAC4 created by cloning a DNA cassette previously constructed in our laboratory in

the polylinker of Yeplac118 [27]. The cassette carries the *LAC4* gene, which codes for *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase, inserted between the promoter and the terminator of phosphoglycerate-kinase (PGK) from *S. cerevisiae*.

*E. coli* DH5 $\alpha$  strain (*supE44*,  $\Delta$ *lacUI69*, ( $\phi$ 80 *lacZ $\Delta$ M15*), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) was used for plasmid construction and propagation by the usual DNA recombinant techniques according to Sambrook et al. [28].

The cultures to be used as inocula of both transformed strains, LD1/YEplac118-LAC4 and LHDP1/YEplac118-LAC4, were grown in 250 ml Erlenmeyer flasks with 50 ml CM-leu, a complete medium without leucine as described by Lowry et al. [29], in an orbital shaker at 25°C and 250 rpm up to reach the exponential phase. A suitable volume of this preculture was used to inoculate (1% v/v) the cultures in YPD (10 g/l yeast extract, 5 g/l peptone and 20 g/l glucose). This non-selective medium allowed for faster growth and therefore a higher  $\beta$ -galactosidase production and a stronger expression of the lytic phenotype.

Plasmid stability during growth in YPD for the two transformed strains was determined by taking samples at different culture times and spreading 100  $\mu$ l of a suitable dilution on YPD-plates. After growing at 30°C, they were replica-plated on CM-Leu plus X-gal and the ratio of viable Leu<sup>+</sup> and  $\beta$ -galactosidase expressing cells (containing the plasmid) was estimated. At the end of the cultures, a stability of about 70% for the LHDP1/YEplac181-LAC4 strain and about 80% for the LD1/YEplac181-LAC4 strain was obtained.

The thermosensitive lytic phenotype determined by *lyt2-1* is compensated by osmotic stabilization with sorbitol [20]. In order to evaluate the  $\beta$ -galactosidase release caused by osmotic shock, LHDP1/YEplac181-LAC4 and LD1/YEplac181-LAC4 were incubated at 37°C and 250 rpm in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml YPD 1 M sorbitol. When an  $A_{600\text{ nm}}$  value of 2.6–2.9 was reached, cells were precipitated by centrifugation and resuspended in an equal volume of 10 mM, pH 7.5, Tris-HCl. Intra and extracellular  $\beta$ -galactosidase activity was measured before and after the osmotic shock by the Guarente method [30].

Only trace levels of  $\beta$ -galactosidase activity in the

culture medium were detected before the osmotic shock. Intracellular levels were 3.5-fold higher in LHDP1/YEplac118-LAC4 than in the LD1/YEplac118-LAC4 strain. This may be attributed to a reduction in  $\beta$ -galactosidase degradation due to *pep4* and *prb1* mutations rather than to an increase in  $\beta$ -galactosidase synthesis (plasmid stability is slightly higher in the LD1 strain). After the osmotic shock in the hypotonic medium, a 63% and 83% release of  $\beta$ -galactosidase activity was measured in LHDP1/YEplac118-LAC4 and LD1/YEplac118-LAC4 strains, respectively (Fig. 1). Enzymatic activity determinations were consistent with the protein concentration measurements performed by the Bradford method [31].

These results suggest that osmotic shock of LHDP1 and LD1 *S. cerevisiae* strains can be used for the release of heterologous intracellular high molecular weight proteins with good yields. Although the protease-deficient strain, LHDP1, showed a 20% lower proportion of released protein, it proved to be more efficient than LD1 because it maintained 3.5-fold higher intracellular levels of the heterologous protein

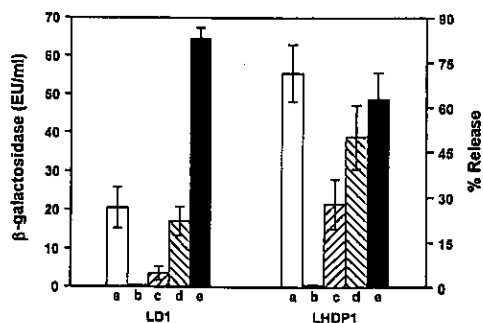


Fig. 1. Release of intracellular  $\beta$ -galactosidase by the *S. cerevisiae* strains LD1/YEplac 181-LAC4 and LHDP1/YEplac181-LAC4 after osmotic shock.  $\beta$ -Galactosidase activity was determined: (a) in cells growing at 37°C in the presence of 1 M sorbitol, (b) in the somotically-protected culture medium, (c) in cells after osmotic shock, (d) in supernatant after osmotic shock. (e) percent of released  $\beta$ -galactosidase. EU (enzyme activity unit) is defined as the quantity of enzyme releasing one  $\mu$ mol of orthonitrophenol from orthonitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside per min under the assay conditions. Values represent the average of seven (LD1) and ten (LHDP1) different cultures. Comparisons are based on Unpaired Student's *t* test at 95% significance level.

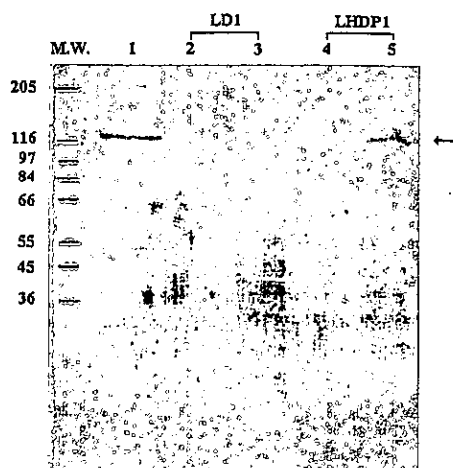


Fig. 2. Western blot analysis of  $\beta$ -galactosidase produced by the *S. cerevisiae* strains LD1/YEplac181-LAC4 and LHDP1/YEplac181-LAC4 and released by osmotic shock. Culture medium before (lanes 2,4) and after (lanes 3,5) the osmotic shock. Control of  $\beta$ -galactosidase purified from *K. lactis* crude extracts by affinity chromatography on agarose-*p*-aminophenyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (lane 1). Molecular weight markers (kDa) were from Sigma. 20  $\mu$ g total protein were loaded in lane 1 for electrophoresis, 45  $\mu$ g in lanes 3, 5 and 85  $\mu$ g in lanes 2, 4.

and thus, absolute values of extracellular (released) protein after the osmotic shock were also about 3-fold higher.

For the positive identification of the  $\beta$ -galactosidase activity found in *S. cerevisiae* lytic supernatants as the product of the *LAC4* gene, a western blotting analysis was performed (Fig. 2).

To obtain antiserum for *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase (available commercial  $\beta$ -galactosidase antibodies were prepared for the *E. coli* protein and did not cross react with the *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase); BALB/c mice were intraperitoneally immunized with 0.2 ml of a 1:1 (v/v) mixture of Freund's complete adjuvant (FCA) and PBS containing 50  $\mu$ g of *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase (Maxilact LX 5000, Gist Brocades, France/The Netherlands). The same dose in 125  $\mu$ l (but without FCA) was injected via the retrobulbar venous plexus 21 days post-primary immunization. Mice were bled 14 days post-secondary immunization and the sera was separated by centrifugation

at  $2000 \times g$  for 10 min, mixed 1:1 (v/v) with glycerol and stored at  $-30^\circ\text{C}$  until use. To avoid secondary reactions, antisera were adsorbed 24 h at  $4^\circ\text{C}$  1:1 (v/v) with a proteic extract obtained by sonical disruption of YPD-cultured *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase-deficient cells (MW-190-9B strain, from Dr. Wésolowski-Louvel's collection) as follows.

For the preparation of crude protein extracts, the cells were harvested by centrifugation at 7000 rpm for 5 min at  $4^\circ\text{C}$  and washed once with distilled water. They were suspended in 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 10% glycerol buffer with 0.1 mM PMSF, 4 mM Pepstatin, 4 mM leupeptin and 2  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol and broken using a sonicator at 16  $\mu\text{m}$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$  making with 5 min intervals after each 5 min exposure. Cell debris was removed by centrifugation at 40000 rpm for 90 min at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant constituted the cell-free extract.

Denaturing acrylamide gels (10% polyacrylamide gels) containing sodium dodecyl sulfate (SDS) were run according to the procedure described by Laemmli [32], using a Bio-Rad Mini Protean II apparatus. Gels were fixed in 12% trichloroacetic acid and protein was stained with a modified Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method.

Following electrophoresis, gels were electrotransferred onto a nitrocellulose membrane at a constant voltage of 15 V for one h and immunostained. The membrane was washed with TBS (50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4) stained with Ponceau S to verify transfer, then dried and blocked overnight at  $4^\circ\text{C}$  with TBS containing 0.2% Tween-20 and 5% non-fat dry milk, and finally incubated 2 h with a 1:500 dilution of mouse immune serum. The membrane was washed with TBS containing 0.2% Tween-20 and incubated with a 1:1600 dilution of peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse Ig (Dakopats, Denmark). The immunoreactant bands were stained by adding TBS containing 0.003%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.06% diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.03%  $\text{NiCl}_2$ . The reaction was stopped by thorough washing with TBS.

A band, with the same electrophoretical mobility in SDS-PAGE as the  $\beta$ -galactosidase purified one, was detected in cell extracts obtained by the sonical disruption of the LD1/YEplac118-LAC4 or LHDPI/YEplac118-LAC4 strains. No band could be detected in the osmotically stabilized extracellular

medium of the same strains growing at  $37^\circ\text{C}$  in the presence of sorbitol. However, when the cells of both strains grown in the stabilized medium were transferred to a hypotonic medium, the release of the heterologous *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase was confirmed by the appearance of the band in the Western blotting analysis (Fig. 2).

$\beta$ -Galactosidase release after the expression of lytic phenotype induced by a temperature increase in the cultures from 25 to  $37^\circ\text{C}$  was also assayed in both transformed strains. For these experiments LD1/YEplac118-LAC4 and LHDPI/YEplac118-LAC4 were grown in an orbital shaker at  $25^\circ\text{C}$  and 250 rpm in 1 l Erlenmeyer flasks with 300 ml YPD. Inocula (1% v/v) came from exponential phase CM-leu precultures. Intra and extracellular  $\beta$ -galactosidase activity in the cultures was measured by the method of Guarente [30].

As represented in Fig. 3, both transformed strains grew stably at  $25^\circ\text{C}$  and  $\beta$ -galactosidase activity in the culture medium was detected only at trace levels and the same held true for cultures at  $37^\circ\text{C}$  osmotically protected with 1 M sorbitol. Intracellular accumulation of  $\beta$ -galactosidase was growth-associated, as expected from a protein expressed under a constitutive promoter, and enzyme activity levels were again higher in the LHDPI/YEplac118-LAC4 than in the LD1/YEplac118-LAC4 strain.

When the  $A_{600\text{ nm}}$  of the cultures reached a value of about 2 (LHDPI) or 4 (LD1), the temperature was raised to  $37^\circ\text{C}$  to get expression of the mutant phenotype. As described by Fuente et al. [18], in spite of the fact that cellular viability drops to 20% of their initial values in 8 h after the temperature switch, the  $A_{600\text{ nm}}$  values continued increasing. It is likely that a number of cells were still growing, and lysing, due to a different response attributable to the heterogeneous physiological state of the cells at the moment of the temperature switch. Thus, this non-synchronous expression of the mutant phenotype led to only a partially lysed cell population.

Up to 6 h after the temperature switch, the levels of extracellular enzymatic activity increased slightly (about four-fold vs. the control culture at  $25^\circ\text{C}$ ) but the increase represented less than 10% of intracellular values. A later decrease of activity to the initial level was observed. This could be attributed, at least in part, to the release of vacuolar proteases and the

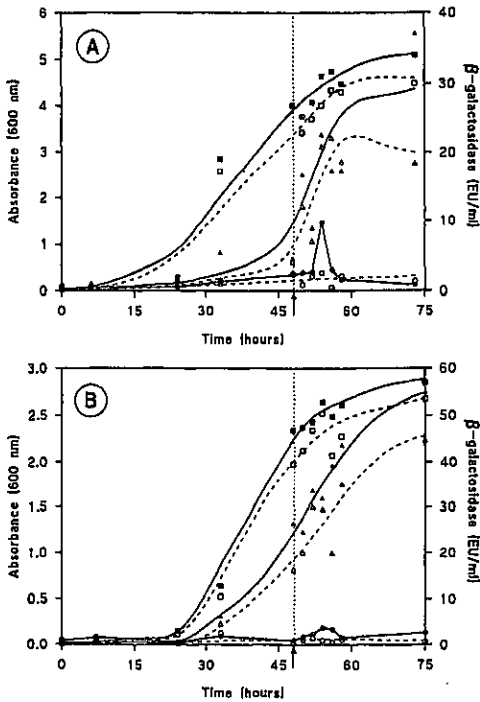


Fig. 3. Intracellular  $\beta$ -galactosidase production and release after temperature increased from 25°C to 37°C (solid symbols and solid line) by the *S. cerevisiae* strains LD1/YEplac181-LAC4 (A) and LHDPI/YEplac181-LAC4 (B). Time of temperature switch is indicated by an arrow and a vertical dotted line. A control culture was maintained at 25°C (open symbols and broken line). Squares: growth measured as absorbance at 600 nm. Triangles: Intracellular  $\beta$ -galactosidase activity. Circles:  $\beta$ -galactosidase activity in the culture medium.

concomitant non-specific proteolytic degradation [18,19]; this effect was more pronounced in the case of LD1/YEplac118-LAC4.

