

Optimización de la producción heteróloga de la enzima α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de residuos agroindustriales

María E. Álvarez Cao

Tesis doctoral UDC / 2017

Directores: Manuel Becerra Fernández y María Isabel González
Siso

Facultade de Ciencias
Departamento de Bioloxía
Área de Bioquímica e Bioloxía Molecular
Programa de Doutoramento en Biotecnoloxía Avanzada¹



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

¹

Programa regulado polo RD 99/2011: Programa de Doutoramento en Biotecnoloxía Avanzada.

El presente trabajo, **Optimización de la producción heteróloga de la enzima α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de residuos agroindustriales**, presentado por Doña María Efigenia Álvarez Cao, para aspirar al grado de Doctor en Biología con la Mención Doctorado Internacional, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Biología de la Universidad de A Coruña. Revisado el texto, estamos conformes con su presentación para ser juzgado.

A Coruña, 27 de Septiembre de 2017



VºBº

Dr. Manuel Becerra Fernández
Profesor de Bioquímica y Biología
Molecular



VºBº

Dra. Mª Isabel González Siso
Catedrática de Bioquímica y
Biología Molecular

La autora de este trabajo ha disfrutado durante la realización de esta tesis de contratos a cargo a proyectos por la Universidade da Coruña (enero de 2012-junio de 2013 y julio de 2014-junio de 2015). Parte del trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Biocatálisis de la Escuela de Ingeniería Bioquímica (PUCV, Chile) durante una estancia de tres meses financiado por el programa de ayudas predoctorales para estancias Inditex-UDC 2016 (23/06/2016-21/09/2016).

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida a través del proyecto BIO-ALFA-GAL concedido por la Fundación BARRIÉ (550/2011), y gracias a la financiación general del laboratorio a través del “Programa de axudas para a consolidación e a estruturación de unidades de investigación competitivas do sistema galego de I+D+I” de la Xunta de Galicia (CN 2012/118) cofinanciado con fondos FEDER (CEE).

A Anxo y a Breixo

*“Queda prohibido no sonreír a los problemas,
no luchar por lo que quieres,
abandonarlo todo por miedo,
no convertir en realidad tus sueños”
Pablo Neruda.*

Muchas son las personas a las que tengo que agradecer por despertar en mí el interés por la investigación y hacerme ver que nunca es demasiado tarde para emprender este camino, por muy lejano que parezca al principio. Para empezar, mi más sincero agradecimiento a la Dra. M^a Esperanza Cerdán Villanueva por creer en mí y darme la oportunidad de formar parte de un grupo de investigación que, sin duda, ha marcado en mí una etapa determinante no sólo a nivel profesional sino, sobre todo, personal. Agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Manuel Becerra Fernández y la Dra. M^a Isabel González Siso, por el apoyo continuo y la confianza depositada en mí, dejando siempre al margen mis incertidumbres y miedos, para demostrarme, finalmente, que podía conseguir lo que creía inalcanzable. Un guiño cariñoso a Rafael Fernández Leiro, que aunque no hemos tenido ocasión de trabajar juntos, tras apenas conocernos al coincidir mi llegada con su salida del “Rocasolano” (donde ocupé su sitio), de nuevo por curiosas circunstancias de la vida me tropiezo con su trabajo, con el fin de seguir y continuar sus estudios, que ha sido la base importante del desarrollo de esta tesis. También, a las profesoras del área, que con su experiencia y especialidad dentro de la bioquímica me han ayudado siempre que lo he necesitado, Ana M^a Rodríguez Torres, Esther Rodríguez Belmonte, M^a Ángeles Freire Picos y en especial, a Mónica Lamas Maceiras, un referente para mí en todo momento y con la que he compartido risas y lágrimas, ganando una complicidad que espero perdure durante mucho tiempo. Y en general, quiero agradecer a un grupo de compañeros que con virtudes y defectos han destacado cada uno de ellos por valores tan apreciados como el compañerismo, la solidaridad, la participación y la involucración en el día a día, demostrando ser la “piña” del buen hacer del trabajo en equipo y la calidad humana. A Mariu, por tantos momentos compartidos sobre poyata pero, sobre todo, por esa mirada que en tantas ocasiones fue más valiosa que mil palabras. A Olalla, por su capacidad de ingeniárselas para salir con nuevas actividades “extralaboratorio” y transmitir su entusiasmo para hacernos desconectar y refrescar nuestra mente. A Juanjo, siempre dispuesto a tender la mano sin objeciones y que me ha demostrado tener mucha paciencia. A Ángel del que he aprendido infinidad de habilidades en el laboratorio y que, coincido seguro con los demás en que, llegará muy, muy lejos en este mundillo de la investigación. Lo mismo pienso de Agustín, que con su capacidad de trabajo, estoy convencida de que el destino le depara seguir los pasos de compañeros como Ángel (AVV), Rafa y Ángel P. (sólo necesita un empujoncito). A Aida (*Aidita*), su preocupación por los demás la delata (nunca olvidaré esas llamadas de última hora para animarme y ayudarme a buscar una solución) y aunque siempre pensé que nadie me ganaría como agonías, es una gran perfeccionista con madera de sobra para enseñar y transmitir a las nuevas generaciones (serás una gran “profe”). A María (*la pequeña*) con quien poco he coincidido, pero de la que puedo decir que siempre sorprende con ese desparpajo sureño que la hace tan entrañable. Y también

a Álvaro Mourenza, Álvaro Martínez y Gulshsan a quienes he intentado transmitir, lo mejor que he podido, una parte de este trabajo, y a otros tantos compañeros que han pasado o continúan en el laboratorio, Rosa, Natalí, Alba, Jaineli y Ana con quienes he compartido tantas inquietudes.

