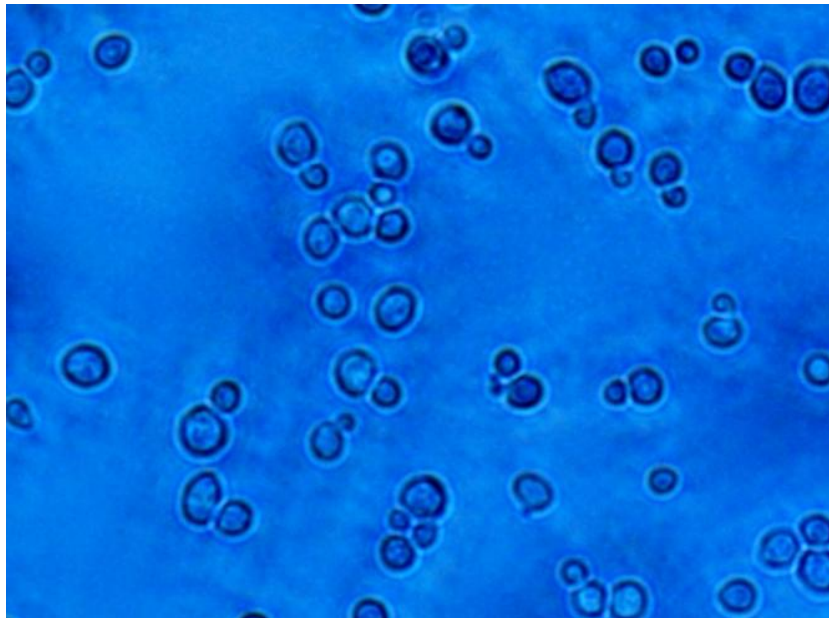


Estudio de la expresión de proteína heteróloga en levaduras a partir de subproductos de la industria alimentaria

Study of the expression of heterologous protein in yeast from food industry by-products

Estudo da expresión de proteína heteróloga en lévedos a partir de subprodutos da industria alimentaria



Álvaro Martínez Moro

Máster en Biotecnología Avanzada

Universidade da Coruña

La imagen de la portada corresponde a una fotografía de *Saccharomyces cerevisiae* cepa BJ3505 utilizada durante el presente proyecto.

TRABAJO FIN DE MÁSTER

D. Manuel Becerra Fernández autoriza la presentación del Trabajo de Fin de Máster: *Estudio de la expresión de proteína heteróloga en levaduras a partir de subproductos de la industria alimentaria* presentado por el alumno D. **Álvaro Martínez Moro**, estudiante del Máster en Biotecnología Avanzada, para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 2 de Febrero de 2015

Fdo.: Manuel Becerra Fernández

A mi familia, amigos y compañeros, que con sus consejos y palabras de aliento me sirvieron de ayuda en distintas etapas como estudiante. Mención especial a David, por su apoyo incondicional y por transmitirme la fuerza para seguir adelante.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de todo el grupo del Área de Bioquímica cuya paciencia dentro del laboratorio me permitió dar un paso más en el campo de la investigación. En particular a Manuel, por su dedicación, atención y ayuda tanto en el aspecto profesional como en el personal.

ÍNDICE

1. Introducción	3
1.1 Caña de azúcar y remolacha azucarera	4
1.2 Melazas	5
1.3 Levaduras	6
1.4 Enzima de interés: α -galactosidasa	7
2. Objetivos	9
3. Material y Métodos	9
3.1 Material biológico	10
3.1.1 Cepas	10
3.1.2 Plásmido	10
3.2 Medios y condiciones de cultivo	11
3.3 Técnicas de Biología Molecular	15
3.3.1 Transformación en bacterias	15
3.3.2 Extracción del ADN plasmídico	16
3.3.3 Cuantificación del ADN	17
3.3.4 Transformación en levaduras	17
3.3.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	17
3.4 Técnicas analíticas	18
3.4.1 Determinación de azúcares por la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)	18
3.4.1.1. Recta patrón	18
3.4.1.2. Azúcares reductores	19
3.4.1.3. Azúcares no reductores	19
3.4. Determinación de la actividad enzimática α -galactosidasa	20
3.6. Otras técnicas	22
3.6.1 Medida de la densidad celular	22

3.6.2 Medida de pH	22
3.7 Método y análisis estadístico	22
4. Resultados y discusión	22
4.1. Construcción de una cepa recombinante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> productora de α -galactosidasa de <i>S. cerevisiae</i>	22
4.2. Evaluación de la melaza de caña y la melaza de remolacha como medios de cultivos adecuados para el crecimiento de la levadura recombinante.	23
4.2.1. Análisis de azúcares presentes en las melazas	23
4.2.2 Evaluación de las melazas como medio de cultivo	24
4.3. Estudio mediante métodos estadísticos de las condiciones que maximizan la producción intracelular y extracelular de la enzima α -galactosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> creciendo en un medio con melazas.	26
4.3.1 α -galactosidasa extracelular	27
4.3.2. α -galactosidasa intracelular	31
4.4. Perspectivas	34
5. Conclusiones	35
6. Bibliografía	36

1. Introducción

A lo largo de la historia, la alimentación se ha visto modificada en beneficio del hombre, lo cual ha tenido su repercusión en el estilo de vida. En primera instancia, la vida nómada hacía recurrir a los alimentos de temporada bien fueran de origen vegetal o animal. Con el paso del tiempo, la especie humana refinó su manera de vivir, provocando que el sedentarismo trajese consigo nuevas técnicas de labranza y ganadería que mejorasen los productos con los que trataban. Finalmente, la historia reciente a través de los avances científicos en el sector agroalimentario, ha permitido la aparición de nuevos productos, con componentes tan novedosos como extraños y que en la actualidad resultan imprescindibles para su conservación, al tiempo que despiertan cierto recelo en algunos consumidores por el uso de microorganismos en estos procesos. De esta forma, el conjunto del procesado y refinamiento de los productos permitieron la aparición de lo que hoy conocemos como industria alimentaria (Lepiller, 2013).

Podemos definir la industria alimentaria como el conjunto de actividades industriales dirigidas al tratamiento, transformación, preparación, conservación y envasado de los productos alimenticios. Por lo general, las materias primas utilizadas son de origen vegetal o animal y se producen en explotaciones agrarias, ganaderas y pesqueras (Berkowitz *et al.*, 2012). En la mayoría de estos procesos se obtiene una gran cantidad de efluentes de escasa o nula utilidad que al mismo tiempo resultan contaminantes para el ecosistema, por lo que, para cumplir debidamente con las leyes medioambientales establecidas, dichos residuos tienen que tratarse antes de ser vertidos.

Los desechos con alta carga orgánica, pueden ser considerados como subproductos si son aprovechables para la elaboración de otros, lográndose exprimir al máximo las materias primas que los procesos nos ofrecen, llevando a un último término el tratamiento de aguas residuales. De esta forma, podemos considerar como subproducto a cualquier resultado no principal obtenido en un determinado proceso y que tiene o puede tener determinadas aplicaciones o aprovechamientos, de forma que lo que para una industria es un subproducto, para otra puede constituir la materia prima (Hermida, 1993). En muchos de estos casos, esos subproductos resultan ser la materia prima de medios de cultivo para la producción de masa celular, prebióticos, probióticos, proteínas, etc., (Crueger *et al.*, 1993) utilizándose dichos nutrientes por un doble interés: por una parte el ya mencionado tratamiento de los desechos o subproductos y por la

rentabilidad de estos medios en contraposición a los medios de cultivos convencionales del laboratorio (Hington *et al.*, 2001). Algunos de estos sustratos son ricos en fuentes de nitrógeno como el licor de macerado de maíz o el extracto de levaduras, mientras que otros son ricos en fuentes de carbono como el almidón, las dextrinas, el lactosuero o las melazas de caña de azúcar o de remolacha. De esta manera podemos obtener un medio de cultivo con los requerimientos nutritivos necesarios para la producción del sustrato de interés a bajo coste (Iañez, 2009).

Dentro del amplio elenco de sectores abarcados por la industria alimentaria, se centrará el interés en el sector azucarero, el cual ha logrado un crecimiento tal, que ha requerido la modernización y automatización de sus procesos (Cheesman, 2004), facilitando la obtención del producto final, reduciendo las pérdidas tanto a nivel de materia prima como a nivel de refinamiento de las diferentes etapas. Dos de las sustancias claves dentro de la industria azucarera son la caña de azúcar y la remolacha azucarera.

1.1 Caña de azúcar y remolacha azucarera

Este proyecto, enfocado a una utilidad industrial, parte de un subproducto de la industria azucarera, un sector enmarcado dentro de la industria agroalimentaria española que tiene un gran interés por su volumen económico, además de la importancia debido a la incidencia social que representa el cultivo de la remolacha -la materia prima que mejor se adapta al clima de la península ibérica- (Vaquero, 2008). En algunos casos se produce la importación de caña de azúcar, de origen tropical, por lo que también se tratarán los desechos obtenidos a partir de dicha planta.

La caña de azúcar es una gramínea tropical, en cuyo tallo se acumula un jugo rico en sacarosa, que tras su extracción y cristalización forma el azúcar. Se conocen diversas variedades cultivadas que se diferencian por el color y la altura de los tallos, siendo esta la parte más importante de la planta puesto que es donde se encuentra un tejido esponjoso y dulce del cual se extrae el azúcar (ICA, 1981).

La remolacha azucarera pertenece a la familia de las Quenopodiáceas. Es una planta de ciclo bianual, que se cultiva para la obtención de azúcar de manera industrial. En el año de siembra forma un abundante aparato foliar y acumula sacarosa en la raíz principal, mientras que en el segundo año, tras la vernalización, emite las flores y fructifica. Por tanto, para la producción de azúcar interesa sólo la fase vegetativa, siendo lo adecuado

recolectar cuando tiene lugar el máximo de acumulación de sacarosa en la raíz (Consejería de agricultura y ganadería, 2013).

El tratamiento de ambos tipos de materias primas es muy similar, aunque debido a que el producto de interés se encuentra en diferentes regiones –tallo y raíz respectivamente- pueden haber variaciones (Baquero, 1987). La fabricación del azúcar, se compone por lo general de diferentes fases como son la descarga, el lavado y troceado de la materia prima, extracción del azúcar, depuración del jugo, evaporación del jugo, cocimientos del jarabe, cristalización del azúcar, centrifugación y secado del azúcar. En el presente estudio nos centraremos en un subproducto que se obtiene en el proceso de cristalización del azúcar, la melaza (Ospina y Palacios, 1994).

1.2 Melazas

Las melazas, mieles finales o melazas “blackstrap” son definidas por muchos autores como un jarabe o líquido denso y viscoso de color oscuro, que ha sido separado de la masa cocida final y de la cual no es posible cristalizar más azúcar por métodos físicos (ICONTEC, 1994), debido al azúcar invertido y la alta viscosidad de las melazas (Swan & Karalazos, 1990). En ocasiones, este subproducto se utiliza para alimentos concentrados en animales (Pozo, 2011) o como suplementos alimenticios para el hombre (Leeson & Summers, 2000), además se emplean en la producción de bebidas alcohólicas o como medio de cultivo para fermentaciones (Rivada, 2008).