Low values of released  $\beta$ -galactosidase after temperature-induced lysis may also be attributed to enzyme deactivation due to the temperature and pH of the medium. The half life of purified *K.lactis*  $\beta$ -galactosidase at 40°C has been estimated as ranging from 1.6 min in deionized water to 146 min in  $K^+$ -phosphate-buffer, pH 7.3 [4]. It has also been

pointed out that pH values under 6.5 or above 7.5 cause a sharp decrease in *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase activity [10]. Thus, several h at 37°C and an unsuitable pH may possibly destroy a considerable part of the enzymatic activity. To verify if the pH of the cultures had any influence on the lack of  $\beta$ -galactosidase activity in the culture medium after the temperature was raised to 37°C, we performed a new YPD-culture of the protease-deficient LHDPI/YEplac181-LAC4 strain, in a Biostat-MD fermentor (Braun-Biotech, Germany) with a working volume of 2 l, 25°C, 250 rpm stirring speed and aeration rate of 2 l/min. pH was maintained at 7.0 this time. As the inoculum, 50 ml of an exponential phase preculture in CM-leu was used. When the  $A_{600\text{ nm}}$  of the YPD-culture was 4.5, the temperature was switched to 37°C. The values of  $\beta$ -galactosidase activity in the culture medium after temperature switch again, did not surpass 10% of the intracellular ones. However at pH 7.0 the decrease in  $\beta$ -galactosidase activity after the peak in the medium at 37°C was somewhat minimized (Fig. 4).

Therefore, we conclude that the utilization of LD1 and LHDPI strains of *S. cerevisiae* for *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase release after lytic phenotype expression by raising the temperature has scarcely any effect without an osmotic shock. This is feasible

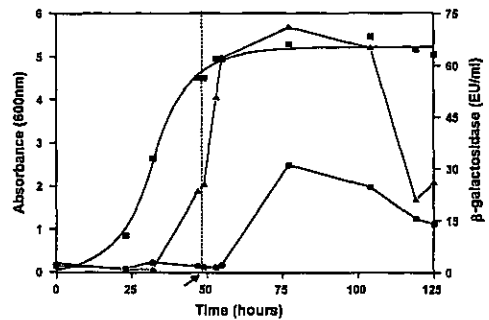


Fig. 4. Intracellular  $\beta$ -galactosidase production and released after temperature increase from 25°C to 37°C (indicated by an arrow and a vertical dotted line) by the *S. cerevisiae* strain LHDPI/YEplac181-LAC4 in a fermentor culture in which pH was maintained at 7.0. Symbols as in Fig. 3.



because the cell population lyses only partially in an asynchronous fashion after the temperature switch. The released proteins are maintained at 37°C several hours in the culture medium and the resulting degradation of the protein depends on its relative stability. Thus, the induction of expression of the lytic phenotype only by temperature, although successfully applied to the release of heterologous proteins up to 25 kDa [19], cannot be generalized to relatively unstable proteins with a higher molecular weight as has been demonstrated in this paper. However, the release by osmotic shock constitutes an easy and efficient way to obtain high yields of *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase in the extracellular medium without any mechanical breakage or enzymatic treatment of the cells. When yeasts are cultured at 37°C, even if they are osmotically protected by sorbitol, the expression of the mutant phenotype causes the formation of an altered cell wall. Therefore, when osmotic protection is eliminated, almost the entire cell population lyses simultaneously releasing the intracellular content. This facilitates the recovery of the protein which may be maintained at low temperatures, a suitable pH and protected from degradation. Moreover, the use of LHDP1 strain makes it possible to obtain higher absolute levels of the protein and also minimizes further proteolytic reactions. The utilization of this system seems particularly interesting for proteins such as *Kluyveromyces*  $\beta$ -galactosidase since there are important added costs to commercial preparations incurred by extraction processes and low stability.

The food results obtained in the heterologous production and release of  $\beta$ -galactosidase by the LD1 and LHDP1 mutants suggests that the usefulness of these strains may be generalized to high molecular weight and unstable enzymatic proteins. Therefore, autolytic yeast strains constitute very promising tools for the industrial production of any kind of intracellular protein, thus facilitating its downstream processing.

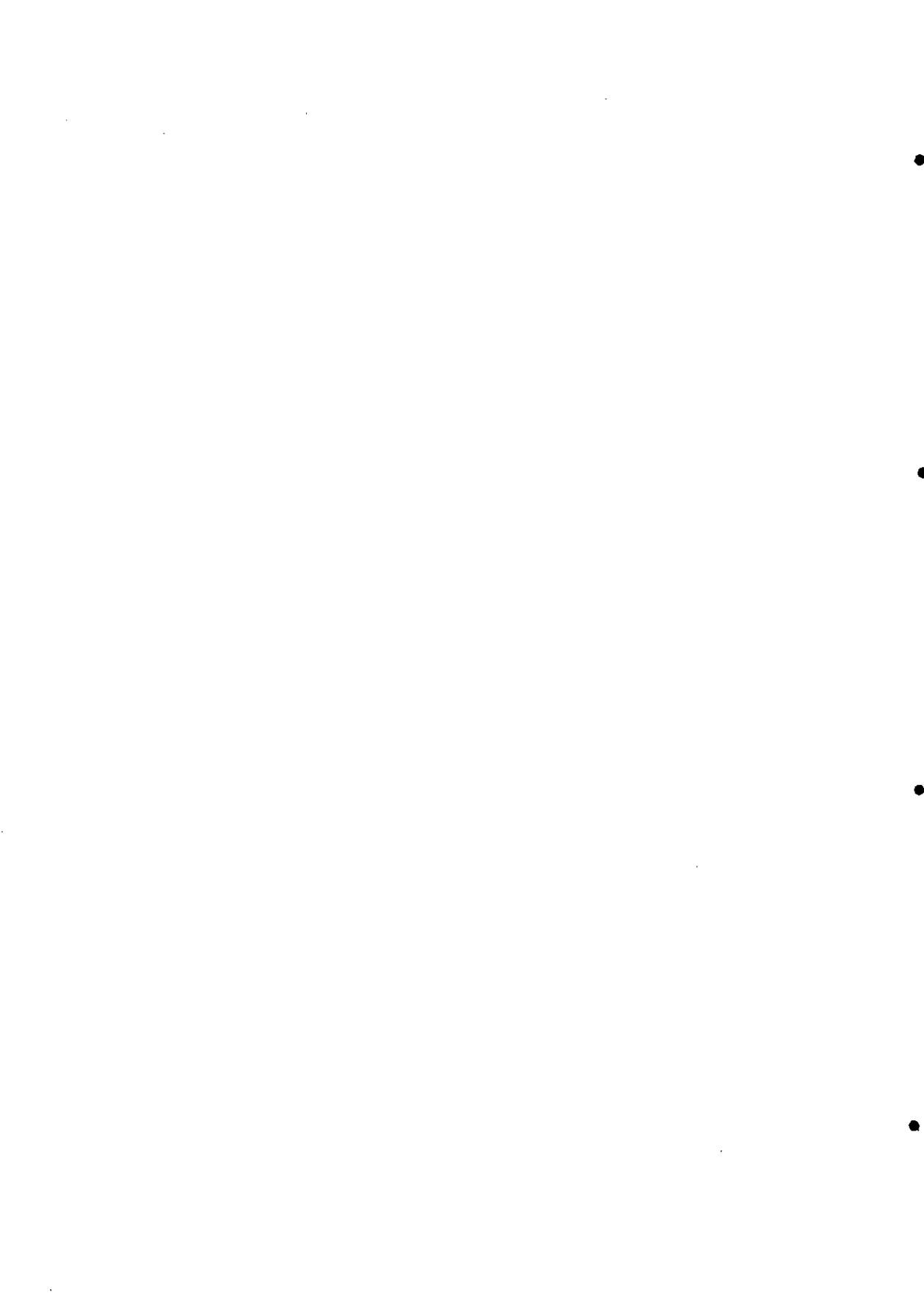
The authors would like to thank Dr César Nombela for providing the LD1 and LHDP1 strains, Dr M. Wésolowski-Louvel for the MW-190-9B strains and Dr J. Leiro for his help with immunological techniques. Maxilact LX5000 was a generous gift from Gist-Brocades. M. Becerra is the recipient of a predoctoral fellowship from the Xunta de Galicia (Spain). This research was funded by grants BIO94-0961

from the CICYT (Spain) and XUGA-10305A93 from the Xunta de Galicia (Spain).

## References

- [1] H.H. Nijpels, *Enzymes and Food Processing*, in: G.G. Birch, N. Blakebourg and J. Parker (Ed.), Applied Science, London, 1981, pp. 89–104.
- [2] M.I. González Siso, *Biores. Technol.* 57 (1996) 1–11.
- [3] R.C. Dickson, L.R. Dickson, J.S. Markin, *J. Bacteriol.* 137 (1979) 51–61.
- [4] D. Cavaille, D. Combes, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 22 (1995) 55–64.
- [5] M.I. González Siso, *Proc. Biochem.* 29 (1994) 565–568.
- [6] M. Becerra, M.I. González Siso, *Enz. Microb. Technol.* 19 (1996) 33–44.
- [7] González Siso, M.I., Freire Picos, A., Ramil, E., Rodríguez Belmonte, E. Rodríguez Torres, A. and Cerdán, E. (1994) *Proc. Biochem.*, 29, 7–12.
- [8] G. Irazoki, F. Batista-Vieira, *Biotechnol. Techniques* 8 (1994) 233–238.
- [9] L. Hussein, S. Elsayed, S. Foda, *J. Food Protect.* 52 (1988) 30–34.
- [10] M.I. González Siso, S. Suárez Doval, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 303–310.
- [11] M.S. Joshi, L.R. Gowda, S.G. Bhat, *Enzyme Microb. Technol.* 11 (1989) 439–443.
- [12] M.I. González Siso, E. Cerdán, M.A. Freire Picos, E. Rodríguez Belmonte, A.M. Rodríguez Torres, *Biotechnol. Techniques* 6 (1992) 289–292.
- [13] M. García-Garibay, *Ciencia* 43 (1992) 23–33.
- [14] R.C. Das, J.L. Schultz, D.J. Lehman, *Mol. Gen. Genet.* 218 (1989) 240–248.
- [15] M. Vanoni, D. Porro, E. Martegani, L. Alberghina, *Biochem. Biophys. Res. Co.* 164 (1989) 1331–1338.
- [16] D. Porro, E. Martegani, B.M. Ranzi, L. Alberghina, *Biotechnol. Lett.* 14 (1992) 1085–1088.
- [17] R.H. Jacobson, X.J. Zhang, R.F. DuBose, B.W. Matthews, *Nature* 369 (1994) 761–766.
- [18] J.M. de la Fuente, A. Vázquez, M. González, M. Sánchez, M. Molina, C. Nobela, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1993, 763–769.
- [19] P. Álvarez, M. Sampedro, M. Molina, C. Nombela, *J. Biotechnol.* 38 (1994) 81–88.
- [20] P. Álvarez, M. Sánchez, M. Molina, C. Nombela, *Biotechnol. Techniques* 9 (1995) 441–444.
- [21] L. Torres, H. Martín, M.I. García-Saenz, J. Arroyo, M. Molina, M. Sánchez, C. Nombela, *Mol. Microbiol.* 5 (1991) 2845–2854.
- [22] J.M. de la Fuente, A. Álvarez, C. Nombela, M. Sánchez, *Yeast* 8 (1992) 39–45.
- [23] H.H. Hirsch, P. Suárez-Rendueles, D.H. Wolf, *Molecular and Cell Biology of Yeast*, in: E.F. Walton, G.T. Yarranton, (Ed.), Blackie and Son Ltd., London, 1989, pp. 134–200.