No puedo olvidar agradecer a toda la gente que conocí durante mi estancia predoctoral en el Laboratorio de Biocatálisis de la Escuela de Ingeniería Bioquímica (PUCV, Chile). A la Dra. Lorena Wilson, no sólo por permitirme la oportunidad de formarme y acercarme un poco al gran mundo de la inmovilización de enzimas, sino por ofrecerme compartir con ella, junto con el profesor Andrés Illanes, sus vidas en familia (recuerdo con mucho cariño esa barbacoa acompañada de una añorada cerveza durante mis primeros días en el país, donde más tarde descubrí con grata sorpresa los buenos caldos chilenos y, por supuesto, la cerveza del Puerto). A Gregorio Álvaro, por sus enseñanzas destacables que intenté absorber lo máximo posible durante esos apenas tres meses, y a Óscar, por estar al pie del cañón y por su incansable paciencia para animarme y buscar rápidamente nuevas estrategias cuando lo daba todo por perdido. A Seba por esos comienzos en el “*lab*”, a Carla por su amabilidad y disponibilidad de su apreciado tiempo (muy valioso en ese momento) con esos descansos que tanto agradecíamos compartir, también a Rosa (a la que tanto molesté con su termobloque), Mariela, Néstor, Carlos Vera, Vianey, por hacer más agradable mi estancia, y en especial, a Carminna (y Marco), gracias por ese viaje inolvidable al Sur chileno tan cercano al paisaje gallego. A Inma y Renato, por acogerme en su casa para poder disfrutar de la cosmopolita ciudad de Santiago de Chile y descubrir la historia del gran poeta Pablo Neruda. Y por supuesto, a mi querida señora Araceli que ha sido como una segunda mamá y consiguió que me sintiera como “*estar en casa*”, y a toda su familia, en especial, a Cheli por estar siempre pendiente de mí.

Finalmente, este trabajo se lo dedico a mi familia y amigos que han compartido conmigo muchas risas y también penas para alcanzar, finalmente, mis propósitos, y llegar a ser quién soy. A mi querido Carlos, por dejar grabado en mí ese “tú puedes hacerlo” y enseñarme a apreciar las pequeñas cosas del día a día, tu recuerdo permanecerá vivo en mi corazón. A mis padres, por ese sufrir callado y respetar en todo momento mis decisiones, aunque mis palabras no hayan sido siempre las más adecuadas, sin vuestros consejos nada tendría sentido. A *meu neno* (mi hermano Iván) que ha sido la fuerza y el apoyo protector incondicional cuando más lo necesitaba, que permitió que me levantara y siguiera avanzando. A Pamela, un ejemplo de fortaleza, que a pesar de compartir un destino que ha marcado nuestras vidas siempre muestra su mejor sonrisa (...). A mis amores, Anxo y Breixo, dispuestos a regalarme el sol y la luna sin saber que son ellos el mejor regalo que ha conseguido mantener a flote y unida esta familia. Y a Fran, por devolverme la ilusión y permitir,

con cariño y mucha paciencia, que mantuviera la compostura y superase mis miedos durante la etapa final de este trabajo a mi lado.

A todos, simplemente, "GRACIÑAS" por formar parte de mi vida, este trabajo es un pedacito de cada uno de vosotros...

CONTENIDOS

Resumen	17
Introducción	25
Objetivos	47
Capítulo 1	51
Optimización del proceso productivo de la α -galactosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y su aplicación en la degradación de oligosacáridos de la familia de la rafinosa.	
Capítulo 2	81
Bioconversión de melazas de remolacha en la producción de α -galactosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por una cepa de <i>S. cerevisiae</i> mejorada genéticamente.	
Capítulo 3	113
Valorización del lactosuero y la melaza de remolacha mediante la producción de α -galactosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por <i>Kluyveromyces lactis</i> .	
Capítulo 4	137
Inmovilización de la α -galactosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenida de medios de cultivo basados en residuos agroindustriales.	
Conclusiones finales	159
Referencias	165
Anexo I: Abreviaturas	187
Anexo II: Curriculum vitae	193