Las melazas son por tanto, una mezcla compleja que contiene azúcares, sales y otros compuestos solubles que son producidos durante la fabricación del azúcar, en proporciones variables según el tipo de melaza que se emplee, caña o remolacha. Además de glucosa, fructosa, sacarosa y rafinosa, los cuales son azúcares fermentables, siendo los dos últimos -sacarosa y rafinosa- no reductores, las melazas pueden contener en menor proporción otros azúcares ya sean reductores o no reductores, un aspecto a tener en cuenta durante el proyecto ya que se tratarán los azúcares totales como medio de cultivo y no exclusivamente los reductores (Fajardo & Sarmiento, 2007). Estos son los componentes generales de las melazas, pero la mayoría dependen de la variedad de caña, de la edafología del terreno donde se cultiva, clima, época de cultivo, proceso y eficiencia en la fábrica, etc. Todas estas circunstancias, unidas a la naturaleza química de las melazas hacen que estas posean un pH de entre 5.0 y 6.1 (Castro, 1993), una

característica clave en el cultivo con microorganismos, los cuales deben ser tolerantes a dichos rangos de pH.

En la mayoría de los procesos en los que intervienen las melazas existen microorganismos que emplean ese subproducto como materia prima para su crecimiento o producción de ciertas proteínas, utilizándose de forma habitual las levaduras.

1.3 Levaduras

Uno de los microorganismos más utilizados en la industria alimentaria, precisamente por su tolerancia a determinados rangos de pH presentes en gran cantidad de subproductos son las levaduras, las cuales pueden ser definidas como hongos unicelulares que se reproducen asexualmente por gemación, por fisión múltiple y pueden también reproducirse sexualmente formando ascosporas (Cholota & Mora, 2010).

Las levaduras están implicadas en fenómenos de competición por nutrientes, de antagonismo o de simbiosis en los suelos, aguas, animales y vegetales. Su presencia depende en primer lugar del carbono orgánico, la temperatura, pH y de la presencia de agua (Bouix & Leveau, 2000).

Dentro del amplio elenco de levaduras, encontramos una que es utilizada por excelencia en numerosos procesos fermentativos como es *Saccharomyces cerevisiae*, ya que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, es capaz de utilizar altas concentraciones de azúcar, aunque durante el estudio se podrá observar el interés de emplear bajas concentraciones con el fin de que no se active la ruta de la fermentación alcohólica (Peña & Arango, 2009), presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Carballo, 2000). Los valores de pH deben situarse entre 4 y 5 para reducir el riesgo de contaminación bacteriana y la temperatura debe ser cercana a los 28°C pese a que tolere hasta 35°C, estos valores son los óptimos para el crecimiento del microorganismo (Tuite & Oliver, 1991).

Las levaduras son utilizadas de forma cotidiana en la industria alimentaria, bien en sectores como la panadería o bien con fines alimentarios cultivándose a gran escala. Por

lo general se emplean medios con alto contenido en azúcares que sirven como fuente de carbono y energía, y que también contengan minerales, vitaminas y aminoácidos que van a ser utilizados por la levadura. Para crear un medio completo útil en el crecimiento de la levadura se debe añadir a las melazas, ácido fosfórico y sulfato amónico, que actúan como fuentes de fósforo, sulfato y nitrógeno.

El proceso comienza con el cultivo del preinóculo en el caso del laboratorio puesto que a gran escala, se necesitarían inóculos de reserva puros a los que se adiciona progresivamente el microorganismo con el fin de obtener ese preinóculo pero de grandes dimensiones. Puesto que la melaza es un medio rico en azúcares, se debe controlar la concentración de estos en el medio de cultivo, puesto que un exceso de azúcares provocaría que el proceso metabólico se transforme en fermentación, lo cual conllevaría a un menor rendimiento en producción de biomasa o metabolitos asociados al crecimiento como pueden ser proteínas de interés. Posteriormente se llevaría a cabo un proceso de recuperación del producto, sean proteínas, alcoholes o la propia masa celular (Madigan *et al.*, 2009).

La mayoría de los productos obtenidos a partir de levaduras tienen un destino dentro de la industria alimentaria como son bebidas, suplementos alimenticios o que actúen como prebióticos. En el presente estudio se intentará producir proteínas de interés industrial, en concreto la α -galactosidasa procedente de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Este tipo de enzimas tienen gran importancia en diferentes campos como el sanitario, alimentario, industrial o farmacéutico.

1.4 Enzima de interés: α -galactosidasa

El organismo humano tiene α -galactosidasas en muchos tejidos, capaces de degradar los enlaces α , pero no posee estas enzimas en el intestino delgado, y por ello este tipo de enlaces parece que sólo pueden ser escindidos a partir de la α -galactosidasa presente en bacterias del intestino grueso cuando colonizan el delgado por alguna alteración.

Las α -galactosidasas catalizan la hidrólisis de enlaces α -D-glicosídicos presentes en galacto-oligosacaridos y galactomananos poliméricos. En relación con los galactomananos, las α -galactosidasas de levaduras –como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae*– son activas únicamente sobre residuos de galactosa terminales (Dey & Pridham, 1972), mientras que otras fuentes son activas en residuos terminales e internos (Fujimoto *et al.*, 2003) o únicamente activas en residuos de ramificaciones internas

(Golubev *et al.*, 2004). Estas α -galactosidasas son utilizadas en numerosas aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la industria alimentaria, farmacéutica y también en otro tipo de aplicaciones como por ejemplo la producción de etanol a partir de subproductos de otros procesos (Fernández-Leiro, 2011). A pesar de estar ampliamente distribuidas en plantas y animales, son las enzimas de origen microbiano las más utilizadas (Dey & Pridham, 1972). En muchos casos la presencia de numerosos galacto-oligosacáridos impiden una correcta obtención del producto como sucede en la industria azucarera por acción de la rafinosa principalmente que impide la correcta cristalización de la sacarosa, la adición de α -galactosidasas permitiría una mejora del proceso. Algo similar ocurre en los mamíferos monogástricos, en los que la ausencia de dicha galactosidasa provoca la presencia de azúcares no digeribles lo cual desencadena desordenes gastrointestinales. Con el objetivo de solventar este problema, se emplea la α -galactosidasa durante el procesamiento de los productos o incluso como suplemento dietético después de la ingesta (Rezessy-Szabo *et al.*, 2007). Existen también aplicaciones farmacológicas relacionadas con la actividad de α -galactosidasa como es el tratamiento para la enfermedad de Fabry con mutantes y recombinantes (Tomasic *et al.*, 2010).

La α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* está codificada por el gen *MEL 1*, constituido por 1413 pares de bases que codifican 471 aminoácidos, de los cuales los 19 primeros codifican para un péptido señal que la dirige al espacio extracelular (Liljestrom-Suominen, 1985). Además posee una gran cantidad de glicosilaciones a lo largo de su estructura, tanto es así que los carbohidratos suponen el 40% del peso total de la molécula.

Las α -galactosidasas presentan un elevado interés biotecnológico, y pese a que se emplean enzimas de diferentes orígenes, el empleo de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* tiene grandes ventajas. En primera instancia, se trata de un microorganismo muy estudiado tanto a nivel de procesos como de caracterización y es considerado GRAS (*Generally Recognised As Safe*) lo cual hace que su utilización para cualquier aplicación relacionada con la nutrición humana sea la más apropiada que otras fuentes. Además, como se ha comentado previamente, posee un péptido señal que permite su secreción de forma natural al medio extracelular, lo cual facilita enormemente los procesos de purificación. Por último, y gracias al desarrollo de la

ingeniería genética y de proteínas, permite el uso de esta α -galactosidasa en diferentes aplicaciones industriales o la optimización de las ya existentes (Fernández-Leiro, 2011).

En el presente trabajo se intentará comprobar la eficacia de la utilización de un medio barato como son las melazas de remolacha azucarera y de azúcar de caña, subproductos de la industria azucarera, para la producción de proteínas de interés industrial.

2. Objetivos

Los principales objetivos de este trabajo fueron:

1. Construcción de una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* productora de α -galactosidasa de *S. cerevisiae*.
2. Evaluación de la melaza de caña y la melaza de remolacha, subproductos de la industria azucarera, con y sin suplementos, como medios de cultivos adecuados para el crecimiento de la levadura recombinante.
3. Estudio mediante métodos estadísticos de las condiciones que maximizan la producción intracelular y extracelular de la enzima α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* creciendo en un medio con melazas.

3. Material y Métodos

Los experimentos realizados en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de A Coruña, precisaron el uso de diferentes técnicas, cepas microbianas así como materiales y medios de cultivo a lo largo de los mismos.

Durante el ensayo se prepararon las cepas para la introducción del plásmido en estas, primero mediante una transformación bacteriana para la replicación y amplificación del plásmido de interés y posteriormente una transformación en levaduras, lo que nos permitiría completar una mitad imprescindible para el inicio del estudio como tal. La otra parte corresponde a la preparación de los medios, en función de la melaza de procedencia así como las concentraciones específicas de azúcar, eligiendo en cuál de ellos había un mejor crecimiento microbiano y por tanto una producción mayor de enzima dado que la producción de enzimas está ligada al crecimiento. Por último, basándonos en todo momento en los resultados que se fueron obteniendo durante la

investigación, se elaboró un plan factorial en donde utilizando diferentes variables se estudió la influencia de estas variables en la obtención de la α -galactosidasa tanto intracelular como extracelular.

3.1 Material biológico

El estudio precisó de material biológico de distinta índole como fueron microorganismos (bacterias y levaduras) y plásmidos. Debido a la complejidad en la obtención de estos materiales, es importante señalar que se partió de preparaciones purificadas.

3.1.1 Cepas

La cepa de *Escherichia coli* XL1BLUE {*recA1 endA1 gyrA96 thi-1hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]*} (Stratagene®) se empleó para la propagación y amplificación de los plásmidos. Se trata de una cepa ampliamente utilizada en los laboratorios de biología molecular debido a que tiene mutaciones artificiales que la hacen apropiada para el trabajo con plásmidos, permitiendo al mismo tiempo la selección de recombinantes por alfa complementación (Sambrook *et al.*, 1989). Las bacterias transformadas con el plásmido se conservaron a 4°C en placas de Petri con medio de cultivo LB suplementado con ampicilina, permitiendo así la selección de las colonias transformadas.

La cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 [*pep4:: HIS3, prb-_1.6R HIS3, lys2-208, trp1-_101, ura 3-52, gal2, can1*] (Eastman Kodak Company) fue utilizada para la expresión de la proteína de interés. Es de destacar que esta cepa carece de actividad α -galactosidasa. Se trata de un microorganismo eucariótico que comparte con las bacterias la simplicidad y rapidez de crecimiento. Además, al ser un organismo unicelular permite aplicar con relativa facilidad métodos de genética, bioquímica y nuevas tecnologías moleculares.