- [24] E.W. Jones, G.S. Zubenco, R.R. Parker, *Genetics* 102 (1982) 665–675.
- [25] J.R. Pringle, *Methods. Cell Biol.* 12 (1975) 149–184.
- [26] H. Ito, K. Murata, A. Kimura, *J. Bacteriol.* 153 (1983) 163–168.
- [27] R.D. Gietz, A. Sugino, *Gene* 74 (1988) 527–534.
- [28] J. Sambrook, T. Maniatis, E.F. Fritsch, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [29] C.V. Lowry, J.L. Weiss, A. Walthall, R.S. Zitomer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 151–155.
- [30] L. Guarente, *Methods Enzymol.* 101 (1983) 181–191.
- [31] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [32] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–683.



# Micro-scale purification of $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric forms are active

Manuel Becerra, Esperanza Cerdán and M<sup>a</sup> Isabel González Siso

Departamento de Biología Celular e Molecular. Facultad de Ciencias. Campus da Zapateira s/n. 15071-A Coruña, Spain.

$\beta$ -Galactosidase was purified from *Kluyveromyces lactis*. Polyclonal antibodies raised against it cross-reacted against the  $\beta$ -galactosidase of *Kluyveromyces fragilis* but not against  $\beta$ -galactosidases of bacterial, fungal or animal origin. The enzyme is composed of 124 kDa monomers and is active in both dimeric and tetrameric form.

## Introduction

The lactase or  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23) from the yeast *Kluyveromyces lactis* is an enzyme with outstanding biotechnological interest which has attracted the attention particularly of researchers and the dairy industry because of its important applications in the medical (lactose intolerance), food-technology (sweetening power and crystallization of lactose) and environmental (cheese whey use) fields.

Although a great deal of research has dealt with the production and use of this enzyme (García-Garibay, 1992), some characteristics have not been accurately described, such as its structure and the number of subunits. Several apparent discrepancies on this data may be found in the literature. Thus, for example, whereas Dickson *et al* (1979), who purified *K.lactis*  $\beta$ -galactosidase from crude protein extracts of the yeast by several successive techniques of precipitation and chromatography, reported that the enzyme was composed of two identical subunits of 135 kDa, Mbuyi-Kalala *et al* (1988) described, using techniques of reiterated ultrafiltration, the existence of four isozymes with apparent molecular masses of 630, 550, 41 and 19 kDa in a commercial preparation of *K.lactis* lactase (Maxilact 40,000). In both cases important quantities of raw material were used for the purification.

At present, micromethods have been developed which allow proteins to be purified from smaller quantities of crude extract in a highly reproducible and accurate way. Taking advantage of such methods and trying to clarify the above situation concerning the active form of *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase, we performed a scaled-down purification and estimation of the molecular mass in native and denaturing

conditions of *K.lactis*  $\beta$ -galactosidase both from a crude extract and from a commercial preparation. We have evaluated two purification procedures: one-step affinity chromatography and gel filtration-ionic exchange FPLC (fast protein liquid chromatography). We have also prepared polyclonal antibodies and studied the degree of cross-reactivity with other  $\beta$ -galactosidases of eukaryotic and prokaryotic origin.

## Materials and methods

### Preparation of crude extract

Crude protein extract was prepared as described previously (Becerra *et al.*, 1997) from cells cultured in 1 litre of YPL (10 g yeast extract/l, 5 g peptone/l and 40 g lactose/l) up to an  $A_{600\text{ nm}}$  of 2 (about 3 mg dry wt/ml).

### Purification of $\beta$ -Galactosidase

The purification of  $\beta$ -galactosidase from a crude protein extract of the strain of *K. lactis* NRRL-Y1140 and from a commercial *K. lactis* lactase preparation, Maxilact LX-5000 (Gist Brocades), was performed using several chromatographical techniques. All purification steps were carried out at 4°C. The activity was assayed in the fractions obtained from chromatography. Active fractions were pooled and, when required, concentrated by filtration in Amicon Microcon-100 YM membranes.

### Gel filtration chromatography

The FPLC Smart system from Pharmacia was used. The column Superose 12 PC 3.2/30 was equilibrated and further eluted with 50 mM Sodium Phosphate, pH 7.0, 0.15 M NaCl. Absorbance (280 nm) was measured on-line. The elution rate was 40  $\mu$ l/min and the eluate was collected in 0.1 ml fractions. The column was calibrated

using the following molecular weight standards: Jack Bean urease 545,000 (hexamer) and 272,000 (trimer) and bovine serum albumin 132,000 (dimer) and 66,000 (monomer).

#### Ion-Exchange chromatography

The FPLC Smart system from Pharmacia was used. The column Mono Q PC 1.6/5 was equilibrated with 20 mM triethanolamine, pH 7.5. Proteins were eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 1.0 M in 20 minutes at a flow rate of 100  $\mu$ l/min, and the eluate was collected in 0.1 ml fractions.

#### Affinity chromatography

The column with 5 ml agarose-*p*-aminophenyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (Sigma) was equilibrated with 50 mM phosphate buffer pH 7, and the enzyme was eluted with 0.1 M borate buffer, pH 10. Fractions of 1 ml were collected at a flow rate of 100 ml/min. The pH of the collected fractions was neutralized to avoid denaturation.

#### $\beta$ -Galactosidase activity

The method of Guarente (1983) was used. One enzyme unit (EU) is defined as the quantity of enzyme that catalyzes the liberation of 1  $\mu$ mol ortho-nitrophenol from ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) per minute under assay conditions.

#### Protein concentration

According to the procedure of Bradford (1976).

#### Polyacrylamide gel electrophoresis

Denaturing polyacrylamide electrophoresis were run as previously (Becerra *et al.*, 1997). Electrophoresis in native conditions was performed without SDS, using gradient gel (5–15%) at 4°C. The active bands in the native gels were stained following the techniques described in Dickson *et al.* (1979) and Erickson and Steers (1970), using ONPG or BNG (6-bromo-2-naphthyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) respectively as a substrate. Molecular weight was determined using marker kits from Sigma.

#### Immunological studies

To obtain antiserum for *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase BALB/c mice and a Californian rabbit were used. In the first case, BALB/c mice were immunized as described in Becerra *et al.* (1997). In the second case, a primary dose of 50  $\mu$ g of the *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase 124 kDa band cut from denaturing PAGE polyacrylamide gels and emulsified in Freund's complete adjuvant was administered subcutaneously at multiple sites in a healthy Californian rabbit of 2–3 kg body weight. The rabbit was given a booster injection after 8–10 weeks (50  $\mu$ g of the same band but electroeluted from the gel). Two weeks after the second booster dose, the

animal was bled and antiserum was collected. Serum was separated by centrifugation at 5,000 g for 5 minutes, mixed 1:1 with glycerol and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

To obtain antiserum against *K. fragilis*  $\beta$ -galactosidase, a Californian rabbit of similar characteristics and the same method described above was used but, in this case, the primary dose and the booster injection consisted of 100  $\mu$ g *K. fragilis*  $\beta$ -galactosidase (Sigma).

#### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Indirect ELISA was carried out as described in Iglesias *et al.* (1993).

#### Immunoblotting

As described in Becerra *et al.* (1997) using a 1:250 (v/v) dilution of rabbit immune serum.

## Results and discussion

#### Purification of *K. lactis* $\beta$ -galactosidase

$\beta$ -Galactosidase purification was achieved by two procedures: gel filtration-ionic exchange FPLC and affinity chromatography on agarose-*p*-aminophenyl- $\beta$ -D-thiogalactoside.

The purification of the enzyme from a crude protein extract of the strain of *K. lactis* NRRL-Y1140 by FPLC resulted in a purification factor of 11-fold over the crude extract having an overall yield based on total enzyme units of 0.3%. The results of the enzyme purification process are summarized in Table 1A. The enzyme was also purified from the commercial liquid *K. lactis* lactase preparation Maxilact LX-5000 (Table 1B). In this case, the first step of gel filtration chromatography was avoided and specific activity increased only up to 1.7-fold as expected since Maxilact LX-5000 is a highly purified lactase preparation. The final specific activity obtained in this paper is the highest one reported to date (Surve and Mahoney, 1994).

$\beta$ -Galactosidase was also purified from crude *K. lactis* protein extracts and from Maxilact LX-5000, in only one step by affinity chromatography (Figure 1). In the first case, 12 mg of total protein were charged on the column. A single 1ml-fraction showed  $\beta$ -galactosidase activity. A 2.2% protein recovery with a yield of 5.3% and an increase in specific activity of 2.5-fold was obtained. In the second case, 40 mg of total protein were charged on the column. Protein recovery was 2.5%, yield 53%, and specific activity increased 2.1-fold.

The specific activity of the enzyme from both sources could not be significantly increased without a great protein loss by further purification, suggesting that these purified

Table 1 Summary of  $\beta$ -Galactosidase purification. A: *K. lactis* NRRL-Y1140. B: commercial lactase Maxilact LX-5000 (Gist-Brocades).

A

Step	Total Protein (mg)	Total kE.U.	Yield %	Specific activity (kEU/mg)	Purification fold
Crude extract	7.2	15.24	100	2.12	1
Gel filtration	2.4	7.43	49	3.87	1.8
Ion-exchanged	0.1	0.61	4	6.05	2.9
Ultrafiltration	0.06	0.09	0.6	10.09	4.8
Gel filtration	0.01	0.05	0.3	23.22	11

B

Step	Total Protein (mg)	Total kE.U.	Yield %	Specific activity (kEU/mg)	Purification fold
Maxilact	14.4	541.12	100	37.58	1
Ion-exchanged	3	179.20	33.1	59.73	1.6
Ultrafiltration	3	179.97	33.3	59.99	1.6
Gel filtration	0.44	28.10	5.2	63.87	1.7

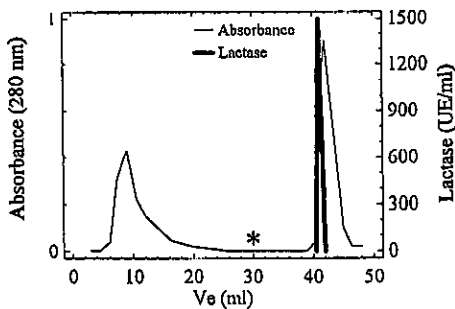


Figure 1 Purification of  $\beta$ -galactosidase by affinity chromatography on agarose-*p*-aminophenyl- $\beta$ -D-thiogalactoside from a crude extract of *K.lactis*. The asterisk indicates the change from phosphate buffer pH 7 to borate buffer pH 10.

preparations were homogeneous. The homogeneity of the isolated  $\beta$ -galactosidases was examined by SDS-PAGE and Western-blotting analysis of the purified enzyme, both from the crude extract and from Maxilact LX-5000, showing a main band with an approximate molecular weight of 124 kDa which agreed with the one calculated from the sequence of the *LAC4* gene, the single gene coding for  $\beta$ -galactosidase which has been cloned in *K. lactis* (Poch *et al.*, 1992).

These data demonstrate the usefulness of both tested purification procedures for obtaining relatively pure  $\beta$ -galactosidase from *K. lactis* in sufficient quantities and suitable for direct investigation of sequence, molecular

structure or for use as antigen to induce antibodies. These procedures are easier than other methods previously described for the isolation of this enzyme and, furthermore, the two procedures can be combined when highly pure  $\beta$ -galactosidase is required.

#### Molecular mass determination

The approximate molecular mass of the native  $\beta$ -galactosidase was obtained by gel filtration on a Superose 12 column. The activity assay showed that lactase activity was confined in the crude extract to the peak with an Mr of 140–440 kDa (maximum activity at 250 kDa) and in Maxilact LX-5000 to the peak with an Mr of 130–440 kDa (maximum activity at 260 kDa). These results suggest that the main active form of the enzyme is dimeric.

Several main Coomassie Brilliant Blue-staining bands were observed when  $\beta$ -galactosidase purified from Maxilact LX-5000 was subjected to electrophoresis on a 5–15% non-denaturing acrylamide gel. The relative concentration of these bands was variable. The highest band had an apparent molecular weight of about 483 and the others of around 385, 239 and 146. Therefore, these four bands might correspond to different aggregation forms of  $\beta$ -galactosidase from tetramer to monomer. It is highly likely that other minor lower molecular mass bands that were also observed at times corresponded to degradation products of the enzyme.