RESUMEN

RESUMO

As α -galactosidasas son enzimas que actúan sobre os galactósidos presentes en moitas prantas que están destinadas á elaboración de alimentos e pensos. Polo tanto, o uso da actividade catalítica destas enzimas é de gran interese en moitas aplicacións biotecnolóxicas, especialmente naquelas dirixidas na industria alimentaria á degradación de oligosacáridos derivados da rafinosa (RFOs). Nesta Tese de Doutoramento propónse a caracterización enzimática e máis estudos de sistemas de produción heteróloga da enzima α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* para avaliar as aplicacións de uso en procesos produtivos industriais. Confírmase que a enzima pertence ao grupo 1 de α -galactosidasas segundo a súa acción sobre galactomano-polisacáridos sintéticos e ten unha forte resistencia a proteasas acedo-neutras, calidade desexable industrialmente. A mellora xenética dunha cepa de *S. cerevisiae* e o uso dun sistema de expresión en *Kluyveromyces lactis* permitiu a produción da enzima a partir de residuos agro-industriais de difícil de reciclaxe, como as melazas de remolacha e o soro de leite. Empregouse a Metodoloxía de Superficie de Resposta (MSR) para levar a cabo a optimización estatística da produción da enzima utilizando medios de cultivo convencionais e medios alternativos máis sostibles, acadando os maiores resultados descritos ata agora expresados en termos de actividade α -galactosidasa extracelular. Finalmente, tendo en conta o interese actual pola reutilización e valorización deste tipo de subproductos da industria, realizáronse estudos de inmovilización enzimática empregando preparados enzimáticos a partir destas cepas recombinantes. O deseño de diferentes estratexias de inmovilización permitiu aumentar a estabilidade operativa de diferentes derivados da enzima que conleva a unha vantaxe adicional no seu campo de actuación segundo as necesidades do uso industrial.

RESUMEN

Las α -galactosidasas son enzimas que actúan sobre galactósidos presentes en muchos vegetales que son destinados a la elaboración de alimentos y piensos. Es por ello, que el aprovechamiento de la actividad catalítica de estas enzimas es de gran interés en numerosas aplicaciones biotecnológicas, especialmente aquellas dirigidas, en la industria alimentaria, a la degradación de oligosacáridos derivados de la rafinosa (RFOs). En la presente Tesis Doctoral se proponen estudios de caracterización enzimática y sistemas de producción heteróloga de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* para valorar las posibilidades de su uso en procesos productivos industriales. Se confirma que la enzima pertenece al Grupo 1 de α -galactosidasas según la acción sobre galactomano-oligosacáridos sintéticos y presenta una fuerte resistencia a proteasas ácido-neutras, cualidad deseable a nivel industrial. La mejora genética de una cepa de *S. cerevisiae* y el uso de un sistema de expresión en *Kluyveromyces lactis* permitió la producción de la enzima a partir de residuos agroindustriales de difícil reciclaje, tales como las melazas de remolacha y el lactosuero. Se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para la optimización estadística de la producción de la enzima empleando medios de cultivo convencionales y medios alternativos más sostenibles, alcanzando los resultados más altos descritos hasta el momento expresados en términos de actividad α -galactosidasa extracelular. Finalmente, dado el interés actual en la reutilización y valorización de este tipo de residuos agroindustriales, se realizaron estudios de inmovilización enzimática utilizando preparaciones enzimáticas procedentes de dichas cepas recombinantes. El diseño de diferentes estrategias de inmovilización permitió aumentar la estabilidad operacional de diferentes derivatizados de la enzima que posibilita una ventaja adicional en su campo de acción según las necesidades del uso industrial.

ABSTRACT

α -galactosidases are enzymes that act on galactosides present in many plants that are destined to the elaboration of food and feed. It is for this reason that the use of the catalytic activity of these enzymes is of great interest in many biotechnological applications, especially those directed in the food industry to the degradation of oligosaccharides derived from raffinose (RFOs). In this Doctoral Thesis, studies of enzymatic characterization and systems of heterologous production of the α -galactosidase of *Saccharomyces cerevisiae* are proposed to evaluate the possibilities of its use in industrial production processes. Enzyme belongs to Group 1 of α -galactosidases according to the action on synthetic galactomano-oligosaccharides and has a strong resistance to acid-neutral proteases, an industrial desirable quality. Genetic improvement of a strain of *S. cerevisiae* and the use of an expression system in *Kluyveromyces lactis* allowed the production of the enzyme from agroindustrial residues of difficult recycling such as beet molasses and whey. The Response Surface Methodology (RSM) was used for statistical optimization of enzyme production using conventional and sustainable alternative culture media, reaching the highest results described so far expressed in terms of extracellular α -galactosidase activity. Finally, given the current interest in the reuse and valorization of this type of agroindustrial residues, studies of enzymatic immobilization were carried out using enzymatic preparations from recombinant strains. The design of different immobilization strategies allowed to increase the operational stability of different derivatives of the enzyme, which represent an additional advantage according to the needs of the industrial use.