3.1.2 Plásmido

El plásmido empleado, YEpMEL1His, fue construido por Fernández-Leiro (Fernández-Leiro *et al.*, 2010), el cual estaba disponible en el laboratorio. El vector de expresión en levaduras YEpFlag-1 [*ampr ori 2 μ FLAG TRPI*], (Eastman Kodak Company) fue

empleado como método de clonación para la producción del plásmido YEpMEL1His (Figura 1).

La introducción del gen *MEL1* se realizó mediante recombinación homóloga, incluyéndose una secuencia de histidinas en su extremo carboxilo terminal, lo cual facilitaría su posterior purificación (Fernández-Leiro *et al.*, 2010). Además, se realizaron otras modificaciones en dicho plásmido, permitiendo la construcción de YEpMEL1His.

Este plásmido presenta el promotor de la alcohol deshidrogenasa (*ADH2*), reprimido por glucosa, el terminador transcripcional *CYC1*, la región 2 micrón (2μ) para la replicación en *Saccharomyces cerevisiae*, el marcador de selección *TRP1* para la selección, un origen de replicación bacteriano (*ori*) y el gen de resistencia a la ampicilina (*Amp^r*) para la selección en bacterias (Álvarez-Cao, 2014; Fernández-Leiro, 2010).

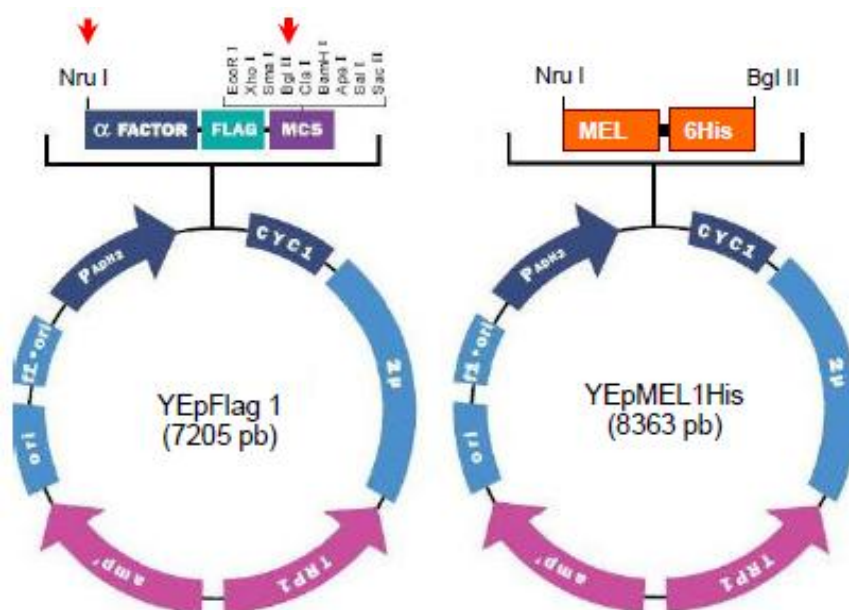


Figura 1. YEpFlag-1 y YEpMEL1His. Construcción para la expresión de la α -galactosidasa (Fernández-Leiro, 2010)

3.2 Medios y condiciones de cultivo

Los medios empleados eran destinados principalmente para las levaduras, si bien es cierto, en un primer paso se precisó de medios específicos para la resuspensión y posterior siembra de bacterias transformadas en medio LB (Luria-Bertani) suplementado con 40 mg/L de ampicilina (Tablas 1 y 2). La ampicilina se añade después de ser autoclavado el medio para evitar su degradación. Se parte de una

solución madre de ampicilina preparada con agua destilada estéril y conservada en alícuotas a una temperatura de -20°C. Este medio resulta ser selectivo para las bacterias transformadas, ya que en el plásmido se encuentra un gen de resistencia al antibiótico (*Amp^r*) que codifica para una enzima que hidroliza parte del antibiótico por lo que se evita su efecto tóxico sobre la pared bacteriana.

Tabla 1. Luria-Bertani (LB)	
Bactotripton	1%
Extracto de levaduras	0,5%
NaCl	0,5%
D-glucosa	0,1%

Tabla 2. Luria-Bertani + Ampicilina	
Bactotripton	1%
Extracto de levaduras	0,5%
NaCl	0,5%
D-glucosa	0,1%
Ampicilina	40µg/ml

El cultivo de levaduras requiere un paso previo en el que se elabora un preinóculo en medio CM-TRP (Medio Completo sin Triptófano), ya que la cepa es auxótrofa para el triptófano mientras que el vector utilizado tiene un marcador de selección frente a este aminoácido (Tablas 3 a 7). Este medio fue repartido en matraces *Erlenmeyer* de 50 ml en relación de volumen 1:5, autoclavado e inoculado en condiciones de esterilidad tras haberse atemperado, mientras que su cultivo se realizó en estufas a 30°C y con agitación de 250rpm. En el momento de la realización del inóculo, se medía la densidad celular (OD_{600}), inoculándose la cantidad necesaria para tener una $OD_i = 0,5$.

Tabla 3. Medio Completo sin Triptófano (CM-TRP)		para 1L
Dextrosa		20g
Mezcla de aminoácidos 200x		5ml
YNB		67 ml
Histidina		40 mg
Leucina		40mg
Uracilo		40mg
Adenina		40mg
Tirosina		40mg

Tabla 4. Mezcla de aminoácidos 200x		para 1L
Arginina		2 g
Metionina		2 g
Treonina		2 g
Isoleucina		2 g
Fenilalanina		2 g
Lisina		8 g

Tabla 5. YNB	para 1L
Mezcla de vitaminas 300x	50 ml
Sales traza 150x	100 ml
Sulfato amónico	75 g
KH ₂ PO ₄	15 g
MgSO ₄	7,5 g
NaCl	1,5 g
CaCl ₂	1,5 g

El YNB (Tabla 5) se añade después de ser autoclavado, a una temperatura menor de 60°C y en condiciones de esterilidad.

Tabla 6. Mezcla de vitaminas 300x	para 1L
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

Tabla 7. Sales traza 150x	para 1L
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

El medio YPHSM modificado (Bactopeptona 8%; Extracto de Levadura 1%; Glucosa 1,5% y Glicerol 3%) está indicado para mejorar la estabilidad de las proteínas expresadas en levaduras, además, destaca por el alto contenido en nutrientes, lo cual facilita la producción de grandes cantidades de proteína. Este medio se empleó como control en los primeros experimentos para la selección del medio de cultivo adecuado. El cultivo en este medio control se realizó en matraces *Erlenmeyer* de 50 ml en relación

de volumen 1:5. Fue autoclavado e inoculado en condiciones de esterilidad tras haberse atemperado el medio, finalmente el cultivo en este medio se llevó a cabo en estufas a 30°C en agitación de 250rpm.

En los experimentos de selección del medio de cultivo óptimo para el crecimiento celular se tuvieron en cuenta varios aspectos. En primer lugar, el porcentaje de azúcares no debía ser elevado puesto que, como se explicó previamente, el plásmido contiene un promotor que es reprimido en presencia de glucosa, por ello se eligió un porcentaje de azúcares del 1,5% como el adecuado ya que es el que presenta el medio YPHSM que es el recomendado para la producción de proteínas recombinantes por el sistema de expresión YEpFlag-1. Por otra parte, en el experimento se contó en todo momento con dos tipos de melazas, de caña y de remolacha, comparándose en ambos casos y realizándose la suplementación correspondiente con extracto de levaduras (1%), sales [(NH₄)₂SO₄ 1 g/L, MgSO₄+7H₂O 0.5 g/L y KH₂PO₄ 1 g/L] o extracto de levadura y sales en la proporción de la tabla (Tabla 8).

Tanto la melaza de caña de azúcar como la de remolacha proceden de la empresa AB Azucarera Iberia (antigua Azucarera Ebro). La melaza de caña de azúcar proviene de la planta que tienen en Zamora y la de remolacha azucarera de la planta de Cádiz.

Tabla 8. Esquema selección de medio de cultivo: tipo de melaza y suplemento

Componente principal	Suplemento
Control (YPHSM)	
Melaza (1,5% Azúcares totales)	
Melaza (1,5% Azúcares totales)	Extracto de levadura (1%)
Melaza (1,5% Azúcares totales)	Sales (1x)
Melaza (1,5% Azúcares totales)	Extracto de levadura (1%)+Sales (1x)

En el plan factorial se pretendían analizar distintas variables y ver en qué condiciones se producía una elevada producción de α -galactosidasa. De esta forma los medios preparados se llevaron a cabo de la siguiente forma (Tabla 9):

Tabla 9. Estructura cultivos plan factorial

Matraz (n°) [100ml]	YE [%]	Azúcar [%]	V/V	Amp [1µg/ml]
Control (4; A, B, C, D)	1	1,5	1/5	20µl
1 (1)	0,5	1	1/3	33µl
2 (1)	0,5	2	1/3	33µl
3 (1)	0,5	1	1/10	10µl
4 (1)	0,5	2	1/10	10µl
5 (1)	1,5	1	1/3	33µl
6 (1)	1,5	2	1/3	33µl
7 (1)	1,5	1	1/10	10µl
8 (1)	1,5	2	1/10	10µl

Estos medios fueron repartidos en matraces *Erlenmeyer* de 100 ml en relación de volúmenes establecidos. Tras añadir la cantidad correspondiente en cada matraz, se autoclavan y posteriormente se añade la ampicilina y se inoculan en condiciones de esterilidad tras haberse atemperado el medio. El cultivo de estas levaduras se llevó a cabo en estufas a 30°C en agitación de 250rpm.

3.3 Técnicas de Biología Molecular

3.3.1 Transformación en bacterias

La transformación de las células de *E. coli XL1Blue* se llevó a cabo a partir de 100 µl de células competentes recién descongeladas, cuya competencia se indujo previamente mediante la técnica de Kushner (Kushner, 1978). Se incubaron 5 minutos dichas alícuotas en hielo. Posteriormente se añadieron 50 ng del vector de interés, manteniendo esta mezcla en hielo durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se produjo el choque térmico como tal, incubando la muestra primero a 42°C durante 90 segundos y seguidamente se pasaron a hielo durante 2 minutos. Posteriormente se añadió 1 ml de medio LB y se dejó recuperar las células durante 5 minutos a 37°C. Finalmente se sembraron en placas con medio selectivo LB suplementado con ampicilina y se incubaron durante 24 horas a 37°C (Sambrook *et al.*, 1989).

3.3.2 Extracción del ADN plasmídico

El proceso de obtención de ADN plasmídico a pequeña escala se basó en el método de la lisis alcalina modificado, con el cual se consigue el aislamiento del plásmido previo paso a la transformación de las levaduras (Sambrook *et al.* 1989).