$\beta$ -Galactosidase activity in an identical unstained native gel was localized by incubating the gel with the chromogenic substrates ONPG or BNG. Only the tetrameric form showed enzyme activity with both substrates whereas the rest of the forms did not. The yellow band obtained with

ONPG suggested that trimeric form might also be enzymatically active, but this could not be determined unequivocally because of its proximity to the tetrameric form. Results of the incubation with BNG showed that only the tetrameric form was active. However, other authors identified at least two active bands in their native electrophoresis (Surve and Mahoney, 1994; Dickson *et al.*, 1979) but they did not determine the molecular weight of these bands. Aggregation of the protein could be favoured by the polyacrilamide gel and by the presence of glycerol in the sample as suggested by Dickson *et al.* (1979). In fact, the glycerol content of Maxilact LX-5000 has been estimated as 565 g/l by Cavaille and Combes (1995).

We conclude that the enzyme may be active both in dimeric and tetrameric form, and the preponderance of one of the forms would depend on the assay conditions.

Immunological characterization of  $\beta$ -galactosidase Commercial  $\beta$ -galactosidases (Sigma) from *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* and bovine liver did not show cross-reactivity with *K. lactis* anti  $\beta$ -galactosidase antibody whereas *K. fragilis*  $\beta$ -galactosidase cross-reacted with *K. lactis* anti- $\beta$ -galactosidase antibody, as quantified by ELISA. Tests checking for the absence of possible secondary unspecific reactions in the ELISA were performed measuring the reactivity of the  $\beta$ -galactosidases with the sera of a non-immunized mouse and also omitting the *K. lactis* anti- $\beta$ -galactosidase antibody. The specificity of the *K. lactis* anti- $\beta$ -galactosidase antibody was also confirmed because the protein extract of a *K. lactis* mutant strain deficient in  $\beta$ -galactosidase (MW-190-9B strain, from Dr Wésolowski-Louvel's collection) did not show significant cross-reactivity in the ELISA with the *K. lactis* anti- $\beta$ -galactosidase antibodies.

A crude *K. lactis* protein extract showed only 10% of the reactivity of the purified protein with *K. lactis* anti- $\beta$ -

galactosidase antibody which suggests that  $\beta$ -galactosidase is not the main protein in the extract. This result agrees well with the factor 11-fold reached in the purification. The *K. fragilis*  $\beta$ -galactosidase preparation was partially purified and its degree of cross-reactivity with *K. lactis* anti  $\beta$ -galactosidase antibody reached 60%. And *vice versa*, *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase cross-reacted with anti-*K. fragilis*- $\beta$ -galactosidase antibody as demonstrated by the double immunodiffusion method.

#### Acknowledgements

Maxilact LX-5000 was a generous gift from Gist-Brocades. The authors would like to thank Dr J. Leiro for his help with immunological techniques and Dr M. Wésolowski-Louvel for providing the MW-190-9B strain. M. Becerra is the recipient of a predoctoral fellowship from the Xunta de Galicia (Spain). This research was funded by grants BIO94-0961 from the CICYT (Spain) and XUGA-10305A93 from the Xunta de Galicia (Spain).

#### References

- Becerra, M., Cerdán, E. and González Siso, M.I. (1997). *Biochim. Biophys. Acta*, 1335: 235-241
- Cavaille, D. and Combes, D. (1995). *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 22: 55-64
- Dickson, R.C., Dickson, L.R. and Markin, J.S. (1979). *J. Bacteriol.*, 137: 51-61
- Erickson, R.P. and Steers, J.R. E. (1970). *J. Bacteriol.*, 102: 79-84
- García-Garibay, M. (1992). *Ciencia*, 43: 23-33
- Guarente, L. (1983). *Meth. Enzymol.*, 101: 181-189
- Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F.M., Santamarina, M.T. and Sanmartín, M.L. (1993). *Parasite Immunol.*, 15: 243-250
- Mbuyi-Kalala, A., Schnek, A.G. and Leonis, J. (1988). *Eur. J. Biochem.*, 178: 437-443
- Poch, O., L'Hôte, H., Dallery, V., Debeaux, F., Fleer, R. and Sodoyer, R. (1992). *Gene*, 118:55-63
- Surve, S.S. and Mahoney, R.R. (1994). *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 20, 55-65

Received: 28 November 1997

Revisions requested: 10 December 1997/14 January 1998

Revisions received: 9 January 1998/30 January 1998

Accepted: 31 January 1998

## Dealing with different methods for *Kluyveromyces lactis* $\beta$ -galactosidase purification

M. Becerra, E. Cerdán, M.I. González Siso\*

Departamento de Biología Celular e Molecular. Facultade de Ciencias. Campus da Zapateira s/n. 15071-A Coruña, Spain. \* To whom correspondence should be addressed. E-mail: migs@udc.es

### ABSTRACT

Several micro-scale chromatography-based procedures for purification of the  $\beta$ -galactosidase from the yeast *Kluyveromyces lactis* were assayed. Purified enzyme was suitable to be used as antigen to induce polyclonal antibodies production. Specific staining of non-denaturing PAGE gels with chromogenic substrates allowed the determination of the number of subunits forming the native enzyme.

### INTRODUCTION

The lactase or  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23) from *Kluyveromyces lactis* is an enzyme which has attracted our attention since it represents an essential material to convert the waste product cheese whey into a substrate valuable for biotechnology industries (1). Our previous research focused on several different aspects about this enzyme such as production (2,3), immobilization (4), use of whole cells as catalytic agents (5,6) and, more recently, release by autolytic mutants (7) in order to reduce the cost associated to preparation. As this research progressed, the need for purified *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase arose, for example, to use it as antigen to induce specific antibodies. Therefore, we assayed several purification procedures looking for a quick and simple method which allowed us to obtain enough purified enzyme in only one step and minimizing as much as possible the amount of crude extract needed. The best results regarding *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase purification have been published very recently (8). Here we describe the methods in more detail and comment briefly on some complementary aspects of the results which are not shown in the previous article.

### MATERIALS AND METHODS

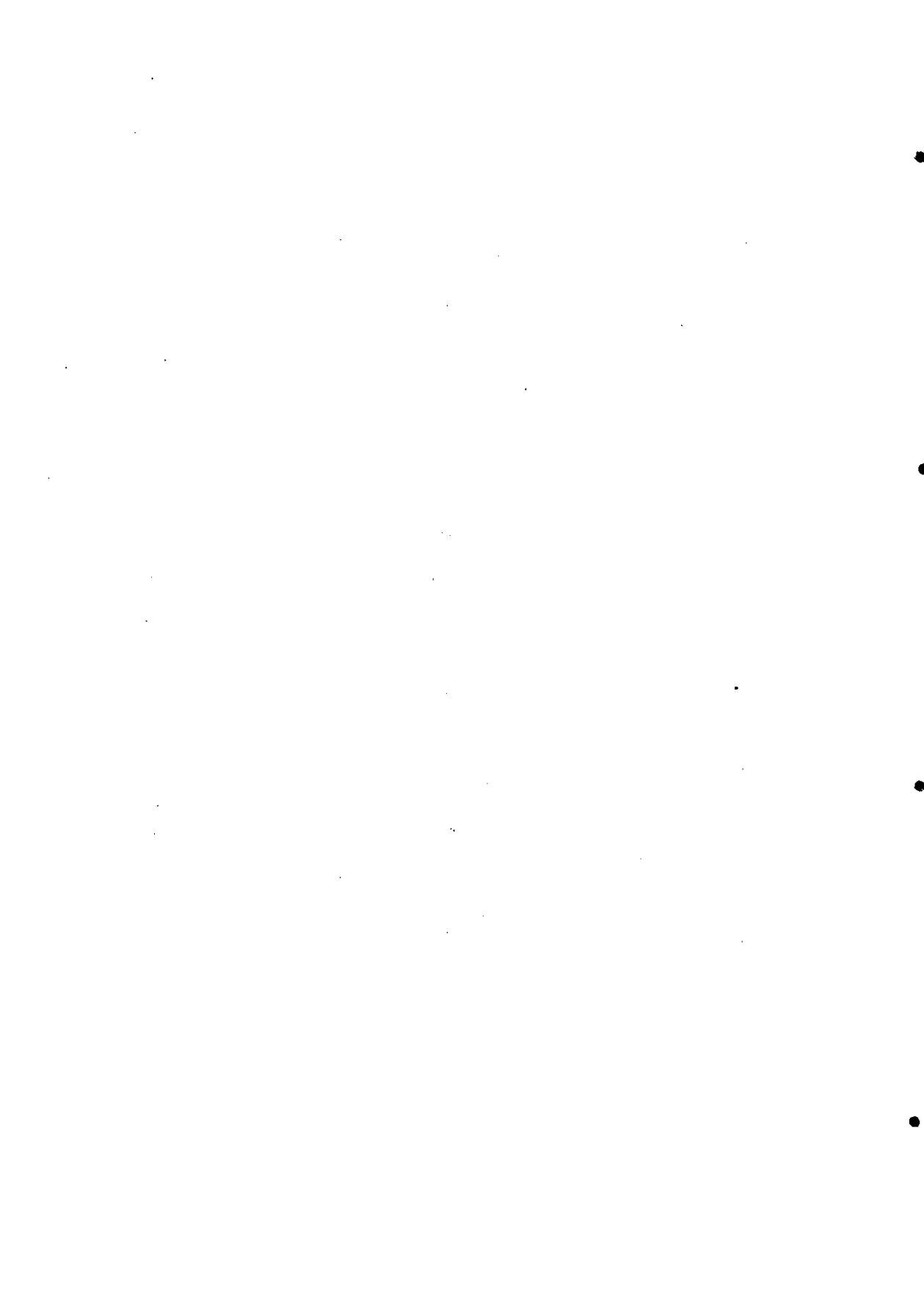
Some of the methods here described in detail were briefly related in references (7,8).

#### Preparation of crude extract

The cells cultured in 1 l of YPL (10 g/l yeast extract, 5 g/l peptone and 40 g/l lactose) up to an  $A_{600\text{ nm}}$  of 2 were harvested by centrifugation at 7000 rpm for 5 minutes at 4°C and washed once with distilled water. They were suspended in 20 mM Tris-ClH, pH 7.8, 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM

©1998 *Biological Procedures Online*. All rights reserved. Paper-based copying permitted for internal use for educational or non-profit purposes only. Otherwise, this article may be copied to paper provided that \$US15 per copy is paid directly to *Biological Procedures Online*, GMO 106 Box 44, Waterloo ON, Canada N2L 3G1. Electronic copying, storage or redistribution prohibited.





EDTA, 10% glycerol buffer with 0.1 mM PMSF, 4 mM Pepstatin, 4 mM Leupeptin and 2  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol and broken using a sonicator at 16 microns for 20 minutes at 4°C making 5 minutes intervals after each 5 minutes exposure. Cell debris was removed by centrifugation at 40,000 rpm for 90 minutes at 4°C. The supernatant, cell-free extract, was stored at -80°C.

### Purification of $\beta$ -Galactosidase

Purification of the  $\beta$ -galactosidase of *K. lactis* strain NRRL-Y1140 from the protein extract described above and from a *K. lactis* commercial lactase preparation, Maxilact LX-5000 (Gist Brocades, France/The Netherlands), was performed using different chromatography techniques. All purification steps were carried out at 4°C. The enzymatic activity was assayed in the fractions obtained from chromatography. Active fractions were pooled and, when required, concentrated by filtration in Amicon Microcon-100 YM membranes.

**Gel filtration chromatography.** The FPLC Smart system from Pharmacia was used. The column Superose 12 PC 3.2/30 (2.4 ml) prepacked with Superose 12, a highly cross-linked, 12% agarose-based medium, was equilibrated and further eluted with 50 mM Sodium Phosphate, pH 7.0, 0.15 M NaCl. Absorbance (280 nm) was measured on line. The elution rate was 40 ml/min and the eluate was collected in 0.1 ml aliquots. The column was calibrated using the following molecular weight standards (Sigma Chemical, USA): Jack Bean Urease 545,000 Da (hexamer) and 272,000 Da (trimer) and Bovine Serum Albumin 132,000 Da (dimer) and 66,000 Da (monomer). The molecular mass of the native protein was extrapolated from a plot of the logarithm of the molecular mass versus the elution volume.

**Ion-Exchange chromatography.** The FPLC Smart system from Pharmacia was used. The column Mono Q PC 1.6/5 (0.10 ml) prepacked with Mono Q (Quarternary amino ethyl), a strong anion exchanger based on a beaded hydrophilic polymer, was equilibrated with 20 mM Trietanolamine, pH 7.5. Proteins were eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 1.0 M in 20 minutes at a flow rate of 100 ml/min, and the eluate was collected in 0.1 ml aliquots.