INTRODUCCIÓN

1. α-Galactosidasas	25
1.1. Clasificación y especificidad de sustrato	25
1.2. Aplicaciones de las α -galactosidasas	26
1.3. α -Galactosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
2. Caracterización de sustrato	29
2.1. Una herramienta útil: Cromatografía de capa fina	30
3. Optimización de procesos productivos	32
3.1. Metodología de Superficie de Respuesta	32
3.1.1. Diseños de Superficie de Respuesta	34
3.1.2. Análisis y optimización de la Superficie de Respuesta	35
3.2. Monitoreo de bioprocesos	36
3.3. Bioconversión de subproductos industriales	36
3.1.3. Melazas de remolacha	37
3.1.4. Suero de leche	38
4. Producción heteróloga de proteínas recombinantes	40
4.1. Secreción de proteínas heterólogas por sistemas de expresión de levaduras	40
4.2. Metabolismo energético de levaduras	42
5. Inmovilización de enzimas	43

1. α -Galactosidasas

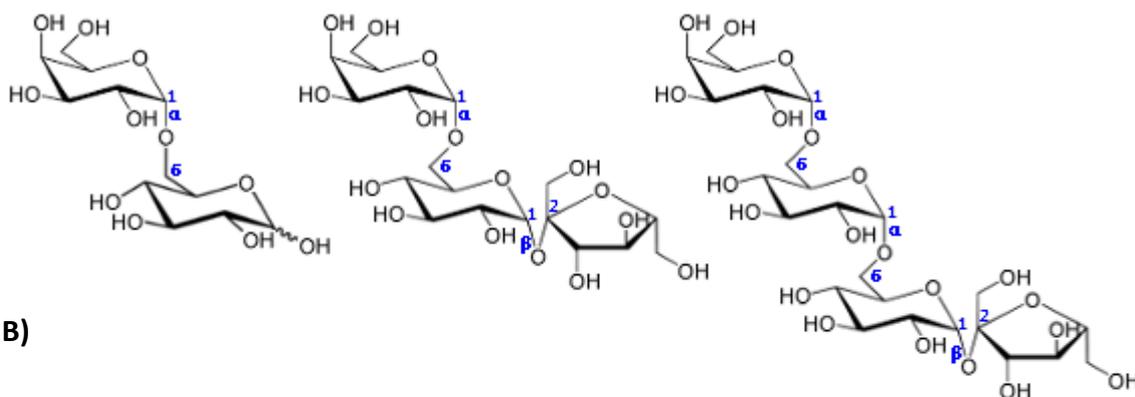
Las α -galactosidasas (α -Gals) son glicosidasas que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos, las cuales realizan la catálisis enzimática de enlaces glicosídicos específicos de diferentes azúcares o carbohidratos. Los carbohidratos son las biomoléculas más abundantes de la naturaleza y los componentes principales de muchos alimentos, por lo que su degradación puede llegar a ser una fuente importante de energía renovable o permitir la obtención de diferentes productos durante el procesamiento de alimentos. En concreto, las α -Gals, participan en la rotura de enlaces α -(1,6) de residuos galactosa de galacto-oligosacáridos y también pueden llevar a cabo reacciones de transglicosilación en condiciones apropiadas, transfiriendo el residuo glicosilo a diferentes moléculasceptoras, abarcando así un amplio campo de acción. Es por ello, que estas enzimas destacan en una gran variedad de aplicaciones de interés biotecnológico llegando a dirigir el desarrollo eficiente de varios procesos industriales.

1.1. Clasificación y especificidad de sustrato

Las α -Gals se clasifican según la comisión conjunta de nomenclatura bioquímica IUPAC-IUBM bajo el código numérico EC 3.2.1.22, donde los tres primeros dígitos indican la propiedad de hidrolizar el enlace O-glicosídico, y el cuarto señala el tipo de sustrato (McDonald et al., 2009). Una clasificación complementaria a la anterior, se basa en la similitud de la secuencia aminoacídica y agrupa estas enzimas en la clase glicosil hidrolasas (GH) que, actualmente, incluye 135 familias y 14 clanes o grupos de familias (A-N) disponibles en el servidor CAZy (Cantarel et al., 2009). Esta clasificación fue muy útil para la caracterización tridimensional de las enzimas incluidas en cada familia, donde la estructura cuaternaria de la proteína es conservada, y análisis funcionales posteriores establecieron que la especificidad de sustrato viene dada por mínimas variaciones estructurales (Davies y Henrissat, 1995). Las α -Gals pertenecen a las familias GH4, GH27, GH36, GH57, GH97 y GH100, y presentan estructuras 3D muy variadas. La mayoría se encuentran en las familias GH27 y GH36, constituidas, principalmente, por enzimas procedentes de organismos eucariotas y procariotas, respectivamente, donde ambas familias forman parte del clan GH-D que comparte un ancestro común y la función del mecanismo catalítico (Janika et al., 2010). Sin embargo, a pesar de la similitud de secuencia, algunas familias son poliespecíficas, contienen enzimas con diferente especificidad de sustrato, lo que es indicativo de una divergencia evolutiva que favoreció la adaptación de nuevas funciones. Las α -Gals son capaces de liberar el residuo α -D-galactosil de diferentes galacto-oligosacáridos (melibiosa, rafinosa y estaquiosa) y galactomananos complejos (Figura 1). Los galactomananos están formados por una cadena principal de β -(1,4)-D-manosas unida a residuos α -D-galactosil a través de la posición O-6 (OH- del carbono 6 de la hexosa)

como se muestra en la figura 1B. Es por ello que otra clasificación establece un grupo de α -Gals que sólo actúan sobre α -galactósidos de bajo grado de polimerización, mientras que otro grupo es activo tanto sobre sustratos pequeños como poliméricos (Dey et al., 1993). Por otro lado, en función de su acción sobre galactomano-oligosacáridos sintéticos, las α -galactosidasas también se han clasificado en tres grupos dependiendo de si permiten liberar la galactosa terminal o interna de dichos sustratos (Mitsunori et al., 2001).