Partiendo del cultivo celular preparado con anterioridad en medio LBA a 37°C y en agitación de 250 rpm, se tomaron 2-5 ml de cultivo y se centrifugaron durante 3 minutos a 8000 rpm. Se resuspendió el *pellet* en 150µl de solución I (Tabla 10) preparada con anterioridad y conservada en frío. Posteriormente se añadieron 200 µl de solución II (Tabla 11) preparada en el momento y se mezcló por inversión 6 veces. Acto seguido se añadieron 300 µl de solución III (Tabla 12) mezclando suavemente y manteniéndose en hielo durante 5 minutos. Tras cumplirse este tiempo de incubación se centrifugó la muestra a 13.000 rpm durante otros cinco minutos, recuperando el sobrenadante. El sobrenadante se resuspendió con 1 ml de etanol (95°) se mezcló por inversión y se dejó en hielo durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos, quedándonos con el precipitado blanco y eliminando el sobrenadante. Se repite la operación con etanol de 70°, eliminando el sobrenadante y secando el *pellet*. Este *pellet* se resuspende en 20-30 µl de agua bidestilada estéril. El ADN obtenido se empleó para transformar directamente las levaduras.

Tabla 10. Solución I	para 10 ml
Tris-HCl (pH 8.0/1M)	0,25 ml
EDTA (0,5M)	0,20 ml
Glucosa (20%)	0,45 ml
Agua destilada estéril	9,10 ml

Tabla 11. Solución II	para 10 ml
NaOH (0,2 N)	9,5 ml
SDS (20%)	0,50 ml

Tabla 12. Solución III	para 100 ml
Acetato potásico (pH 4.8/5M)	60 ml
Ácido acético glacial	11,5 ml
Agua destilada estéril	28,5 ml

3.3.3 Cuantificación del ADN

El ADN que se obtuvo previamente debió ser cuantificado, siendo analizado mediante técnicas de absorbancia con longitudes de onda de 260 nm. Las muestras fueron diluidas en proporción 1:10 para que el *NANODROP* (*Biospectrometer* de *Eppendorf*) pudiera identificarlas. De esta forma se determinó una concentración de 918,1 ng/μl en el caso del YEpMEL1His.

3.3.4 Transformación en levaduras

La introducción del ADN recombinante en la levadura *S. cerevisiae* fue realizado mediante el protocolo de transformación de levaduras “*One Step*” manteniendo la esterilidad (Chen *et al.*, 1992).

Según este procedimiento, se inoculó una colonia de la cepa *S. cerevisiae* BJ3505 en YPD y se incubó a 30° y 250 rpm durante 24 horas hasta alcanzar la fase estacionaria. Transcurrido ese tiempo, 250 μl de cultivo fueron precipitados mediante centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm. El sedimento se resuspendió con un volumen de 100 μl de la solución “*One step*” (0.2 M Acetato de Litio, 40% PEG 3350 y 100 mM Ditiotreitól) y se mezcló con el *vortex*. Posteriormente se añadieron entre 50 ng y 1 μg del plásmido de interés y 5 μl de ADN de esperma de salmón sonicado. La mezcla se homogenizó y se incubó a 45°C durante 30 minutos, posteriormente se sembró en placas en medio selectivo CM-TRP (medio CM-TRP suplementado con 1.5% de agar bacteriológico para producir un medio sólido en placa *Petri*) e incubó durante 3 días en estufa a 30°C.

3.3.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La integridad del ADN plasmídico se determinó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa, consiguiendo la separación del material genético en función del tamaño molecular (Sambrook *et al.*, 1989). Se preparó un gel de agarosa al 0,7% en tampón Tris-EDTA-Acetato (Tris 0.04 M, EDTA 1 mM, acetato sódico 20 mM, ácido acético 3 mM). En dicho gel se cargaron 2 muestras: un marcador y el plásmido YEpMEL1His. El marcador presenta un patrón de bandas de concentración conocida que permitió determinar la concentración de las muestras, la preparación de este marcador se llevó a cabo con 3 μl de marcador (*Generuler* 1kb) adicionándole 1 μl de *SYBR Green* y 1 μl de tampón de carga (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xilencianol y 30% de glicerol

en 1xTE: Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y EDTA 1 mM). Las muestras plasmídicas se prepararon con 1 µl de alícuota, 1 µl de *SYBR Green* y 3 µl de tampón de carga. Una vez preparadas las alícuotas, se cargaron en el gel y se dejó correr durante 45-60 minutos a 65 V.

En nuestro caso se empleó *SYBR Green* como compuesto fluorescente, el cual se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos y permite detectarlos cuando se ilumina la muestra con luz ultravioleta. La visualización del gel se realizó gracias al transiluminador Molecular Imager Gel Doc XR+ (BioRad).

3.4 Técnicas analíticas

3.4.1 Determinación de azúcares por la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)

La determinación de azúcares por medio de la técnica del DNS es una técnica rápida y reproducible, que permite un análisis colorimétrico, gracias a la capacidad de este ácido para oxidar los azúcares, al reaccionar con los aldehídos de los azúcares monoméricos aportando color a la muestra que puede ser analizada por el espectrofotómetro.

El análisis de los azúcares se llevó a cabo mediante dos procedimientos similares pero con una ligera variación que nos permitió conocer así, los azúcares no reductores y los azúcares reductores. Además se realizó una recta patrón de glucosa con la que se compararon los resultados obtenidos (Miller, 1959).

3.4.1.1 Recta patrón

La recta patrón permite relacionar los datos obtenidos con datos conocidos, pudiendo así hacer una estimación de la concentración de azúcares de uno y otro tipo en las melazas. Para ello empleamos glucosa a diferentes concentraciones. En primer lugar se hizo una muestra *stock* de 10 ml con una concentración de 5 mg/ml pesándose 50 mg de glucosa y añadiéndose agua destilada estéril hasta completar un volumen de 10 ml. Posteriormente se procedió a elaborar las muestras con las concentraciones deseadas (en el estudio: 0; 0,25; 0,5; 1; 1,25; 1,5 y 2 mg/ml). Se tomaron 100 µl de cada muestra y se les añadió 100 µl de solución de DNS (Tabla 13), los cuales tras ser mezclados se incubaron durante 5 minutos a 95°C y posteriormente 5 minutos en hielo (0°C). Finalmente se añadió 1 ml de agua destilada, se mezcló y se pusieron 200 µl en una

placa de microtitulación de 96 pocillos para medir la absorbancia a 540 nm en el lector de placas *Sinergy HI Hybrid Reader* de *Biotek*.

Tabla 13. DNS	para 100 ml
NaOH (2M)	1,6 g en 20 ml de agua destilada
Ácido Dinitrosalicílico	1 g en 20 ml de NaOH
Tartrato sódico potásico	30 g en 50 ml de agua destilada
Agua destilada estéril	10 ml (hasta enrasar)

3.4.1.2 Azúcares reductores

La medida de los azúcares reductores es diferente a la de los azúcares no reductores ya que son capaces de reaccionar por si solos y junto con el DNS pueden ser cuantificados a una longitud de onda de 540 nm.

Para ello se prepararon dos tipos de muestras, por un lado los blancos en donde se mezclaron 100 µl de H₂O con 100 µl de solución de DNS, y por el otro las muestras a analizar, empleando 100 µl de la alícuota y 100 µl de solución de DNS. En ambos casos el procesamiento fue el mismo, se incubaron en calefactores a 95°C durante 5 minutos y en hielo (0°C) durante el mismo periodo de tiempo. Transcurridos los minutos se añadió 1 ml de agua destilada en cada una de las muestras, para tras mezclarlas, analizar 200 µl en el lector de placas a 540 nm.

3.4.1.3 Azúcares no reductores

Los azúcares no reductores son muy abundantes en las melazas, concretamente existen altas concentraciones de sacarosa, la cual para poder analizar por el método del ácido dinitrosalicílico debemos hidrolizar mediante la adición de ácido clorhídrico al 18%. Posteriormente debe realizarse una neutralización de los ácidos, debido a que hemos aumentado la concentración de estos y es necesario neutralizar la mezcla, añadiendo NaOH al 25%.

El procedimiento es similar al de los azúcares reductores. Debemos realizar dos tipos de preparaciones, los blancos y las muestras. Se tomaron 50 µl de H₂O en el caso de los blancos y de alícuota en el caso de las muestras y se añadieron 50 µl de HCl, los cuales tras mezclarse correctamente se incubaron durante 10 minutos a 95°C. Transcurrido ese periodo de tiempo se añadieron otros 50 µl de NaOH para neutralizar el ácido y se mezcló bien antes de continuar con el protocolo. Seguidamente se añadieron 150 µl de

solución de DNS en todos los tubos y se incubaron primero a 95°C durante 5 minutos y posteriormente 5 minutos en hielo (0°). Tras este periodo de tiempo se añadió 1 ml de H₂O, se mezcló y se cogieron 200 µl para su lectura a 540 nm.

3.5 Determinación de la actividad enzimática α -galactosidasa

Este análisis se realizó por medio del método del p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (α PNPG) (Ryan *et al.*, 1998), un compuesto incoloro que tras su hidrólisis debido al cambio de pH producido al parar la reacción enzimática, adquiere un color amarillo cuantificable por un espectrofotómetro y proporcional a la cantidad de sustrato liberado (Álvarez-Cao, 2014).

Para llevar a cabo las medidas de actividad tendremos una doble vertiente, por un lado analizaremos el sobrenadante para ver la cantidad de enzima secretada y determinar así la actividad α -galactosidasa extracelular y por otra parte se estudiara la enzima que permanece en el interior celular (actividad α -galactosidasa intracelular), para ello las muestras serán centrifugadas a 5000 rpm separando el *pellet* del sobrenadante.

El sobrenadante requiere un tratamiento relativamente sencillo en el que se incuba la muestra (150 µl) e igual cantidad de sustrato: PNPG 7 mM en tampón de reacción (Tabla 14) por separado durante 10 minutos a una temperatura de 40°C. Posteriormente se unen ambos componentes, iniciándose en este momento el tiempo de reacción (T₀). Tras dar comienzo a la reacción, se toman muestras (100 µl) en los minutos 2 y 4 parándose inmediatamente dicha reacción añadiendo 100 µl de la solución de *STOP* (Tabla 15). Posteriormente se determina la absorbancia a 400 nm en un lector de microplacas.

Tabla 14. Tampón de reacción α -Gal *pH 4*

Na₂HPO₄ (77 mM)

Ácido cítrico (61 mM)

Tabla 15. STOP Buffer

para 10 ml

Na₂CO₃ (1 M)

1 g

Agua destilada estéril

Hasta enrasar a 10 ml

Para la determinación de la actividad intracelular se requiere un proceso algo más complejo puesto que se deben lavar correctamente las células con 500 μl de α -Gal Activity Buffer (Tabla 16), resuspendiendo la muestra y centrifugándola de nuevo a 5000 rpm durante 5 minutos. Tras este paso se descarta el sobrenadante y se vuelve a resuspender con 400 μl α -Gal Activity Buffer. En este punto debemos permeabilizar las células por lo que se añaden 11 μl de cloroformo y 17,5 μl de SDS (0,1%) homogeneizando la muestra mediante un golpe de *vortex* durante 20 segundos. A partir de este momento el proceso es similar al tratamiento dado al sobrenadante, se incuba la muestra (150 μl) y el sustrato (150 μl) por separado durante 10 minutos a una temperatura de 40°C. Se mezclan ambos componentes y tras dar comienzo a la reacción, se tomarán muestras (100 μl) en los minutos 2 y 4 parándose inmediatamente dicha reacción mediante la solución de STOP (100 μl). En este caso, puesto que aún no nos deshicimos de los restos celulares, debemos centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos para eliminarlos. Después se analiza la absorbancia del sobrenadante obtenido en el lector de microplacas a una longitud de onda de 400 nm.