**Affinity chromatography.** The column with 5 ml agarose-p-aminophenyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (Sigma Chemical, USA) was equilibrated with 50 mM phosphate buffer, and the enzyme was eluted with 0.1 M borate buffer, pH 10 (9). 1 ml aliquots were collected at a flow rate of 100 ml/min and pH was neutralized to avoid denaturation.

### $\beta$ -Galactosidase activity

$\beta$ -Galactosidase activity was determined by a modification of the method of Guarante (1983) (10). The enzyme solution was incubated at 30°C for several minutes in 2.0 ml of Z-buffer (0.1 M Sodium Phosphate, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> and 50 mM 2- mercaptoethanol, pH 7.0) with 440  $\mu$ l of orthonitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (4 mg/ml). The reaction was stopped by adding 0.5 ml of 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Released o-nitrophenol (ONP) was measured spectrophotometrically at 420 nm. The molar extinction coefficient of o-nitrophenol under these conditions is  $4.5 \times 10^3$  l.mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (11). One enzyme unit (EU) is defined as the quantity of enzyme that catalyzes the release of 1  $\mu$ mol of ONP from orthonitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) per minute under assay conditions.

### Protein determination

Protein concentration was determined according to the procedure of Bradford (12) using bovine serum albumin as the standard.

**Polyacrylamide gel electrophoresis.** Denaturing acrylamide gels (10% polyacrylamide gels) containing sodium dodecyl sulfate (SDS) were run according to the procedure of Laemmli (13), using a Bio-Rad Mini Protean II apparatus. Protein samples were solubilized by boiling for 5 min in 2.5% SDS and 5% 2-Mercaptoethanol. Protein was concentrated in the gel with a voltage of 100V, then the voltage was increased to 150V and kept constant for 2 hours. Gels were fixed in 12% trichloroacetic acid and protein was stained with a modified and more sensitive Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method (14). Molecular weight was determined using a molecular weight marker kit obtained from Sigma Chemical (USA), containing Rabbit Muscle Myosin (205,000 Da), *E. coli*  $\beta$ -galactosidase (116,000 Da), Rabbit Muscle Phosphorylase b (97,000 Da), Rabbit Muscle Fructose-6-phosphate Kinase (84,000 Da), Bovine Serum Albumin (66,000 Da), Bovine Liver Glutamic Dehydrogenase (55,000 Da), Chicken Egg Ovoalbumin (45,000 Da), Rabbit Muscle Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (36,000 Da).

Native electrophoresis was performed at 4°C, using gradient gels (5-15%) without SDS. The molecular mass was extrapolated from a plot of the logarithm of the molecular mass versus the logarithm of the percentage of polyacrylamide. The following standards (Sigma Chemical, USA) were used: bovine serum albumin monomer and dimer (66,000 and 132,000 Da), urease trimer and hexamer (272,000 and 545,000 Da).

When detection of  $\beta$ -galactosidase activity was required after a non-denaturing electrophoresis process, three different techniques were used. A) a non-fixed gel was plunged in Z-buffer containing ONPG (4 mg/ml) for several minutes at 30°C until a yellow band appeared (15). B) the active bands in the native gels were also stained following the technique of Erickson and Steers (16), using 0.025 BNG (6-bromo-2-naphthyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) from Sigma Chemical (USA) as substrate in 10% methanol (v/v), 0.01 M Tris-ClH (pH 7.4), 0.01 M NaCl and 0.01 M MgCl<sub>2</sub>. The incubation time was several minutes at room temperature, followed by 1 to 2 minutes in 1 mg/ml diazo-blue B and the appearance of brown band indicated the presence of an enzymatically active form of  $\beta$ -galactosidase. The reaction was stopped by rinsing in water and fixing the gel in 7.5% acetic acid. C) An alternative stain was used (17), gels to be stained were placed in substrate solution (5 mM methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside, MUG, in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0) and incubated for 2 to 5h at room temperature. Gels were transferred to a UV transilluminator for visualization.

### Immunological studies.

To obtain antiserum against *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase BALB/c mice and a Californian rabbit were used. In the first case, BALB/c mice were intraperitoneally immunized with 0.2 ml of a 1:1 (v/v) mixture of Freund's complete adjuvant (FCA) and PBS containing 50  $\mu$ g of the *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase (Maxilact LX-5000, Gist Brocades, France/The Netherlands). The same dose in 125 ml (but without FCA) was

injected via the retrobulbar venous plexus 21 days post-primary immunization. Mice were bled 14 days post-secondary immunization and the sera was separated by centrifugation at 2,000g for 10 min., mixed 1:1 (v/v) with glycerol and stored at -20°C until use.

In the second case, a primary dose of 50 µg of the *K. lactis* β-galactosidase 124 kDa band cut out from denaturing PAGE gels and emulsified in Freund's complete adjuvant was administered subcutaneously at multiple sites in a healthy Californian rabbit of 2-3 kg body weight. The rabbit was given a booster injection after 8-10 weeks (50 µg of the same band but electroeluted from the gel). Two weeks after the second booster dose, the animal was bled and antiserum was collected. Serum was separated by centrifugation at 5,000g for 5 minutes, mixed 1:1 with glycerol and stored at -20°C until use.

To avoid secondary reactions, antisera, both from mice and rabbit, were adsorbed 24 hours at 4°C 1:1 (v/v) with a crude proteic extract obtained as described above by sonical disruption of *K. lactis* β-galactosidase deficient cells (MW-190-9B strain, from Dr. Wésolowski-Louvel's collection) cultured in YPD (10 g/l yeast extract, 5 g/l peptone and 20 g/l glucose). Both antisera showed a similar band pattern in western blots.

Serological reaction between enzyme and antiserum was determined by Ouchterlony immunodiffusion method (18) using 1% agarose in 0.2M Tris-ClH, pH 8.3, 3% PEG 6000 and 0.01% sodium azide.

#### **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Indirect ELISA was carried out as described in Iglesias *et al.* (19). Extracts containing β-galactosidase were bound to PVC microtitre plates (0.5-2 µg of protein/well) in 100 ml/well of carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) overnight at 4°C. Plates were then washed three times with TBS (50 mM Tris, 0.15 M NaCl; pH 7.4) and blocked for two hours at 37°C with 5% solution of non-fat dry milk in TBS containing 0.2% Tween 20 (TBS-Tween). The plates were incubated for two hours at 37 °C with the test sera diluted in TBS-Tween containing 1% non-fat dry milk, washed with TBS containing 0.05% Tween (5x5 minutes) and incubated for one hour at 37°C with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin (Ig) polyclonal antibody (Dakopatts A/S, Glostrup, Denmark) diluted in TBS-Tween containing 3% polyethylene glycol 6000. The plates were then washed with TBS (5x5 minutes), then 100 ml of substrate containing 0.04% o-phenylenediamine (Sigma Chemical, USA) and 0.001% hydrogen peroxide in phosphate-citrate buffer (pH 5.0) was added. The reaction was stopped after 20 minutes by adding 25 ml of 3 N sulfuric acid. Optical density at 492 nm was measured on a microtitre plate reader (Titertek Multiskan, Labsystems, Finland).

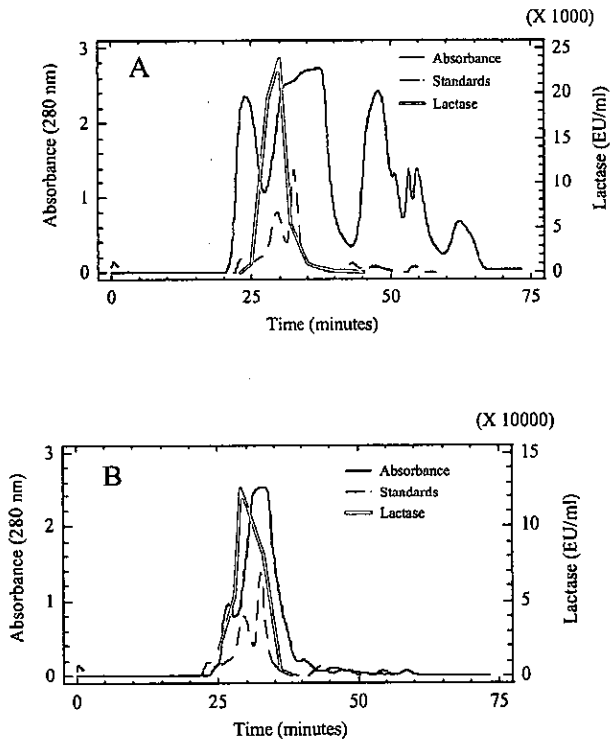
#### **Immunoblotting**

Following electrophoresis, gels were electotransferred onto a nitrocellulose membrane at a constant voltage of 15 V for one hour and immunostained. The membrane was washed with TBS (50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4) stained with Ponceau S to verify transfer, then dried and blocked overnight at 4°C with TBS containing 0.2% Tween-20 and 5% non-fat dry milk, and finally incubated 2 hours with a 1:500 dilution of mouse immune serum or 1:250 of rabbit immune serum. Membrane was washed with TBS containing 0.2% Tween-20 and incubated with a 1:1600 dilution of peroxidase-conjugated rabbit

anti-mouse Ig (Dakopats, Denmark) or 1:2000 of peroxidase-conjugated goat anti-rabbit Ig (Sigma ImmunoChemicals, USA), respectively. The immunoreactant bands were stained by adding TBS containing 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.06% diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.03% NiCl<sub>2</sub>. The reaction was stopped by thorough washing in TBS.

## RESULTS AND DISCUSSION

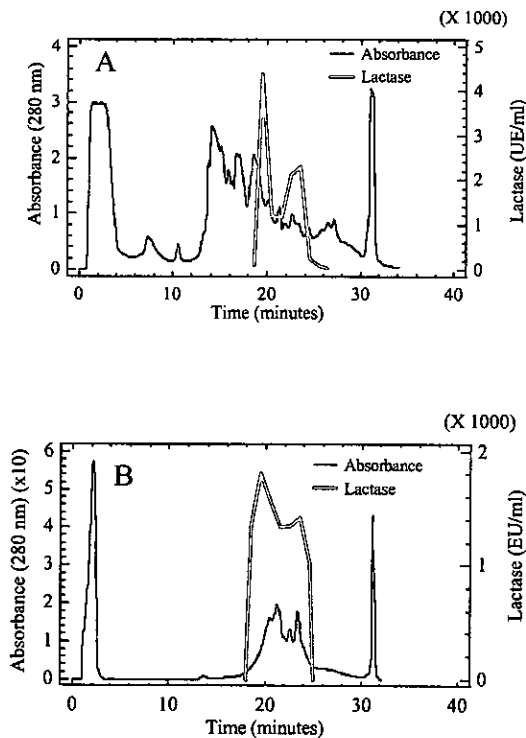
The purification of  $\beta$ -galactosidase from a crude protein extract from *K. lactis* strain NRRL-Y1140 by gel filtration chromatography on Superose 12 PC 3.2/30 resulted in a purification factor of 1.8-fold having an overall yield, based on total enzyme units, of about 50 %. The purification factor reached 2.3-fold when this technique was applied to partially purified extracts. Representative chromatograms are shown in figure 1.

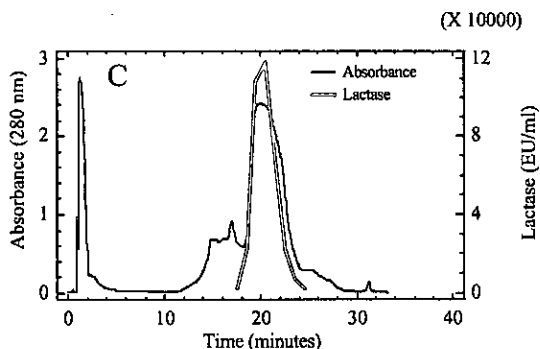


**Figure 1:** Profiles of  $\beta$ -Galactosidase activity and protein obtained after gel filtration. (A) Chromatography of 2.4 mg of a crude extract from *K. lactis*. (B) Chromatography of 3 mg of partially purified extracts from Maxilact LX-5000. The profile of molecular weight standards used for calibration

are shown. Absorbance values of standards are multiplied by 100. Fraction showing the peak of maximum lactase activity was estimated to correspond to a molecular weight of 250 kDa in the crude extract and 260 kDa in Maxilact LX-5000.