A)



B)

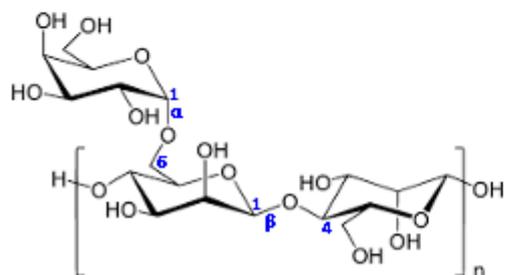


Figura 1. Estructura de α -galactósidos sencillos (A) y galacto-mananos poliméricos (B). A) De izquierda a derecha se representa la melibiosa (α -D-Gal-(1,6)- α -D-Glc), rafinosa (α -D-Gal-(1,6)- α -D-Glc-(1,2)- β -D-Fru) y estaquiosa (α -D-Gal-(1,6)- α -D-Gal-(1,6)- α -D-Glc-(1,2)- β -D-Fru). B) Representación esquemática de galactomananos poliméricos (α -D-Gal-(1,6)-[β -D-Man-(1,4)- β -D-Man]_n). En azul se muestra el tipo de enlace involucrado en la unión de los monosacáridos. Gal, galactosa; Glc, glucosa; Fru, fructosa; Man, manosa.

1.2. Aplicaciones de las α -galactosidasas

El aprovechamiento de la actividad catalítica de las α -Gals es una herramienta potente en muchas aplicaciones biotecnológicas relacionadas no sólo con la industria alimentaria, sino también con la farmacéutica y médica, e incluso en el sector de la bioenergía, incrementando el rendimiento en la producción de etanol a partir de residuos agroindustriales.

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOs) se encuentran almacenados en las vacuolas de la mayoría de los vegetales, tales como, la caña de azúcar y la

remolacha azucarera, o la soja y derivados de leguminosas, productos empleados tanto en alimentación humana como animal. La actividad α -Gal puede ser utilizada en la industria azucarera para mejorar el rendimiento del proceso de cristalización de la sacarosa ya que permite la hidrólisis de rafinosa presente en la materia prima (caña de azúcar o remolacha azucarera). Además, la rafinosa y la estaquiosa son los principales RFOs responsables de la producción de flatulencia en el hombre y otros animales monogástricos, al carecer éstos de α -Gal en su tracto digestivo. Estos oligosacáridos intactos no se absorben y se acumulan en el intestino grueso, donde son fermentados por la microflora anaeróbica produciendo gases que generan desórdenes digestivos de diferente orden. En este caso, el tratamiento con α -Gal puede ser dirigido a su comercialización como suplemento alimenticio o bien como aditivo alimentario para degradar los RFOs con el fin de mejorar el valor nutritivo de nuevos productos o el aprovechamiento energético de piensos (Ghazi et al., 2003a; Levine et al., 2004). Muchas son las α -Gals reportadas para evaluar su capacidad biotecnológica en la reducción de la presencia de RFOs (De Rezende et al., 2005; Du et al., 2013a, 2013b; Ferreira et al., 2011; Geng et al., 2015; Girigowda et al., 2007; Guimarães et al., 2001; Guo et al., 2016; Hu et al., 2017; Janika et al., 2010; Katrolia et al., 2012; Liu and He, 2012; Ramalingam et al., 2010; Ripuan et al., 2003; Schröder et al., 2016; Shibuya et al., 1999; Singh and Kayastha, 2012a; Viana et al., 2006; Yang et al., 2015). También se ha reportado la obtención de tagatosa a partir de la hidrólisis de oligosacáridos de la soja con α -Gals, la cual es un monosacárido natural con mayor poder endulzante y menos calórico que la sacarosa empleado como edulcorante funcional (Kim et al., 2009).

Los galactomananos son añadidos a muchos productos alimenticios porque permiten modificar su textura y consistencia sin afectar a las características organolépticas de los mismos (Goulas et al., 2016). Se ha demostrado que algunas α -Gals pueden eliminar residuos de galactosa de estos polisacáridos o “gomas” mejorando sus propiedades reológicas al reducir su viscosidad, lo que amplía su uso no sólo como aditivos alimentarios, sino también en cosmética y farmacia (Du et al., 2013b; Fialho et al., 2008; Geng et al., 2015; Janika et al., 2010).

Otra aplicación en esta área es la síntesis enzimática de ciertos azúcares a través de la reacción reversa de la enzima (reacción de transglicosilación) que se produce en condiciones de supersaturación de sustrato. De esta manera, las α -Gals pueden presentar en mayor o menor medida actividad de síntesis de α -galacto-oligosacáridos (α -GOS) de amplio interés en la industria alimentaria o incluso farmacéutica (Bobrov et al., 2013; Nakai et al., 2010; Ripuan et al., 2003; Wang et al., 2014; Yamashita et al., 2005). La característica que hace que los α -GOS tengan un gran valor comercial y que se incluyan en el grupo de los llamados prebióticos, es que pueden ser fermentados específicamente por bacterias del colon (bifidobacterias, lactobacilos) estimulando su

crecimiento con la consecuente acción beneficiosa para la salud del hospedador (Morel et al., 2015). Además, algunos de estos α -GOS podrían ser utilizados en xenotransplantes y en el desarrollo de dianas terapéuticas contra el cáncer (Gong et al., 2016).