Tabla 16. α -Gal Activity Buffer pH 7.4

Tris-HCl (50 mM)

NaCl (150 mM)

La actividad enzimática de la α -galactosidasa se expresó en unidades enzimáticas por mililitro, definiéndose dicha unidad como la cantidad de enzima que libera un μmol de *p*-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo. La cuantificación se llevó a cabo mediante una ecuación derivada de la ley de *Lambert-Beer*:

$$Act. Enz = \frac{\Delta Abs_{400}}{\Delta T^a \times \epsilon \times V} \times Vr \times FD$$

En donde:

- $\Delta Abs_{400}/\Delta T^a$ es el incremento de absorbancia por unidad de tiempo.
- ϵ es el coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol a 400 nm ($18200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).
- V es el volumen de muestra (ml).
- Vr es el volumen total de la reacción (ml).
- FD es el factor de dilución aplicado a la muestra para realizar la medida.

3.6 Otras técnicas

3.6.1 Medida de la densidad celular

El análisis se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Para ello 1 ml de muestra se introdujo en una cubeta, se agitó y se realizó la medida de absorbancia rápidamente, dado que las levaduras sedimentan con facilidad.

3.6.2 Medida de pH

La medición del pH se realizó en un pH-metro marca *Crison*. Previamente a su uso, el pH-metro debió ser calibrado con las soluciones de referencia pH 4 y pH 7 siguiendo las instrucciones del aparato. La medida del pH se realizó a lo largo del cultivo, para ello se recogieron 2 ml de muestra, se centrifugó y se determinó el pH del sobrenadante.

3.7 Método y análisis estadístico

Se diseñó un plan factorial completo para estudiar la influencia combinada de tres variables sobre la producción de α -galactosidasa de *S. cerevisiae* en medios con melazas. Los datos estadísticos fueron analizados con la ayuda del programa informático *StatGraphics Plus* para *Windows* (*Statistical Graphics Corporation*) versión 5.1. La significancia estadística de las diferencias entre medias fue determinada mediante el *test t* de Student realizado con el mismo *software*. Aquellos valores con un $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

4. Resultados y discusión

4.1. Construcción de una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* productora de α -galactosidasa de *S. cerevisiae*.

Para realizar este primer objetivo se procedió a amplificar el plásmido YEpMEL1His (Fernández-Leiro *et al.*, 2010), disponible en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UDC, en células de *E. coli XL1Blue*, para lo cual previamente se transformaron estas células mediante el método descrito en materiales y métodos. Tras la transformación de las bacterias se produjo su crecimiento en el medio LBA y se procedió a su extracción mediante el método de la lisis alcalina. Se verificó la integridad

del plásmido mediante un gel de electroforesis y se determinó su concentración espectrofotométricamente.

Una vez obtenido el plásmido en suficiente cantidad se procedió a transformar la cepa de *S. cerevisiae* BJ3505, carente de actividad α -galactosidasa, mediante el método “*One Step*” (Chen *et al.*, 1992). Sembrando los transformantes obtenidos en placas CM-Trp. Como resultado de la transformación se obtuvieron varios candidatos. A todos los candidatos obtenidos se les determinó la actividad α -galactosidasa tanto intracelular como extracelularmente y se quedó con el candidato que presentaba una mayor actividad enzimática. Este candidato fue el que se utilizó para los experimentos posteriores.

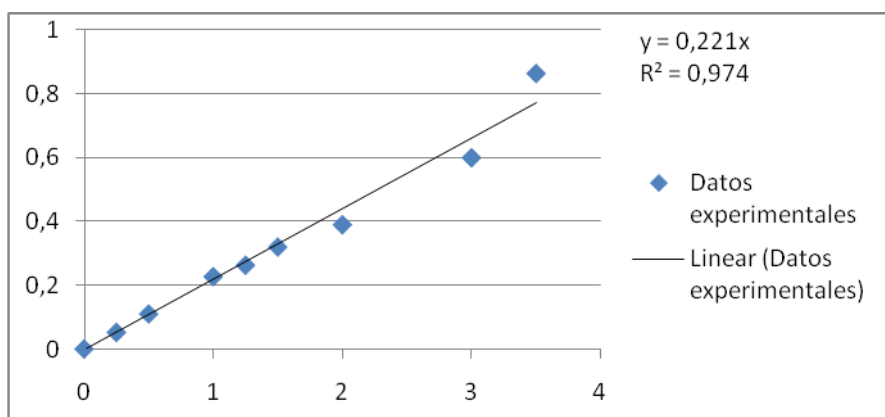
4.2. Evaluación de la melaza de caña y la melaza de remolacha como medios de cultivos adecuados para el crecimiento de la levadura recombinante.

4.2.1. Análisis de azúcares presentes en las melazas

Para evaluar las melazas de caña y remolacha como medios de cultivo, se hizo necesario inicialmente determinar la cantidad de azúcares presentes en cada tipo de melaza.

La determinación de azúcares totales en las melazas fue realizada por la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) en donde los datos se compararon con la recta patrón (Gráfica 1) obteniéndose que el *stock* del que partíamos en el caso de la melaza de remolacha contenía un 34% de azúcares totales y la melaza de caña estaba formada por un 37% de azúcares totales. Esto nos permitió calcular la cantidad de melaza que debemos emplear en los medios de cultivo para tener un porcentaje de azúcares del (1,5%), similar al medio de cultivo YPHSM que se utilizó como control dado que es un medio rico, diseñado para la producción de proteínas heterólogas con el sistema de expresión del YEpFlag-1.

A pesar de que las melazas suelen tener sacarosa como componente mayoritario de sus azúcares, los análisis de estas melazas revelaron una composición mayoritaria de azúcares reductores.



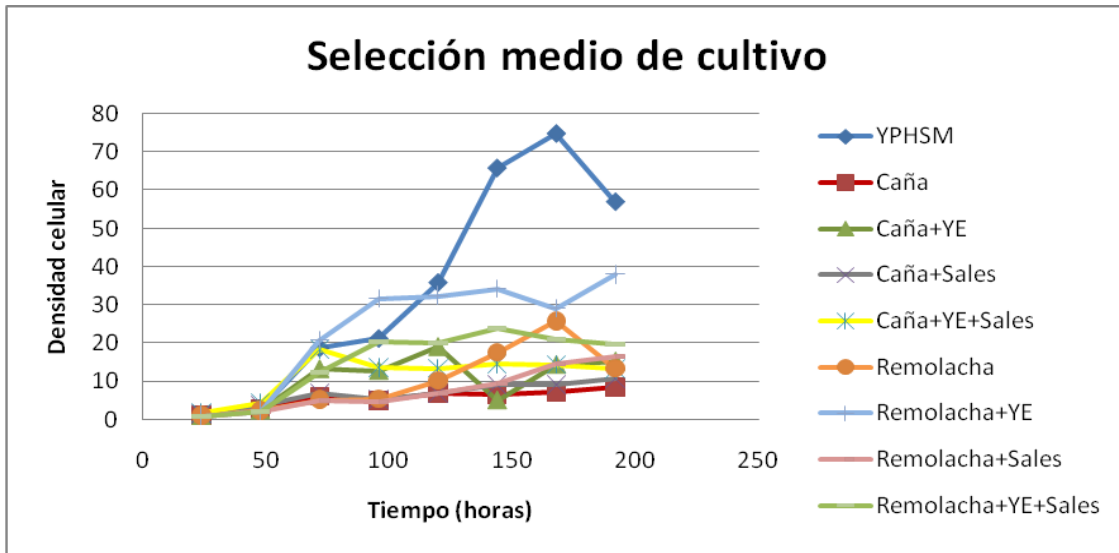
Gráfica 1. Recta patrón de glucosa para la determinación de azúcares totales.

4.2.2 Evaluación de las melazas como medio de cultivo

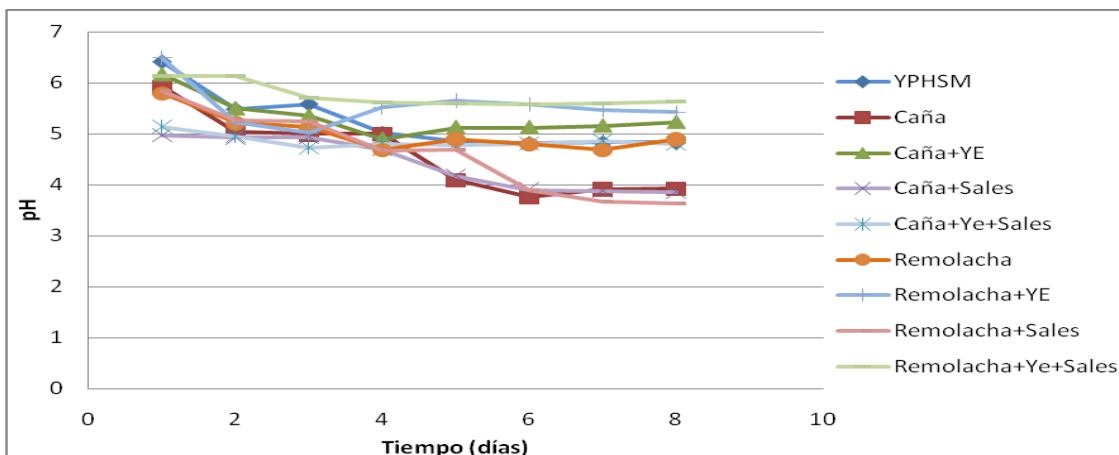
Para evaluar las melazas como medio de cultivo se diluyeron al 1.5% de azúcares totales para comparar el crecimiento de la cepa BJ3505/YEpMEL1His en melazas con respecto al medio recomendado YPHSM. Se analizó además el crecimiento en medios con melazas suplementadas con extracto de levadura al 1% (presente también en el YPHSM) y/o sales puesto que las melazas son deficientes en sales nitrogenadas (Gulshan, 2014; Schneider, 1971; Ergun & Mutlu, 1999). Estos medios fueron repartidos en matraces *Erlenmeyer* de 50 ml en relación de volumen 1:5. Posteriormente fueron autoclavados e inoculados en condiciones de esterilidad tras haberse atemperado el medio. El cultivo de estas levaduras se llevó a cabo en estufas a 30°C en agitación de 250rpm. La recogida de muestras se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, tomándose 2 ml de cada matraz, depositándose en tubos estériles a partir de los cuales se analizaría el pH y densidad celular. Las muestras fueron tomadas a diferentes tiempos a lo largo del cultivo.

En la Gráfica 2 se recogen los datos de absorbancia a 600 nm de los diferentes cultivos ensayados. Se puede observar que el medio de referencia, YPHSM, es el que experimenta un mayor crecimiento de la levadura transformada, seguido por la melaza de remolacha suplementada con extracto de levadura al 1%. Es de destacar que, aunque todos los cultivos fueron inoculados a la misma absorbancia inicial utilizando el mismo preinóculo es precisamente en el medio con melaza de remolacha suplementado con extracto de levadura el que experimenta una mayor absorbancia a las 100 horas iniciales del cultivo para posteriormente situarse el YPHSM como el medio en el que se alcanza una mayor absorbancia.