Ion-exchange chromatography turned out to be less effective than gel filtration. When it was applied, as described in the Materials and Methods section, both to the active fractions pooled from gel filtration chromatography of a crude yeast protein extract and directly to the Maxilact LX-5000 preparation, a purification factor of 1.6-fold was obtained. Yield, based in recovered enzyme units, reached 8% in the first case and 33% in the second one. Sometimes a slight reduction in specific activity was observed, it was due to unknown reasons and probably related to enzyme denaturation produced during the chromatography process. Another unexplained result was that when this technique was used both directly with the crude protein extract or with the active fractions pooled from the gel filtration chromatography, enzyme activity profiles repeatedly showed two peaks, whereas when Maxilact LX-5000 was used, only one peak of activity was observed (Figure 2).





**Figure 2:** Profiles of  $\beta$ -Galactosidase activity and protein obtained after ion-exchange chromatography. (A) Profile of 2.4 mg of a crude extract from *K. lactis*. (B) Chromatography of 0.6 mg of active fractions pooled from gel filtration of a crude yeast protein extract. (C) Chromatography of 2.4 mg protein of Maxilact LX-5000.

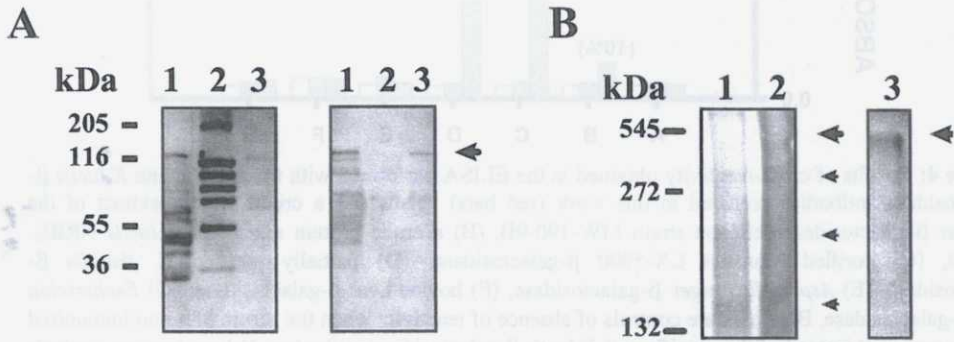
The FPLC systems show the advantage that proteins may be purified from low quantities of crude preparations if compared to traditional higher-scale chromatography systems. For instance, in this study, about 7 mg of total protein in the crude extract were enough for a purification process including two gel filtration steps, one ion-exchange step and one ultrafiltration step. An 11-fold purification factor was achieved after the whole process (Table 1 of reference 8). Although this purification factor may seem low, it is in accordance with the antibodies-reactivity showed by a crude protein extract *versus* the purified enzyme and, moreover, the specific activity was very high (8).

Affinity chromatography on the substrate-analogue agarose-p-aminophenyl- $\beta$ -D-thiogalactoside was also assayed for  $\beta$ -galactosidase purification both from crude *K. lactis* protein extracts and from Maxilact LX-5000. A representative chromatogram has been shown in the previous article (8). The purification factor was 2.5 and 2.1-fold, respectively. Therefore, we consider this technique more effective than each single gel filtration and ion-exchange chromatography step. Moreover, the affinity purified  $\beta$ -galactosidase turned out to be homogeneous in denaturing polyacrilamide gel electrophoresis and western-blotting analysis (Figure 3A). A main band with an approximate molecular weight of 124 kDa was observed.

Sometimes, other additional bands of smaller molecular weight were also present, more notoriously in the case of Maxilact LX-5000, and are probably attributable to  $\beta$ -galactosidase degradation products; their intensity increased when the 124 kDa band decreased and they were also detected in Western blotting analysis with the anti-*K.lactis*- $\beta$ -galactosidase antibodies (both with rabbit and with mouse antisera). This occurred for the three purification techniques employed in this work. In fact, one of the major difficulties encountered in the purification was the increasing instability of the enzyme during the

different purification steps, and also for the purified enzyme even if it was stored in a buffer containing glycerol.

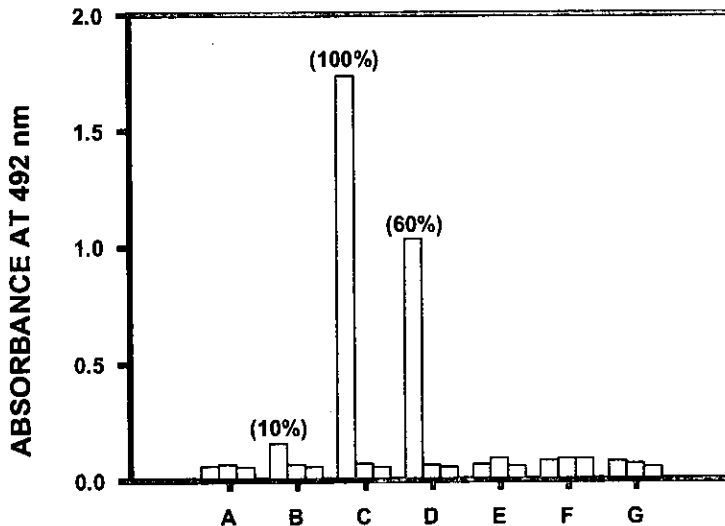
Relatively high amounts of enzyme (40-80  $\mu\text{g}$  of purified protein) were needed in order to detect the active band after electrophoresis on a 5-15% nondenaturing acrylamide gel. In this case  $\beta$ -galactosidase purified from Maxilact LX-5000 was used. As has been previously described (8) among the several Coomassie brilliant blue-staining bands observed, only the one with an estimated molecular weight corresponding to the tetrameric form always showed enzyme activity on an identical unstained native gel incubated with the chromogenic substrates ONPG (data not shown) or BNG (Figure 3B). Bands stained with ONPG were more intense, but also less stable after storage, than those obtained with the BNG solution. In our hands, the technique using MUG as substrate was less sensitive than the other ones and did not show active bands.



**Figure 3:** SDS-PAGE (left) and immunoblotting (right) of purified  $\beta$ -Galactosidase from *K. lactis* (A).  $\beta$ -Galactosidase is indicated by an arrow. Western-blot was incubated with mouse immune serum. Lane 1: 75  $\mu\text{g}$  of a crude extract from *K. lactis*; lane 2: Molecular weight markers; lane 3: 5  $\mu\text{g}$  of  $\beta$ -galactosidase from *K. lactis* purified by affinity chromatography. (B) Electrophoresis on a non-denaturing gradient gel (5-15%) stained with ONPG and later Coomassie brilliant blue G250 (left) and with BNG (right). Bands with  $\beta$ -Galactosidase activity are indicated by higher arrows. Different forms of  $\beta$ -Galactosidase are shown by smaller arrows. Different concentrations of  $\beta$ -Galactosidase from Maxilact LX-5000 were loaded. Lane 1: 20  $\mu\text{g}$ ; lane 2: 40  $\mu\text{g}$ ; lane 3: 80  $\mu\text{g}$ .

Polyclonal anti-*K.lactis*- $\beta$ -galactosidase antibodies were prepared. Specificity of these antibodies was tested by ELISA (Figure 4). Secondary non-specific reactions were considered negligible. The most outstanding results concerning the immunological characterization of *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase have been discussed in the previous paper (8).





**Figure 4:** Results of cross-reactivity obtained in the ELISA performed with the specific anti *K.lactis*  $\beta$ -galactosidase antibodies prepared in this work (red bars) versus (A) a crude protein extract of the *K.lactis*  $\beta$ -galactosidase deficient strain MW-190-9B, (B) a crude protein extract of *K.lactis* NRRL-Y1140, (C) purified Maxilact LX-5000  $\beta$ -galactosidase, (D) partially purified *K. fragilis*  $\beta$ -galactosidase, (E) *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase, (F) bovine liver  $\beta$ -galactosidase, (G) *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase. Blue bars are controls of absence of reactivity when the serum of a non-immunized mouse was used instead of the specific anti *K.lactis*  $\beta$ -galactosidase antibodies. Yellow bars are controls of absence of reactivity when these primary antibodies are not added.

Therefore, we may conclude that the purification procedures assayed in this work, which are easy and need small amounts of crude extract, allowed us to obtain enough purified *K.lactis*  $\beta$ -galactosidase for several uses, for example, antigen to induce antibodies. Comparing these techniques, affinity chromatography gave the highest purification factor although gel filtration in the FPLC system has demonstrated to be faster (each run takes about 1 hour whereas each affinity chromatography run takes about 8 hours) and very accurate and reproducible. Ion-exchange chromatography is the fastest procedure (each run takes about half an hour) but purification factor is lower than with the other two techniques.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Maxilact LX-5000 was a generous gift from Gist-Brocades. The authors would like to thank Dr J. Leiro for his help with immunological techniques and Dr. M. Wésolowski-Louvel for providing the MW-190-9B strain. M. Becerra was the recipient of a predoctoral fellowship from the Xunta de Galicia (Spain) during 1995-97 and is the recipient of a fellowship from the Instituto Danone (Spain). This research was

funded by grants BIO94-0961 from the CICYT (Spain) and XUGA-10305A93 from the Xunta de Galicia (Spain).

## REFERENCES

1. González Siso, M.I. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores.Technol.* **57**, 1-11.
2. González Siso, M.I. 1994.  $\beta$ -galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* on milk whey: batch versus fed-batch cultures. *Proc. Biochem.* **29**, 565-568
3. Becerra, M. and González Siso, M.I. 1996. Yeast  $\beta$ -galactosidase in solid-state fermentations. *Enz. Microb.Technol.* **19**, 33-44.
4. González Siso, M.I., Freire Picos, A., Ramil, E., Rodríguez Belmonte, E., Rodríguez Torres, A. and Cerdán, E. 1994. Covalent immobilization of  $\beta$ -galactosidase on corn grits. A system for lactose hydrolysis without diffusional resistance. *Proc. Biochem.* **29**, 7-12
5. González Siso, M.I., Cerdán, E., Freire Picos, M. A., Rodríguez Belmonte, E. and Rodríguez Torres, A.M. 1992. Permeabilization of *Kluyveromyces lactis* cells for milk whey saccharification: a comparison of different treatments. *Biotechnol.Techniques* **6**, 289-292.
6. González Siso, M.I. and Suárez Doval, S. 1994. *Kluyveromyces lactis* immobilization on corn grits for milk whey lactose hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 303-310.
7. Becerra, M., Cerdán, E. and González Siso, M.I. 1997. Heterologous *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase production and release by *Saccharomyces cerevisiae* osmotic-remedial thermosensitive autolytic mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1335**, 235-241.
8. Becerra, M., Cerdán, E. and González Siso, M.I. 1998. Micro-scale purification of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric forms are active. *Biotechnol.Techniques* **12**, 253-256.
9. Nader de Macias, M.E., Perdigon, G., Oliver, G. and A. A. P. de Ruiz Holgado. 1985. Immunological relationships among  $\beta$ -galactosidases in members of the genus *Lactobacillus*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **35**, 103-110.
10. Guarante, L. 1983. Yeast promoters and LacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeasts. *Meth. Enzymol.* **101**, 181-189.
11. Inchaurredo, V. A., Yantorno, O.M. and Voget, C.E. 1994. Yeast growth and  $\beta$ -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose limited synthetic medium. *Proc. Biochem.* **29**, 47-54.
12. Bradford, M.M. 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.
13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
14. Neuhoff, V., Stamm, R. and Eibk, M. 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis* **6**, 427-448.
15. Dickson, R.C., Dickson, L.R. and Markin, J.S. 1979. Purification and properties of an inducible  $\beta$ -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **137**, 51-61.
16. Erickson, R.P. and Steers, J.R. E. 1970. Comparative study of isoenzyme formation of bacterial  $\beta$ -Galactosidase. *J. Bacteriol.* **102**, 79-84.

17. Brady, D., Marchant, R., McHale, L. and McHale, A.P. 1995. Isolation and partial characterization of  $\beta$ -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 696-699.
18. Pritchard, D.I., Maizels, R.M., Behnke, J.M. and Appleby, P. 1984. Stage-specific antigens of *Nematospiroides dubius*. *Immunology* **53**, 325-335.
19. Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F.M., Santamarina, M.T. and Sanmartin, M.L. 1993. Anisakis simplex: antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice. *Parasite Immunol.* **15**, 243-250.

# EXTRACTION OF INTRACELLULAR PROTEINS FROM

## *Kluyveromyces lactis*

Manuel Becerra, Esther Rodríguez-Belmonte, Esperanza Cerdán and M<sup>a</sup> Isabel  
González Siso\*

Departamento de Biología Celular e Molecular. Facultade de Ciencias. Campus da Zapateira  
s/n. 15071- A Coruña. Spain.