Una de las aplicaciones farmacológicas más importante de la α -Gal es el desarrollo de tratamientos para la enfermedad de Fabry, un trastorno de almacenamiento lisosomal hereditario ligado al cromosoma X. Esta enfermedad es producida por mutaciones en el gen que codifica para la enzima α -Gal A, que conlleva a la acumulación de glicosfingolípidos (globósidos, galabiosilceramida e isoglobósidos). La terapia de reemplazo de la enzima está aceptada pero su eficacia es discutida, y se están estudiando nuevas estrategias como el uso de chaperonas para estabilizar la α -Gal A y la reducción de glicosfingolípidos (Arends et al., 2017; Yoshimitsu et al., 2011). También, es de gran interés la posibilidad de conversión entre grupos sanguíneos ABO, donde son determinantes las diferencias estructurales de los polisacáridos presentes en la superficie de los eritrocitos. Algunas α -Gals de plantas pueden eliminar los residuos de galactosa terminal unidos por enlaces α -(1,3) de donantes de sangre tipo B para generar sangre de tipo serológico O (Zhu et al., 1994; Singh N. et al., 2012).

Por otro lado, productos de desecho agrícolas, como las melazas de azúcar y subproductos de la industria de legumbres, suponen un problema de contaminación medioambiental debido a su elevada carga orgánica. Uno de los campos de aplicación es su degradación acoplada a la producción de bioetanol, donde Brasil destaca como país pionero y de mayor producción (Basso et al., 2011). El bioetanol presenta un abanico de posibilidades de uso, como biocombustible, en desinfectantes sanitarios, en productos cosméticos y en la producción de bebidas alcohólicas. El uso de α -Gal puede mejorar la utilización de estos subproductos biodegradables dirigidos a la producción de etanol y/o biomasa a través de la fermentación alcohólica llevada a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* (Takakuwa et al., 2006).

1.3. α -Galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

La α -galactosidasa de *S. cerevisiae* (ScAGal) pertenece a la familia GH27 y es transcrita por el gen *MEL1* que contiene 1413 pb que codifican para una proteína de 471 aminoácidos (*GeneBank* X03102). La proteína atraviesa una ruta de secreción donde es altamente glicosilada y dirigida a la membrana extracelular gracias a la presencia de un péptido señal de 18 aminoácidos en su extremo amino terminal. Una vez secretada, se acumula en el espacio periplasmático y, finalmente, difunde al medio extracelular en diferentes cantidades dependiendo de las condiciones de cultivo, de tal manera, que la forma intracelular corresponde a un estado de la

proteína asociada a las membranas (Fernández-Leiro, 2011). Teniendo en cuenta que se trata de una enzima extracelular, esto facilita, considerablemente, su purificación sin necesidad de dañar las células y posibilita poder alcanzar una optimización del proceso productivo eficiente que será discutida en capítulos siguientes. Entre las propiedades físico-químicas de la enzima destacan, pH óptimo de 4 con amplio rango de estabilidad (pH 2–7.5), temperatura óptima de 40 °C y cierta termoestabilidad mostrando una vida media de 14 horas a 50 °C, 30 minutos a 60 °C y 5 minutos a 70 °C (Fernández-Leiro, 2011). También, estudios de inhibición enzimática revelan que la enzima es sensible a concentraciones 1 mM de sales de los metales Ca^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} y presenta inhibición competitiva por azúcares como la galactosa, glucosa y melibiosa (Fernández-Leiro, 2011). Por otro lado, esta enzima posee mayor afinidad por el sustrato sintético *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (PNPG), seguido de los sustratos naturales melibiosa y rafinosa, y exhibe una eficiencia catalítica ($K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) más alta por la melibiosa que por la rafinosa (Fernández-Leiro R. *et al.*, 2010). Estos trabajos previos ya revelan propiedades interesantes de esta enzima, las cuales son complementadas con una caracterización de sustrato completa que se detalla en el capítulo 1 de esta tesis.

2. Caracterización de sustrato

Muchas son las α -Gals que se han identificado y purificado a partir de diversas fuentes microbianas y vegetales (Liu *et al.*, 2007). Sin embargo, en los últimos años, ha aumentado considerablemente, la caracterización de aquellas procedentes de microorganismos con potencial industrial destacable. En especial, aquellas de origen fúngico que presentan una localización extracelular y propiedades más adecuadas en términos de estabilidad con posibilidad de ofrecer una mejora en el proceso de producción a escala industrial (Ferreira *et al.*, 2011; Geng *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2017; Janika *et al.*, 2010; Katrolia *et al.*, 2012; Liu and He, 2012; Yang *et al.*, 2015).