El crecimiento celular implica ciertas variaciones de pH en función del consumo de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, por lo que resulta determinante la utilización de un medio de cultivo cuyo pH resulte lo más estable posible a lo largo del tiempo, y que no descienda por debajo de 4.0 en el caso de las levaduras puesto que su crecimiento se ve reducido. (Durán *et al.*, 2003). Como se puede apreciar en la Gráfica 3, relacionada con la evolución del pH a lo largo del tiempo, la remolacha aporta la estabilidad de pH necesaria para un cultivo prolongado, manteniendo valores de pH superiores a 5 después de 8 días, por lo que refuerza la elección del medio de cultivo de remolacha y extracto de levadura, obteniéndose unos valores mejores que el medio control, YPHSM.



Gráfica 2. Crecimiento de la levadura BJ3505/YEpMEL1His (OD_{600nm}) en melazas con y sin suplementos y en el medio de referencia YPHSM.



Gráfica 3. Evolución del pH a lo largo del cultivo.

Por tanto, se puede concluir que de todos los medios ensayados el que presenta un crecimiento más próximo al medio de referencia es la melaza de remolacha suplementada con extracto de levadura (Gráfica 2). Este medio es, además, uno de los que mantiene los valores de pH más estables a lo largo del cultivo (Gráfica 3). Por ese motivo, se tomó este medio de cultivo para la realización del plan factorial posterior.

4.3 Estudio mediante métodos estadísticos de las condiciones que maximizan la producción intracelular y extracelular de la enzima α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* creciendo en un medio con melazas.

El plan factorial pretende averiguar las condiciones que maximizan la producción de la α -galactosidasa extracelular (como se ha comentado en la introducción el gen *MEL1* codifica para la α -galactosidasa de *S. cerevisiae* que presenta en su extremo amino terminal un péptido señal que dirige la proteína al medio extracelular) e intracelular producida por la levadura *S. cerevisiae* BJ3505 transformada en el plásmido YEpMEL1His creciendo en un medio con melaza de remolacha suplementada con extracto de levadura, así como sus interacciones sobre esta respuesta.

Se estudió, por tanto, la influencia de tres variables (% de extracto de levadura, concentración inicial de azúcar y aireación) y sus interacciones sobre la respuesta (producción de α -galactosidasa extracelular o intracelular), 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 17. Los valores de aireación se corresponden con el cociente volumen del matraz (matraz Erlenmeyer de 100 ml de volumen) /volumen medio de cultivo (10, 20 o 33 ml para la relación 1/10, 1/5 y 1/3 respectivamente).

Tabla 17. Dominios experimentales de las variables y su codificación.			
Valor codificado	Valores naturales		
	Extracto levadura (E: %)	Azúcar inicial (A: %)	Aireación (V: v/v)
-1	0.5	1	1/10 = 0.1
0	1	1.5	1/5 = 0.2
+1	1.5	2	1/3 = 0.3

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, ΔV_n =incremento del valor natural correspondiente a un incremento unidad del valor codificado.

4.3.1 α -galactosidasa extracelular

El análisis estadístico empleado fue un ANOVA, cuyos valores están representados en la tabla siguiente (Tabla 18), la cual divide la variabilidad de la α -galactosidasa extracelular en distintos segmentos separados para cada uno de los efectos. En el caso que concierne, cinco de los efectos (Extracto de levadura, azúcar inicial, aireación, azúcar inicial y extracto de levadura, extracto de levadura y aireación) tienen *p-valores* inferiores a 0,05, por lo que son significativamente diferentes de cero al 95% de confianza.

Tabla 18. Análisis de la varianza.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{calculada}	Valor P
E: Extracto de levadura	0,002738	1	0,002738	85,56	0,0027
A: Azúcar inicial	0,0012005	1	0,0012005	37,52	0,0087
V: Aireación	0,0011045	1	0,001145	34,52	0,098
EA	0,001352	1	0,001352	42,25	0,0074
EV	0,000648	1	0,000648	20,25	0,0205
AV	0,0001125	1	0,0001125	3,52	0,1575 (NS)
EAV	0,000072	1	0,000072	2,25	0,2306 (NS)
Falta de ajuste	0,0000135	1	0,0000135	0,42	0,5623
Error Puro	0,000096	3	0,000032		
Total (Corr.)	0,007337	11			

NS = No significativo; R-cuadrado = 98,5076%; R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 95,8958%; Error estándar de est. = 0,00565685; Error absoluto de la media = 0,00208333; Estadístico Durbin-Watson = 1,90925 (P = 0,4272); Autocorrelación residual Lag 1 = -0,0953196

El efecto de la interacción porcentaje de azúcar inicial y aireación, y el efecto de la interacción de las tres variables: % de extracto de levadura, % de azúcar inicial y aireación no parecen presentar una influencia significativa en la respuesta por lo que en la siguiente tabla ANOVA (Tabla 19) se ha eliminado esos efectos.

Tabla 19. Análisis de la varianza tras eliminar coeficientes no significativos

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{calculada}	Valor P
E: Extracto de levadura	0,002738	1	0,002738	85,56	0,0027
A: Azúcar inicial	0,0012005	1	0,0012005	37,52	0,0087
V: Aireación	0,0011045	1	0,001145	34,52	0,098
EA	0,001352	1	0,001352	42,25	0,0074
EV	0,000648	1	0,000648	20,25	0,0205
Falta de ajuste	0,000198	3	0,000066	2,06	0,2836
Error Puro	0,000096	3	0,000032		
Total (Corr.)	0,007337	11			

R-cuadrado = 95,9929%; R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 92,6537%; Error estándar de est. = 0,00565685; Error absoluto de la media = 0,00408333; Estadístico Durbin-Watson = 2,06122 (P = 0,4743); Autocorrelación residual Lag 1 = -0,177721

El test de falta de ajuste está diseñado para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados, o si se debe usar un modelo más complicado. La prueba se ha realizado comparando la variabilidad de los modelos de residuos actuales con la variabilidad entre las observaciones en la situación replicada de los factores. Puesto que el p-valor para la falta de ajuste en la tabla ANOVA (Tabla 19) es mayor que 0,05 (0,2836) el modelo parece ser adecuado para los datos observados al 95,0% de nivel de confianza.

Además, el estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 95,9929% de la variabilidad en la α -galactosidasa extracelular; el estadístico R-cuadrado ajustado, el cual es más adecuado para la comparación de números diferentes de variables independientes, es del 92,6537%. El error estándar de la estimación muestra la desviación normal de los residuos siendo de 0,00565685. El error absoluto de la media (MAE) de 0,00408333 es el promedio del valor de los residuos. El estadístico Durbin-Watson (DW), el cual examina los residuos para determinar si existe alguna correlación significativa basada en el orden en el que se suceden en el fichero de datos, puesto que el p-valor es superior a 0.05, no hay indicios de correlación de serie en los residuos.

El sistema es susceptible de definirse mediante la siguiente ecuación (cuya significación se comprobó por medio del *test* F de Fisher), siendo los valores de las variables especificados en sus unidades, en la cual únicamente se han eliminado aquellas interacciones no significativas que no presentan influencia significativa en la respuesta:

$$\alpha\text{G extracelular} = 0,0435 + 0,0185 E + 0,01225 A + 0,01175 V + 0,013 EA + 0,009 EV$$

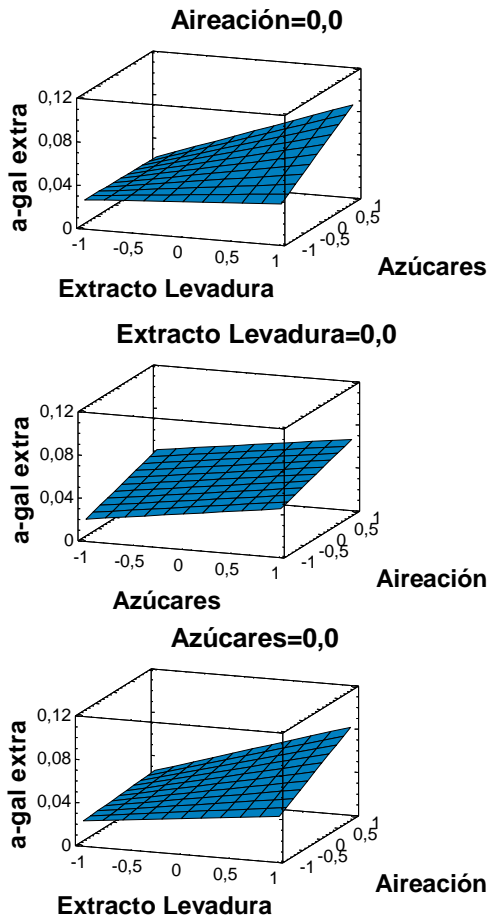
En la tabla 20 se muestra la matriz experimental, junto con los resultados obtenidos para la respuesta (la actividad α -galactosidasa extracelular resultante de un promedio de cinco medidas independientes a lo largo del tiempo), así como los resultados esperados según el modelo predicho y los residuos

Algunas de las superficies de respuesta más representativas correspondientes a la ecuación obtenida están representadas en la Gráfica 4. Estas superficies son planos definidos por pares de variables, fijando la tercera variable (valor 0).

Como se puede observar en la Gráfica 4, la respuesta aumenta en cada situación del dominio experimental cuando los niveles de extracto de levadura inicial, azúcares iniciales y aireación incrementan (coeficiente positivos). El valor más alto de la respuesta se obtiene en la esquina $E = +1, A = +1, V = +1$.