\*to whom correspondence should be addressed

Phone, 34-981-167000

Fax, 34-981-167065

E-mail, migs@udc.es

**Running headline:** *K. lactis* protein extraction

## SUMMARY

Several preparation methods of crude extracts of yeasts were compared in order to obtain a good recovery of intracellular proteins and a sample quality suitable for further chromatographic analysis as exemplified by  $\beta$ -galactosidase or lactase. Sonication was found to be the most effective method and the physiological state of the cells and growth conditions at the time of extraction are essential parameters for obtaining a good yield. The procedure described is simple, rapid and applicable to other enzymes of interest.

**KEYWORDS:**  $\beta$ -galactosidase, purification, extraction, sonication, *Kluyveromyces lactis*

## INTRODUCTION

The growing use of fermentation processes to manufacture specific products, including diverse heterologous proteins, enzymes or pharmaceuticals, is creating an increased demand for efficient systems for the recovery of intracellular materials from microorganisms.

Cell disruption is the first stage in the procedure to isolate intracellular materials<sup>1</sup>. It constitutes an essential step in downstream processing, as it has considerable influence not only on the total quantity of the desired protein recovered, but also on its biological activity, its association with other cellular components, and the possible presence of proteolytic degradation and contaminants that may influence the subsequent purification steps<sup>2</sup>.

A variety of methods can be used to break up cells, each one having its advantages and disadvantages. In this paper we have compared the efficiency of several methods for the preparation of crude extracts from the yeast *Kluyveromyces lactis* in order to obtain a good recovery of intracellular proteins and a sample quality suitable for further chromatographic analysis.

The crude extracts obtained by sonication resulted in the best yield and were used as protein mixtures in several micro-scale chromatography-based systems designed for  $\beta$ -galactosidase purification.  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside-galactohydrolase, EC. 3.2.1.23) or lactase, a cytoplasmic protein, was chosen as a sample protein because its activity is easy to assay and it has important applications in the dairy industry<sup>3-6</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

### *Microorganisms and culture conditions*

*Kluyveromyces lactis* NRRL-Y1140 was used in the extraction. Cultures were aerobically grown in YPL (1% yeast extract, 0.5% peptone and 4% lactose) and YPD (1% yeast extract, 0.5% peptone and 0.5% dextrose) at 30°C. Cells were harvested by centrifugation at 4,000 g. The yeast pellet was washed once with distilled water and stored at -20°C.

*Escherichia coli* JM109 strain (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiD(lac-proAB) F'[traD36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>f</sup> lacZDM15]*) was used for transformation with the plasmid pLX8 by means of the usual DNA recombinant techniques<sup>7</sup>. The pLX8 plasmid carries the *LAC4* promoter and gene, which codes for *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase, and the *LAC12* gene which codes for *K. lactis* lactose permease.

### *Extraction with solvents*

The harvested cells (2 g wet weight), were suspended in 0.5 M phosphate buffer, pH 9.5 to a volume of 20 ml. After the addition of 1% chloroform, the cell suspensions were incubated at 37°C for 3 hours<sup>8</sup>. During extraction, the activity of released  $\beta$ -galactosidase was determined after cells were removed by centrifugation for 5 min at 4,000 g. This activity was compared to intracellular enzymatic activity.

In other instances, 1 g (wet weight) of cells was suspended in different solvents at 80%: ethanol, methanol, isopropanol and t-butanol<sup>9</sup>. The extraction took 90 min at a temperature of 30°C. The solvent-cell mixture was then diluted with 100 ml of 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.6 and incubated for 21 hours at 30°C. The extracted cells were removed from the enzyme-enriched buffer by centrifugation and the enzymatic activity of released  $\beta$ -galactosidase was determined. Results were expressed as the percentage of released activity in relation to intracellular activity.

### *Extraction with mechanical procedures*

The cells were harvested at different cell densities by centrifugation at 4,000 g for 5 min at 4°C and washed once with distilled water. They were suspended in 1 ml of buffer (20 mM Tris-ClH, pH 7.8, 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 10% glycerol buffer with 0.1 mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride), 4 mM Pepstatin, 4 mM Leupeptin and 2  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Mercaptoethanol) per gram wet weight and broken up using different techniques: a) stirred vigorously in a vortex for 20 seconds and 20 seconds on ice; b) using the same method but with the addition of 0.2 g of 1.5 mm glass beads; c) using a sonicator at 16 microns for 20 min at 4°C at 5 min intervals after each 3-4 min exposure. In all cases cell-debris was removed by centrifugation at 48,000 g for 90 min at 4°C and the cell-free extract recovered in the supernatant.

### *Extraction with enzymes*

The cells were suspended in 1.2 M Sorbitol, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.8, and 25 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, washed twice and resuspended in 1.2 M Sorbitol, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.8 and 0.6% Lyticase (from *Arthrobacter luteus*, Sigma Chemical, USA, Ref.: L-8012). The mixture was incubated at 30°C for 45-60 min and centrifuged at 2,000 g at 4°C for 5 min. The pellet was suspended in distilled water and after lysis the suspension was centrifuged at 2,000 g for 5 min.  $\beta$ -galactosidase activity was measured in the supernatant which contains the cytoplasmic fraction<sup>10</sup>.

### *$\beta$ -galactosidase activity*

To determine  $\beta$ -galactosidase activity, the method of Guarante<sup>11</sup> was used. Liberated o-nitrophenol (ONP) was measured spectrophotometrically at 420 nm (extinction coefficient of 4,500 l. mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup><sup>12</sup>).

One enzyme unit (E. U.) is defined as the quantity of enzyme that catalyzes the liberation of 1  $\mu\text{mol}$  of ONP from orthonitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside per min under assay conditions.

### *Protein determination*

Protein concentration was determined according to the procedure of Bradford<sup>13</sup> using bovine serum albumin as the standard.

### *Purification of $\beta$ -galactosidase*

The purification of  $\beta$ -galactosidase was performed using several chromatographical techniques. All purification steps were carried out at 4°C. The activity was assayed in the fractions obtained from chromatography. Active fractions were pooled and, when required, concentrated by filtration in Amicon Microcon-100 YM membranes.

### *Gel filtration chromatography*

The FPLC Smart system from Pharmacia was used. The column Superose 12 PC 3.2/30 (2.4 ml) pre-packed with Superose 12, a highly cross-linked, 12% agarose-based medium, was equilibrated and further eluted with 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.15 M NaCl. Absorbency (280 nm) was measured on line. The elution rate was 40  $\mu$ l/min and the eluate was collected in 0.1 ml aliquots.

### *Ion-Exchange chromatography*

The FPLC Smart system from Pharmacia was used. The column Mono Q PC 1.6/5 (0.10 ml) pre-packed with Mono Q (Quarternary amino ethyl) was equilibrated with 20 mM triethanolamine, pH 7.5. Proteins were eluted with a linear gradient of NaCl from 0.0 to 1.0 M in 20 minutes at a flow rate of 100  $\mu$ l/min and the eluate was collected in 0.1 ml fractions.

### *Affinity chromatography*

The column with 5 ml agarose-p-aminophenyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (Sigma Chemical, USA) was equilibrated with 50 mM phosphate buffer, and the enzyme was eluted with 0.1 M borate buffer, pH 10<sup>14</sup>. 1 ml aliquots were collected at a flow rate of 100  $\mu$ l/min and pH was neutralized to avoid denaturation.

## **RESULTS**

### *A Study of the extraction with solvents.*

The effect of 1% chloroform extraction on  $\beta$ -galactosidase release from cells was studied at different times. Maximal extracellular activity was reached at 60 minutes and thereafter activity began to fall sharply (*Figure 1*). At this point the percentage of released activity in the buffer in reference to the initial intracellular activity was approximately 1%. As this percentage is very low, and several solvents were found to be able to release  $\beta$ -galactosidase from other yeasts<sup>9</sup>, other compounds (Methanol, Ethanol, Isopropanol and t-Butanol) were used in order to improve the extraction.

The best results were obtained with methanol after 21 h of treatment and with ethanol and t-butanol after 5 h of contact with the extraction buffer (Table 1). In all cases absolute values of  $\beta$ -galactosidase activity were even lower than those obtained by chloroform extraction.

#### *A Study of the extraction with mechanical procedures*

Different methods of mechanical cellular breakage were assayed. Extraction with vigorous stirring (vortex) resulted in a protein release of 0.12 mg/ml with a  $\beta$ -galactosidase activity of 0.61 E.U. A similar result was obtained when cells were treated identically, but with 0.2 g of glass-beads. The best results were achieved with sonication, yielding 20-110-fold more protein and 400-25,000-fold more activity than in the other two mechanical methods (Table 2).

Since bacteria are more sensitive to sonical disruption than yeasts, we transformed a deficient  $\beta$ -galactosidase *Escherichia coli* strain with the pLX8 plasmid. The plasmid carries the *LAC4* gene and promoter region, which codes for *K. lactis*  $\beta$ -galactosidase. The protein obtained by sonication of these transformants was 4-25 times higher than that obtained by yeast sonication; however  $\beta$ -galactosidase activity was 242-50 times lower (Table 2). This is attributable to the fact that  $\beta$ -galactosidase heterologous production in bacteria is not as effective as natural production in yeast.

In order to improve the results obtained with the sonication procedure, extracts from *K. lactis* cells were prepared in different conditions. Cells grown until they reached diverse  $A_{600}$  values were sonicated and the amount of protein and  $\beta$ -galactosidase obtained measured. Both parameters appear to be approximately proportional to the initial absorbency with a maximum of protein and enzymatic activity when cells were close to  $A_{600}$  of 2, thereafter there was a decrease in the activity and protein recovery (Figure 2).

Using different culture volumes (from 500 to 1,000 ml) at the same absorbency yielded similar results with the difference being less than 4.5%. Apparently the efficiency of sonication is not significantly influenced by cell density. The physiological state of the cells at the time of sonication seems to be a determining factor. During sonication the homogenate initially become more viscous as nucleic acids are released from the cells<sup>15</sup>. The viscosity decrease as sonication is continued.

#### *The Enzymatic extraction procedure*

Cells grown in two different media were used to study the enzymatic extraction procedure. The percentage of released activity compared to intracellular activity in cells growing in a medium with dextrose reached about 24% (Figure 3 A), whereas for cells growing in a medium with a  $\beta$ -galactosidase inductor, lactose, the percentage is higher - about 61% at the point of maximum recovery (Figure 3 B). In both cases, samples were taken in triplicate yielding absolute average values of  $23.5 \pm 4$  and  $61.4 \pm 31$ , respectively. As in the sonical extraction, cells harvested during the log phase of growth appear to be more sensitive to lyticase treatment.

In addition to the high cost of the enzyme treatment, there is another important drawback: during lyticase incubation a loss of approximately 36% of  $\beta$ -galactosidase activity took place.



## Purification of $\beta$ -galactosidase

With the crude protein extract obtained by sonication a process of purification was performed<sup>16</sup>. Several scaled-down chromatographical techniques were used. A summary including the most interesting comparative points is given in *Table 3*. Extracts obtained by the sonication procedure were suitable for purification, attaining, along with affinity chromatography, the highest factor of purification, although this technique requires a higher initial amount of sample and more time than the two FPLC-techniques.

## DISCUSSION

A key factor in the production and purification of intracellular enzymes is the cell disruption process<sup>18</sup>. Various methods can be used to solubilize intracellular enzymes depending on their location inside the cell, intended use, and stability. Methods such as homogenization<sup>19-21</sup>, sonication<sup>22-24</sup>, chemical extraction<sup>8,9</sup> have all been used to release intracellular components. The procedure by which cells are disrupted has an important effect on the yield and quality of the protein extract<sup>15</sup>.

In this paper we have compared the extraction of one intracellular protein,  $\beta$ -galactosidase, from *K. lactis*, with different solvents, mechanical (glass-beds, vigorous stirring and sonication) and enzymatic procedures. The sonication procedure yielded the best results, obtaining 2.8-120-fold more protein and 215-25,000-fold more activity than in the other three methods.

The maximal percentage of released activity with the solvent extraction procedure was obtained with methanol after 21 h of contact with the extraction buffer. However the absolute values of  $\beta$ -galactosidase activity were very low and therefore, this procedure is not considered useful as a first step in the isolation and purification of intracellular materials.

The enzymatic extraction procedure introduces a new additive to the extract that may produce a downstream purification problem, in addition to the price of the enzyme and the loss of  $\beta$ -galactosidase activity detected during the incubation.