Las α -Gals pueden romper los enlaces de residuos galactosil terminales de los sustratos α -PNPG, melibiosa, rafinosa y estaquiosa (Tabla 1). Sin embargo, para una mejor caracterización de la enzima, es necesario utilizar otros sustratos con uniones galactosa en otras posiciones, como son los galactomano-oligosacáridos. La preparación y obtención de estos oligosacáridos, a partir de galactomananos de origen natural, es compleja y a menudo es necesario recurrir a la actividad de otras enzimas como las β -mananasas (Kasukabe *et al.*, 1986). Actualmente, varios trabajos reportan la acción de α -Gals sobre diferentes tipos de galactomananos, pero hay datos limitados que determinen la posición de rotura del residuo α -D-galactosil utilizando galactomanosacáridos sintéticos (Janika *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2003). La dificultad de obtener galactomanosacáridos con uniones a galactosa en las posiciones

de interés, conlleva a recurrir a la actividad de la enzima β -manosidasa (Kusakabe et al., 1990). La β -manosidasa de *Helix pomatia* es una glicosidasa que hidroliza los enlaces $\beta(1-4)$ de residuos D-manosil de oligosacáridos complejos, tales como, galactomananos, glucomananos y galactoglucomananos (McCleary, 1983). Esta enzima participa en la eliminación de la manosa del extremo no reductor del polímero hasta alcanzar un punto de ramificación, por lo tanto, no puede hidrolizar el enlace con un residuo α -D-galactosil (McCleary et al., 1982). En la tabla 1 se muestra la estructura de los galactomano-oligosacáridos sintéticos Gal¹Man₃ (6¹-mono- α -D-galacto-piranosil- β -1,4-manotriosa) y Gal^{3,4}Man₅ (6^{3,4}-di- α -D-galactopiranosil- β -1,4-manopentosa) y los enlaces susceptibles de ser hidrolizados por α -Gals y β -manosidasas. En el capítulo 1 se discutirán las propiedades hidrolíticas de la ScAGal en función de la especificidad de sustrato, así como otras características con potencial uso en la industria biotecnológica.

Tabla 1. Estructura de los sustratos susceptibles de hidrólisis por α -Gals y β -manosidasas.

Sustrato	Estructura	Enlaces hidrolizados
α -PNPG	α -D-Gal-1- <i>p</i> -nitrofenol	Gal – PNPNG ↑
Melibiosa	α -D-Gal-(1,6)- α -D-Glc	Gal – Glc ↑
Rafinosa	α -D-Gal-(1,6)- α -D-Glc-(1,2)- β -D-Fru	Gal – Glc – Fru ↑
Estaquiosa	α D-Gal-(1,6)- α -D-Gal-(1,6)- α -D-Glc-(1,2)- β -D-Fru	Gal – Gal – Glc – Fru ↑ ↑
Gal ¹ Man ₃	Gal α 1 ↓ 6 Man β 1-4Man β 1-4Man	Gal → M – M – M ↑ ↑
Gal ^{3,4} Man ₅	Gal α 1 Gal α 1 ↓ ↓ 6 6 Man β 1-4Man β 1-4Man β 1-4Man	Gal Gal → → M – M – M – M – M ↑

→ Enlaces hidrolizados por α -Gal M: Manosa reductora del galactomano-oligosacárido
 ↑ Enlaces hidrolizados por β -manosidasa M: Manosa no reductora del galactomano-oligosacárido

2.1. Una herramienta útil: Cromatografía de capa fina

En los estudios de caracterización de sustrato de α -Gals, la utilización de la cromatografía de capa fina (TLC) está recuperando su interés por ser una técnica analítica sencilla, rápida y barata, que ofrece la posibilidad de observar todos los componentes de una reacción siempre que éstos puedan ser separados (Geng et al., 2015; Guo et al., 2016; Hu et al., 2017; Katrolia et al., 2012). Además de permitir el seguimiento de las reacciones por la aparición de productos y desaparición del sustrato, es posible el tratamiento de varias muestras al mismo tiempo.

La muestra a analizar se deposita mediante un capilar cerca de un extremo de una lámina recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria), la cual se coloca

en una cubeta cerrada que contiene un sistema solvente volátil (eluyente o fase móvil). A medida que la fase móvil asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los componentes presentes en la muestra. El revelado del cromatograma requiere utilizar un agente que reaccione con los compuestos adsorbidos proporcionando productos coloreados visualizados a través de manchas o *spots*. En la figura 2 se representa un esquema de la preparación y análisis de muestras mediante TLC.