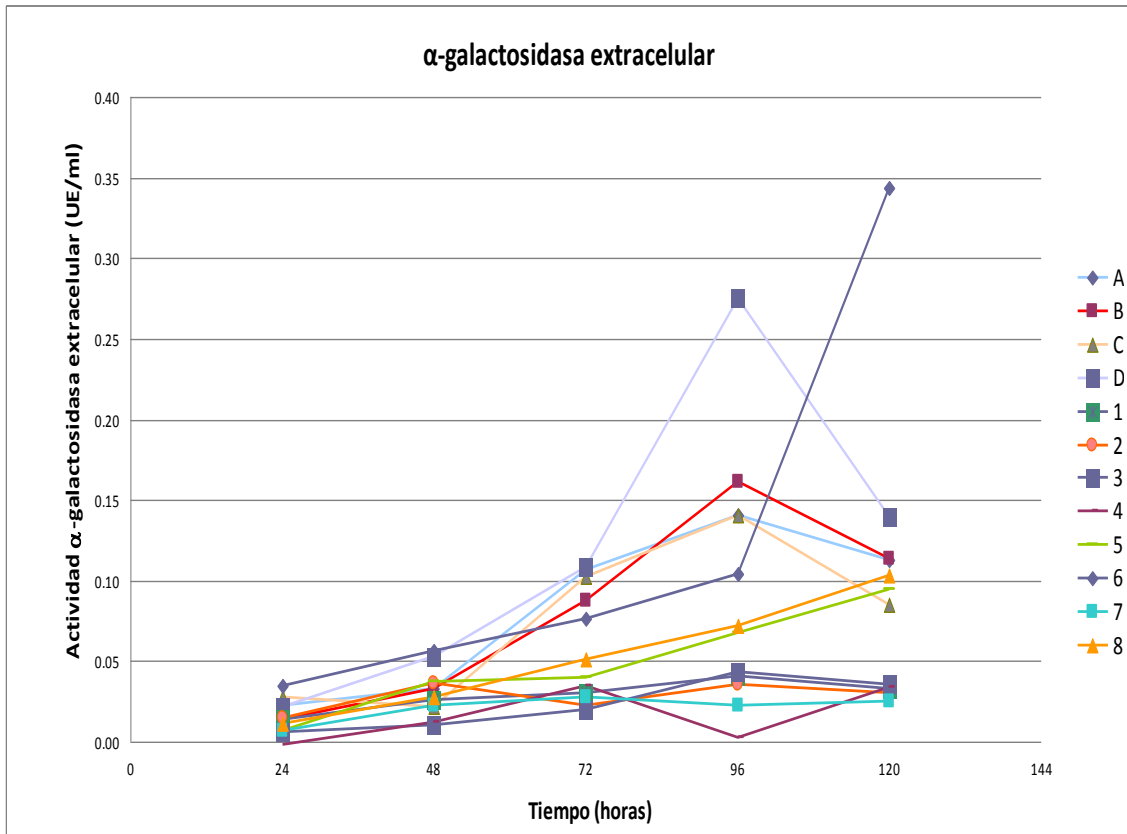
Tabla 20. Resultados experimentales del plan factorial completo (2^3) para el estudio de la producción de α -galactosidasa extracelular por la cepa BJ3505/YEpMEL1His en cultivos creciendo sobre melaza de remolacha suplementada con extracto de levadura. Variables de acuerdo con la tabla 17.

	E	A	V	$\alpha\text{G extracelular}$ observada (U.E./ml)	$\alpha\text{G esperada}$ (U.E./ml)	Residuos
1	-1	-1	1	0,027	0,0285	-0,0015
2	-1	1	1	0,027	0,027	0
3	-1	-1	-1	0,023	0,023	0
4	-1	1	-1	0,020	0,0215	-0,0015
5	1	-1	1	0,050	0,0575	-0,0075
6	1	1	1	0,114	0,108	0,006
7	1	-1	-1	0,022	0,016	0,006
8	1	1	-1	0,059	0,0665	-0,0075
A	0	0	0	0,049	0,0435	0,0055
B	0	0	0	0,045	0,0435	0,0015
C	0	0	0	0,049	0,0435	0,0055
D	0	0	0	0,037	0,0435	-0,0065



Gráfica 4. Superficies de respuesta obtenidas para el estudio de la producción de α -galactosidasa extracelular por la cepa BJ3505/YEpMEL1His en cultivos creciendo sobre melaza de remolacha suplementada con extracto de levadura de acuerdo con el plan experimental definido en la tabla 17. a-gal extra = U.E./ml de actividad α -galactosidasa extracelular. Los valores y nomenclatura de las variables pueden verse en la tabla 17.

En la Gráfica 5 se recoge la evolución de la actividad α -galactosidasa extracelular a lo largo del tiempo de los cultivos desarrollados en el plan factorial según las condiciones recogidas en la Tabla 20. Se puede observar que en la condición 6, correspondiente a los valores de $E = +1$, $A = +1$, $V = +1$ (cultivo sobre melaza de remolacha suplementada con extracto de levadura al 1.5%, azúcares iniciales al 2% y aireación 1/3) es precisamente la que alcanza los mayores valores de actividad enzimática α -galactosidasa extracelular.



Gráfica 5. Actividad enzimática α -galactosidasa extracelular a lo largo del tiempo de los cultivos desarrollados en el plan factorial. Los números de los cultivos y las letras A, B, C, D son cada una de las condiciones ensayadas recogidas en la Tabla 20.

4.3.2. α -galactosidasa intracelular

De igual manera para intentar averiguar las condiciones que maximizan la producción de α -galactosidasa intracelular por la levadura BJ3505/YEpMEL1His se estudió también la influencia de las mismas tres variables (% de extracto de levadura, concentración inicial de azúcar y aireación) 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 son los mismos que se recogen en la tabla 17.

En este caso en la tabla de ANOVA (Tabla 21) se observa que todos los efectos tienen los p-valores inferiores a 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza. Además dado que el p-valor para la falta de ajuste en la tabla ANOVA (Tabla 21) es mayor que 0,05, el modelo parece ser adecuado para los datos observados al 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 21. Análisis de la varianza.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{calculada}	Valor P
E: Extracto de levadura	0,601156	1	0,601156	518,98	0,0002
A: Azúcar inicial	0,0150511	1	0,0150511	12,99	0,0366
V: Aireación	0,153181	1	0,153181	132,24	0,0014
EA	0,0460561	1	0,0460561	39,76	0,0081
EV	0,137026	1	0,137026	118,30	0,0017
AV	0,0491411	1	0,0491411	42,42	0,0074
EAV	0,0523261	1	0,0523261	45,17	0,0067
Falta de ajuste	0,011572	1	0,011572	9,99	0,0508
Error Puro	0,003475	3	0,00115833		
Total (Corr.)	1,06898	11			

R-cuadrado = 98,5924%; R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 96,1291%; Error estándar de est. = 0,0340343; Error absoluto de la media = 0,0292778; Estadístico Durbin-Watson = 1,05362 (P = 0,1821); Autocorrelación residual Lag 1 = 0,452836

En este caso, el estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 98,5924% de la variabilidad en la α -galactosidasa intracelular y el estadístico R-cuadrado ajustado, es de 96,1291%.

El sistema, por tanto, es susceptible de definirse mediante la siguiente ecuación (cuya significación se comprobó por medio del *test* F de Fisher), siendo los valores de las variables especificados en sus unidades, en la cual están presentes todas las interacciones significativas que presentan influencia en la respuesta:

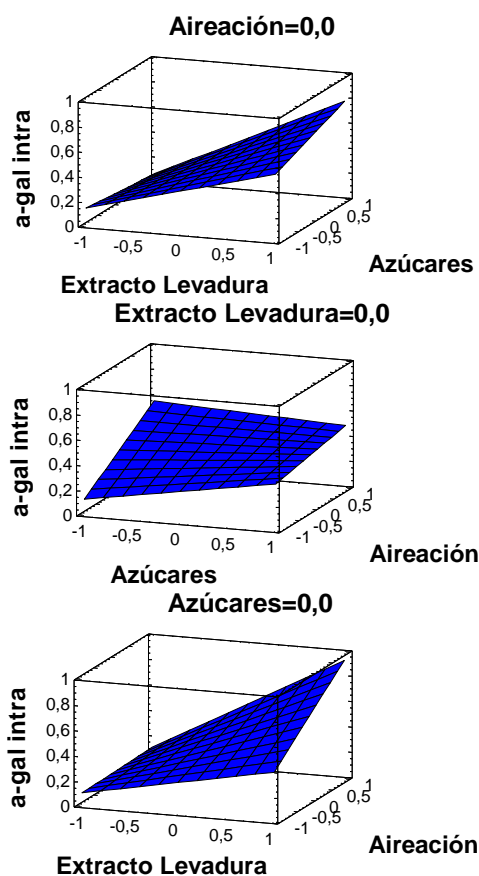
$$\alpha\text{G intracelular} = 0,388583 + 0,274125 \text{ E} + 0,043375 \text{ A} + 0,138375 \text{ V} + 0,075875 \text{ EA} + 0,130875 \text{ EV} - 0,078375 \text{ AV} - 0,080875 \text{ EAV}$$

En la Tabla 22 se muestra la matriz experimental, junto con los resultados obtenidos para la respuesta (actividad α -galactosidasa intracelular resultante de un promedio de cinco medidas independientes a lo largo del tiempo), así como los resultados esperados según el modelo predicho y los residuos.

Tabla 22. Resultados experimentales del plan factorial completo (2^3) para el estudio de la producción de α -galactosidasa intracelular por la cepa BJ3505/YEpMEL1His en cultivos creciendo sobre melaza de remolacha suplementada con extracto de levadura. Variables de acuerdo con la tabla 17.

	E	A	V	α G intracelular observada (U.E./ml)	α G esperada (U.E./ml)	Residuos
1	1	1	1	0,87	0,891958	-0,0219583
2	-1	1	1	0,07	0,0919583	-0,0219583
3	1	1	-1	0,65	0,671958	-0,0219583
4	-1	1	-1	0,05	0,0719583	-0,0219583
5	1	-1	1	0,95	0,971958	-0,0219583
6	-1	-1	1	0,13	0,151958	-0,0219583
7	1	-1	-1	0,093	0,114958	-0,0219583
8	-1	-1	-1	0,12	0,141958	-0,0219583
9	0	0	0	0,40	0,388583	0,0114167
10	0	0	0	0,42	0,388583	0,0314167
11	0	0	0	0,43	0,388583	0,0414167
12	0	0	0	0,48	0,388583	0,0914167

Algunas de las superficies de respuesta más representativas correspondientes a la ecuación obtenida están representadas en la Gráfica 6.



Gráfica 6. Superficies de respuesta obtenidas para el estudio de la producción de α -galactosidasa intracelular por la cepa BJ3505/YEpMEL1His en cultivos creciendo sobre melaza de remolacha suplementada con extracto de levadura de acuerdo con el plan experimental definido en la tabla 17. a-gal extra = U.E./ml de actividad α -galactosidasa intracelular. Los valores y nomenclatura de las variables pueden verse en la tabla 17.

En la anterior representación (Gráfica 6), podemos observar que la respuesta aumenta en cada situación del dominio experimental cuando los niveles de extracto de levadura inicial y la aireación incrementan (coeficientes positivos) y cuando los niveles de azúcares iniciales se reducen (coeficiente negativo). De esta forma, se obtiene el valor más alto de respuesta en la esquina $E = +1, A = -1, V = +1$.

4.4. Perspectivas.

En base a los resultados obtenidos podemos elaborar un marco donde encuadrar las perspectivas de futuro al comparar con otros estudios.

- Sería necesario evaluar la eficacia de la melaza de caña a largo plazo para otras cepas recombinantes produciendo otras enzimas heterólogas, puesto que otros experimentos denotan una buena rentabilidad en la expresión del producto de interés (Garzón & Lodoño, 2009). En este sentido se están desarrollando experimentos para evaluar la producción de otra enzima de interés, la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*, en melazas tanto de caña como de remolacha.
- Aunque inicialmente se planificaron experimentos para estudiar el consumo de azúcares a lo largo del tiempo y evaluar el % de azúcares que quedaban sin consumir tras la finalización del cultivo, por problemas de tiempo y de contaminación de uno de los sustratos no se han podido presentar en este momento pero están planificados estos estudios.
- Analizar la producción de proteína a largo plazo en el medio considerado como óptimo, puesto que en algunos de los medios estudiados la expresión máxima de la misma no se produce a las 96-120 horas (Álvarez-Cao, 2014) sino que continúa con una dinámica ascendente.
- Tratar de recuperar las levaduras utilizadas en el cultivo con el fin de elaborar una fuente de extracto de levadura económica y que sirva como suplemento de los medios a utilizar. Esto contribuiría al abaratamiento del medio de cultivo ya que se utilizaría la propia biomasa de levadura generada como suplemento a la melaza en cultivos posteriores.