Sonication of *K. lactis* cells proved to be the most effective method for this initial phase in the preparation of lysates for later purification. The crude protein extract obtained by sonication was fitted to support a purification process by means of chromatographical techniques.

The physiological state of the cells and the conditions of growth at the time of extraction have a major effect on disruption kinetics. Cells harvested during the log phase of growth are more easily disrupted than those harvested during the stationary phase, the best percentages of released activity obtained both in the sonication procedure and in the enzymatic extraction procedure were in the log phase of growth. Cells from the stationary phase have a stronger wall structure than those in the log phase<sup>1</sup>. Cells grown at a higher specific growth rate were probably easier to disrupt than cells growth at a lower specific growth rate, since they direct the available energy towards reproduction rather than towards synthesis or strengthening the wall structure<sup>1</sup>. This would explain why *K. lactis* cells with a fast growth in a lactose medium presented a higher percentage of released activity after the enzymatic extraction procedure than cells growing slowly in a medium with dextrose.

## CONCLUSIONS

The sonication extraction procedure proved to be the most effective technique for the recovery of  $\beta$ -galactosidase from *K. lactis* cells. The physiological state of the cells as well as the growth conditions at the time of disruption are a critical parameter for obtaining a good efficiency. The protein extract proved to be suitable for further chromatographic analysis. The application of this technique to other enzymes is of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

M. Becerra was the recipient of a pre-doctoral fellowship from the Xunta de Galicia (Spain) during 1995-97 and he is currently the recipient of a fellowship from the Instituto Danone (Spain). This research was funded by grants from the University of A Coruña (Spain) and XUGA-10302A98 from the Xunta de Galicia (Spain).

## REFERENCES

1. Keshavarz, E., Hoare, M. and Dunnill, P. Biochemical engineering aspects of cell disruption. In: *Separations for biotechnology* (Verrall M. S. and Hudson M. J., eds.). Ellis Horwood Series, Chichester/England, 1987, Ch 3
2. Millard, C. and Charles, S. M. Preparation of extracts from prokaryotes. In: *Methods in enzymology*. Vol. 182 (Murray P. Deutscher, ed.). Academic Press, Inc., San Diego, California, 1990, Ch 12
3. Siso, M. I. G.  $\beta$ -Galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* on milk whey: batch versus fed-batch cultures. *Proc. Biochem.* 1994, **29**, 565-568
4. Siso, M. I. G., and Suárez Doval, S. *Kluyveromyces lactis* immobilization on corn grits for milk whey lactose hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.* 1994, **16**, 303-310
5. Becerra, M., and Siso, M. I. G. Yeast  $\beta$ -galactosidase in solid state fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* 1996, **19**, 39-44
6. Becerra, M., Cerdán, E. and Siso, M. I. G. Heterologous *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase production and release by *Saccharomyces cerevisiae* osmotic-remedial thermosensitive autolytic mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, **1335**, 235-241
7. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual* 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989
8. Stred'anský, M., Tomáška, M., Sturdík, E. and Kremnický, L. Optimization of  $\beta$ -galactosidase extraction from *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microb. Technol.* 1993, **15**, 1063-1065
9. Fenton, D. M. Solvent treatment for  $\beta$ -D-galactosidase release from yeast cells. *Enzyme Microb. Technol.* 1982, **4**, 229-232
10. Jigami, Y., Muraki, M., Harada, N. and Tanaka, H. Expression of synthetic human-lysozyme gene in *Saccharomyces cerevisiae*: use of a synthetic chicken-lysozyme signal sequence for secretion and processing. *Gene* 1986, **43**, 273-279
11. Guarante, L. Yeast promoters and *lacZ* fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Meth. Enzymol.* 1983, **101**, 181-189

12. Inchaurredo, V. A., Yantorno, O. M., and Voget, C. E. Yeast growth and  $\beta$ -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose limited synthetic medium. *Proc. Biochem.* 1994, **29**, 47-54
13. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, **72**, 248-254
14. Macías, N., Perdigon, M. E., Oliver, G., and Holgado, A. A. P. R. Immunological relationships among  $\beta$ -galactosidases in members of the genus *Lactobacillus*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 1985, **35**, 103-110
15. Foster, K. A., Frackman, S., and Jolly, J. F. *Biotechnology*. Vol. 9 (Reed, G., and Nagodawithana, T. W., eds.). VCH, Weinheim, 1995
16. Becerra, M., Cerdán, E., and Siso, M. I. G. Micro-scale purification of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric forms are active. *Biotechnol. Techniques* 1998, **12**, 253-256
17. Becerra, M., Cerdán, E., and Siso, M. I. G. Dealing with different methods for *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase purification. *Biological Procedures Online* 1998, **1**, 48-58
18. Kula, M.-R. and Schutte, H. Purification of protein and the disruption of microbial cells. *Biotechnol. Prog.* 1987, **3**, 31-42
19. Dickson, R. C., Dickson, L. R. and Markin, J. S. Purification and properties of an inducible  $\beta$ -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* 1979, **137**, 51-61
20. Kengen, S. W. M., Luesink, E. J., Stams, A. J. M., and Zehnder, A. J. B. Purification and characterization of an extremely thermostable  $\beta$ -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Eur. J. Biochem.* 1993, **213**, 305-312
21. Brady, D., Marchant, R., McHale, L., and McHale, A. P. Isolation and partial characterization of  $\beta$ -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. *Enzyme Microb. Technol.* 1995, **17**, 696-699
22. Itoh, T., Suzuki, M., and Adachi, S. Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from lactose fermenting yeasts. *Agric. Biol. Chem.* 1982, **46**, 899-904
23. Macías, N., Nadra, M. C. M., Saad, A. M. S., Holgado, A. A. P. R., and Oliver, G. Isolation and properties of  $\beta$ -galactosidase of a strain of *Lactobacillus helveticus* isolated from natural whey starter. *J. Appl. Biochem.* 1983, **5**, 275-281
24. Lind, D. L., Daniel, R. M., Cowan, D. A., and Morgan, H. W.  $\beta$ -galactosidase from a strain of the anaerobic thermophile, *Thermoanaerobacter*. *Enzyme Microb. Technol.* 1989, **11**, 180-186

**Table 1** Effect of different solvents on lactase release

Solvent	5 Hours	21 Hours
t-Butanol	9.44	0.27
Ethanol	9.3	5.31
Methanol	1.74	15
Isopropanol	0.7	3.5

Cells were treated with 80% solvent for 90 min. The solvent cell mixture was then diluted with 100 ml of 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.6 and incubated for 21 hours at 30°C. Samples were taken at 5 hours and 21 hours of extraction. Results were expressed as the percentage of released activity in reference to intracellular activity.

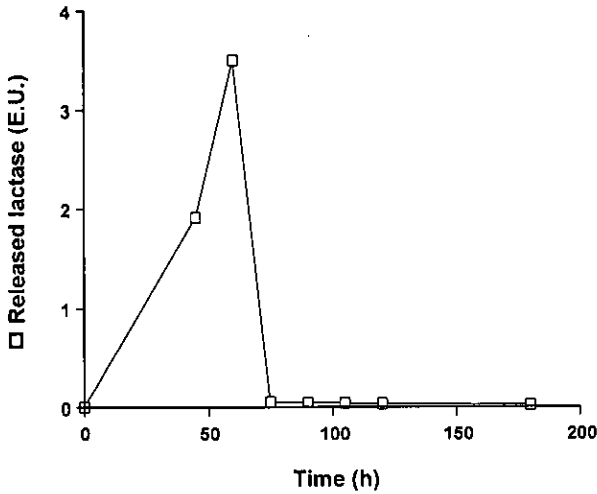
**Table 2** Comparative effect on protein release of the different methods used in this paper

Method	Protein (mg/ml)	$\beta$ -galactosidase (E.U.)
Chloroform	-	3.5
Vortex	0.12	0.61
Glass-beads	0.1	0.95
Sonication	12	25,398
Sonication*	50	105.33
Enzymatic	18	118.1

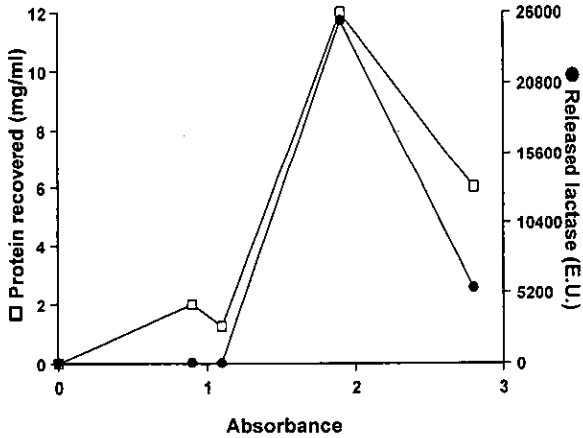
The best results obtained in each treatment are given. \*Results of sonication procedure over *E. coli* cells transformed with the pLX8 plasmid.

**Table 3** A comparison of different chromatographical techniques employed for lactase purification

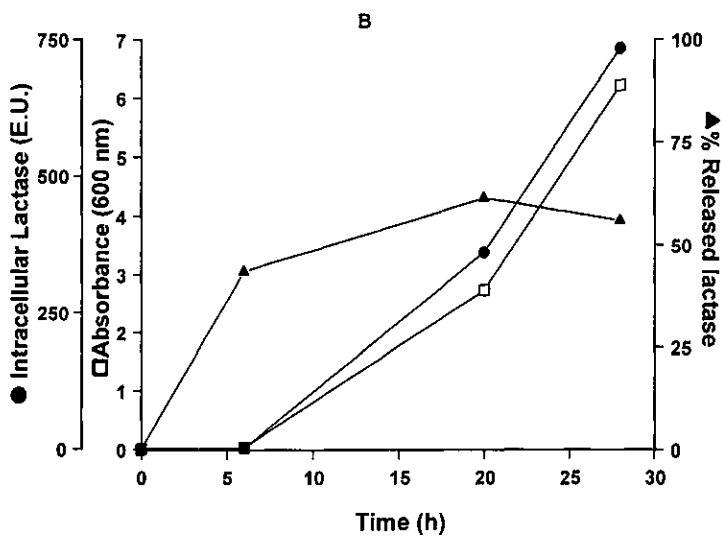
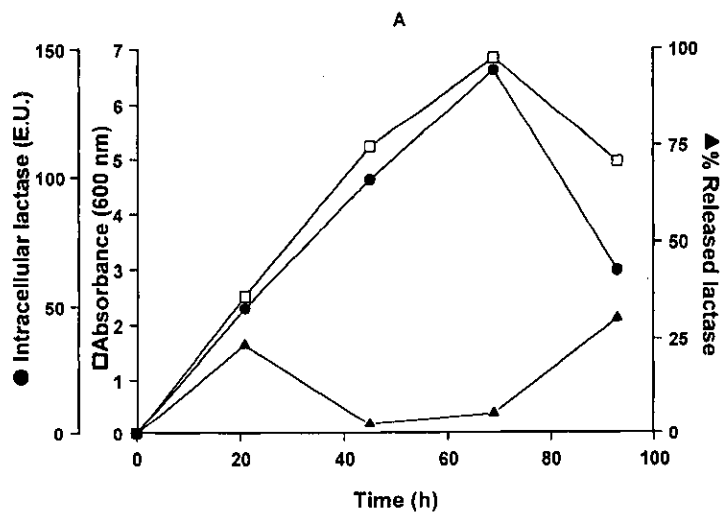
	Gel filtration	Ion-exchange	Affinity
Factor Purification	1.8	1.6	2.5
Yield %	50	33	5.3
Initial amount of sample (mg)	2.4	2.4	12
Factor of dilution	1.5	1.5	1
Duration of the process (h)	1	0.5	8
Reproductibility	+++	+++	++



**Figure 1** Effect of incubation time with 1% chloroform on lactase release. Cells were suspended in 0.5 M phosphate buffer, pH 9.5, with 1% chloroform and incubated for 3 hours. Absolute values of lactase in the medium are given.



**Figure 2** Effect of the growth phase on protein release and lactase activity with the sonication procedure. Cells were harvested at different  $A_{600}$  and broken using a sonicator.



**Figure 3** Percentage of lactase released after the enzymatic treatment. Cells grown in YPD (A) and YPL (B) were treated with lyticase. Data are given as percentage of released activity in the medium in reference to intracellular activity.

UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
Servicio de Bibliotecas



1700744228

1999

**T D**

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE  
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR  
AREA DE BIOQUÍMICA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR



UNIVERSIDADE DA CORUÑA