- Sería interesante evaluar concentraciones de azúcares superiores a las utilizadas en este trabajo, teniendo en cuenta que para los plásmidos de expresión bajo promotores reprimidos por glucosa (como es el caso del YEpMEL1His con el promotor *ADH2*) un exceso de azúcares podría reducir la expresión proteica (Holeberg and Margalith, 1981; Thatipamala *et al.*, 1992) activando vías fermentadoras.

5. Conclusiones

De los resultados obtenidos nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- La cepa obtenida en este trabajo, *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 transformada con el plásmido YEpMEL1His, es capaz de sintetizar y secretar α -galactosidasa al medio extracelular
- La melaza de remolacha azucarera suplementada con extracto de levadura permite un crecimiento de la cepa BJ3505/YEpMEL1His a las 100 horas superior al medio control YPHSM. Así mismo permite mantener los niveles de pH por encima de 5 después de 8 días de cultivo.
- Las condiciones que maximizan la producción de α -galactosidasa extracelular por la cepa BJ3505/YEpMEL1His creciendo sobre melaza de remolacha son aquellas en las que la melaza se suplementa con extracto de levadura al 1.5%, los azúcares iniciales están al 2% y se mantiene una aireación v/v de 1/3 a lo largo del cultivo.
- Las condiciones que maximizan la producción de α -galactosidasa intracelular por la cepa BJ3505/YEpMEL1His creciendo sobre melaza de remolacha son aquellas en las que la melaza se suplementa con extracto de levadura al 1.5%, los azúcares iniciales están al 1% y se mantiene una aireación v/v de 1/3 a lo largo del cultivo.

6. Bibliografía

- ÁLVAREZ CAO, M.E. (2014). Caracterización y aplicación biotecnológica de la enzima α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo Fin de Máster. A Coruña: Universidad A Coruña, Departamento de Biología Celular y Molecular.
- BARQUERO, J. (1987) La industria del azúcar de remolacha. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. N°8/87HD.
- BERKOWITZ, D.E. *et al.* (2012) Procesos de la industria alimentaria. Industria alimentaria. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. Ed. Chantal Dufresne, BA. Cap. 67. Febrero. pp. 2.
- BOUIX, M. Y LEVEAU, Y.J. (2000). Microbiología industrial, los microorganismos de interés industrial. Ed. Acribia, S.A. pp. 3-88, 529-559.
- CARBALLO, F. (2000). Microbiología Industrial: Microorganismos de interés industrial. Ed. Acribia. España. pp.20-31.
- CASTRO, M. (1993). Estudio de la melaza de caña como sustrato de la fermentación acetobutílica. Tesis Pregrado Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Bogotá, Colombia. pp.3-35.
- CHEESMAN, O. (2004) Environmental impacts of sugar production. Ed. CABI Publishing. Cap. 8. pp. 151-172.
- CHEN, D.C.; YANG, B.C. Y KUO, T.T. (1992). One step transformation of yeast in stationary phase. *Curr. Genet* 21. pp. 83-84.
- CHOLOTA PALATE, L.O. Y MORA RUIZ, O.L. (2010). Diseño, construcción y pruebas de un sistema prototipo para la producción de etanol a partir de papa, zanahoria, remolacha y lacto suero. Tesis de Grado. Riobamba, Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Mecánica.
- CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y GANADERIA (2013). El cultivo de la remolacha. Obtenida el 25 de junio de 2014, Disponible en <http://www.tecnicoagricola.es/el-cultivo-de-la-remolacha/>
- CRUEGER, W. Y CRUEGER, A. (1993). Biotecnología. *Manual de Microbiología Industrial*, Ed. Acribia Zaragoza. Cap. 4-5.
- DEY, P. Y PRIDHAM, J. (1972). Biochemistry of α -galactosidases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 36: pp. 91-130.
- DURÁN, M.C.; GAROLA, P. Y GARRIDO, A. (2003) Características del crecimiento de levaduras de aceitunas de mesa a bajas temperaturas. *Grasas y Aceites*. Vol. 54, Fasc. 3. pp. 264-271.
- ERGUN, M. Y MUTLU, FS. (2000). Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, n°73, pp. 251-255

FAJARDO CASTILLO, E. Y SARMIENTO FORERO, S.C. (2007). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de Grado. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.

FERNÁNDEZ-LEIRO, R. (2011). Structural Characterization and Directed Evolution of an α -galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis doctoral. Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña.

FERNÁNDEZ-LEIRO, R.; PEREIRA RODRÍGUEZ, A.; CERDÁN, M.E.; BECERRA FERNÁNDEZ, M. Y SANZ APARICIO, J. (2010). Structural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* α -galactosidase and its complexes with natural substrates reveals new insights into substrate specificity of GH27 glycosidases. *Journal of Biological Chemistry*. 285(36): 28020-28033.

FUJIMOTO, Z.; KANEKO, S.; MOMMA, M.; KOBAYASHI, H. Y MIZUNO, H. (2003). Crystal structure of rice α -galactosidase complexed with D-galactose. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278. pp. 313-318.

GARZÓN CASTAÑO, S. Y HERNÁNDEZ LONDOÑO, C. (2009). Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Trabajo de Grado. Pereira. Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnologías.

GOLUBEV, A. M.; NAGEM, R.A.P.; BRANDAO NETO, J.R.; NEUSTROEV, K.N.; ENEYSKAYER, E.V.; KULMINSKAYA, A.A.; SHABALIN, K.A.; SAVEL'EV, A.N. Y POLICARPOV, I. (2004) Crystal structure of α -Galactosidase from *Trichoderma reesei* and its complex with galactose: Implications for catalytic Mechanism. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 339. pp. 413-422.

GULSHAN, A. (2014) Producción de Bioetanol y proteínas recombinantes a partir de suero de leche y melazas. Trabajo Fin de Máster. A Coruña: Universidad A Coruña, Departamento de Biología Celular y Molecular.

HERMIDA, JR. (1993). Tratamiento y aprovechamiento del orujo de aceituna. Tecnologías complementarias en la industria alimentaria. Córdoba, Editorial Caja Provincial De Ahorros de Córdoba. pp. 137-148.

HINGTON, G.; MORGAN, N.L.; ROCKEY, J.S.; Y WAITES, M.J. (2001) Industrial Microbiology: An Introduction. Editorial. Blackwell Science, Oxford. Cap. 2 y 5.

HOLEBERG, IB. Y MARGALITH, P. (1981). Alcoholic fermentation by immobilized yeast at high sugar concentrations. *Eur. J. Appl. Microbiol.* No.13. pp. 133-140.

IAÑEZ, E. (2009). Aspectos generales de las fermentaciones. Biotecnología de los Microorganismos. Ed. Universidad de Granada. Cap. 6. pp. 6.2-6.5.

ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). (1981) Industrialización de la Caña de Azúcar. Compendio No. 42. Bogotá, Colombia.

ICONTEC (Instituto Colombiano de Normas Técnicas). (1994) Industrias Alimentarias e Industriales de bebidas. Melaza de Caña NTC. 587. Bogotá. Colombia.

KUSHNER, S.R. (1987). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with col El-derived plasmids. In *Genetic Engineering* (Boyer, H.W. and Nicosia, S., eds.). Ed. Elsevier/North Holland, Amsterdam. pp. 17-23.

LEESON, S. Y SUMMERS, J. (2000). *Nutrición Aviar Comercial*. Editorial Le'Print Club Express Ltda. Bogotá, Colombia. pp. 43-45.

LEPILLER, O. (2013). Cahiers de Nutrition et de Diététique. Les critiques de l'alimentation industrielle et les réponses des acteurs de l'offre. Vol. 48. Issue 6. Diciembre. pp. 298-307.

LILJESTROM-SUOMINEN, P. (1985). The nucleotide sequence of the yeast MEL1 gene. *Nucleic acids research* 12(20).

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V. Y CLARK, D.P. (2009). *Brock. Biología de los Microorganismos*. Ed. Pearson-Addison Wesley. 12ª Edición. Cap. 25-26. pp. 811-860.

MILLER, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 (3): 426-428.

OSPINA, A. Y PALACIOS, M. (1994). Efecto del cultivo de levaduras sobre la carga orgánica de los efluentes de SUCROMILES S.A. Tesis pregrado Microbiología. Facultad de Ingeniería. Universidad del Valle. Cali, Colombia. pp.23-29.

PEÑA. C Y ARANGO, R (2009). Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de melaza de caña de azúcar. *Dyna*. Medellín, nº 159, septiembre, pp. 153-161.

POZO GUERRA, M. (2011). Evaluación de la ganancia de peso en novillos utilizando como suplemento Bloques Multinutricionales elaborados a base de: salvado de cebada y trigo, remolacha forrajera y melaza en diferentes concentraciones. Repositorio del Centro de Investigación, Transferencia Tecnológica y Emprendimiento (CITTE). Tulcán, Ecuador.

REZESSY-SZABO, J., NGUYEN, Q., HOSCHKE, A., BRAET, C., HAJOS, G. Y CLAEYSSSENS, M. (2007). A novel thermostable alpha-galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: purification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Protein Structure and Molecular Enzymology* 1770(1): pp. 55-62.

RIVADA NÚÑEZ, F.J. (2008). Planta industrial de producción de ácido cítrico a partir de melazas de remolacha. Proyecto Fin de Carrera. Cadiz, Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias.

RYAN, M.; JONES, R. Y MORSE, R. (1998). SWI-SNF complex participation in transcriptional activation at a step subsequent to activator binding. *Molecular Cell Biology* 18(4): 1774-82.

SAMBROOK, J.T.; MANIATIS, T. Y FRITSCH, E. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL Press.

SCHNEIDER, F. (1971). *Sekerin Teknolojisi*. Ed. Ajans Türk Matbacilik Sanayii. No.168.

SWAN, H. Y KARALAZOS, A. (1990). Las melazas y sus derivados. *Revista Tecnología. Geplacea*. No.19. España. pp.78-82.

THATIPAMALA, R. ROHANI, S. Y HILL, GA. (1992). Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* No. 40. pp. 289-297.

TOMASIC, I.B.; GARMAN, S.C.; METCALF, M.C.; GUCE, A.I.Y CLARK, N.E. (2010). Interconversion of the specificities of human lysosomal enzymes associated with Fabry and Schindler Diseases. *Journal of biological chemistry*. Vol. 285. N° 28.

TUITE, M. Y OLIVER, S. (1991). *Saccharomyces*. Ed. Plenum Press. New York, Estados Unidos. pp.272.

VAQUERO FRANCO, J. (2008). La industria del azúcar de remolacha. Hojas Divulgadoras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. Ricedeneyra S.A.