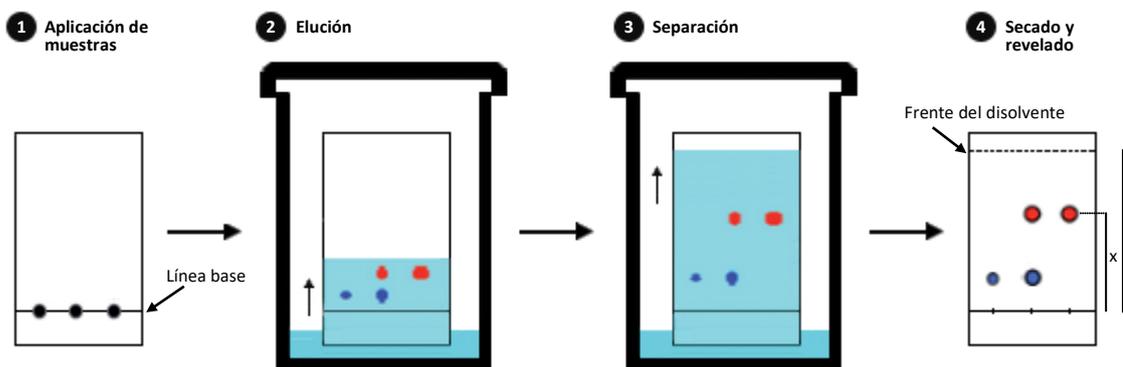


Figura 2. Representación esquemática del análisis por TLC. Paso 1: aplicar la muestra en la placa con un tubo capilar procurando que se extienda lo menos posible y que no dañe la capa, dejar secar. Paso 2: introducir la placa en una cubeta que contiene el sistema solvente sin tocar la línea base y permitir que éste ascienda por capilaridad (hasta 2-3 cm del final de la placa) para arrastrar la muestra a su paso y separar sus componentes. Paso 3: las distintas moléculas tienen distintas masas por lo que se mueven a diferentes velocidades y alcanzan alturas diferentes sobre la placa generando un patrón que es comparado con estándares de referencia. Paso 4: sacar la placa, marcar la altura que ha alcanzado el disolvente, y tras el revelado, calcular los R_f ($R_f = x/y$) comparándolos con los patrones establecidos.

El adsorbente debe ser inerte y de naturaleza polar; el más utilizado para separar sustancias muy polares, tales como carbohidratos, es el gel de sílice, el cual permite el establecimiento de interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno con el soluto durante el proceso de adsorción. El sistema solvente está compuesto, normalmente, por dos o más disolventes de distinta polaridad; por orden creciente de fuerza eluyente los más empleados son hexano < tetraclorometano < cloroformo < diclorometano < acetato de etilo < acetona < 2-propanol < metanol < agua. Por lo tanto, la polaridad de la mezcla será el valor promedio de la cantidad de cada disolvente empleada y será necesario seguir "el método del ensayo y del error" para localizar el eluyente idóneo para cada caso. La retención y la selectividad en la separación vienen determinadas por el número y la naturaleza de los grupos funcionales presentes en los solutos y el disolvente. Los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad. Asimismo, para un mismo compuesto, un aumento en la polaridad del disolvente facilitará su desplazamiento en la placa cromatográfica. La relación entre las distancias recorridas por el soluto y el eluyente desde el origen de la placa se conoce

como R_f (coeficiente de reparto) que representa la posición de un compuesto. Este valor es constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.). Por lo tanto, dado que no es posible reproducir exactamente las condiciones experimentales, la comparación de una muestra con otra debe realizarse eluyendo ambas en la misma placa.

La dificultad que atañe a este tipo de técnica, es que algunos componentes pueden presentar polaridades similares apareciendo bajo el mismo punto. Si se utiliza un disolvente de desarrollo demasiado polar, todos los componentes en la mezcla se moverán junto con el disolvente (R_f demasiado grande) y si su polaridad es demasiado baja no se mueven lo suficiente (R_f demasiado pequeño), en cualquiera de los dos casos, los componentes de la muestra no se separarán bien. Se ha reportado la separación de mezclas de carbohidratos a través de diferentes sistemas de solventes como 1-propanol-nitrometano-agua, cloroformo-metanol-agua o 1-propanol-ácido acético-agua, los cuales son, posteriormente, detectados mediante revelado con diferentes combinaciones de ácido sulfúrico concentrado y alcoholes (Kaneko et al., 1991; Katrolia et al., 2012; Kim et al., 2003). Por lo tanto, es necesario llevar a cabo una optimización del sistema cromatográfico que permita aportar resultados satisfactorios en términos de resolución y movilidad de los productos detectados, y ausencia de artefactos provocados por el revelado de las placas. En el capítulo 1 se discutirá la caracterización de sustrato de la ScAGal mediante TLC como método cualitativo, previo a la cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución.

3. Optimización de procesos productivos

La optimización de un proceso productivo dirigido a la obtención de enzimas industriales permite la mejora en cuanto a costo, tiempo, eficiencia, productividad y/o calidad del producto final. Mediante estrategias estadísticas como la Metodología de Superficie de Respuesta se puede conocer el funcionamiento de un sistema o proceso y encontrar las condiciones óptimas de operación, que posteriormente, podrán ser aplicables a un biorreactor, el cual facilitará la implementación de la producción de enzimas a escala industrial. Asimismo, un punto importante a considerar, desde la perspectiva industrial, es la selección de un medio de cultivo adecuado en relación con el costo y la eficiencia.

3.1. Metodología de Superficie de Respuesta

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es una combinación de técnicas de diseño experimental y análisis de regresión introducida por Box y Wilson en 1951 (Box and Draper, 2007). Es una estrategia que permite modelar y analizar las

condiciones de un proceso (factores experimentales) que influyen en una respuesta de interés. El propósito de estas técnicas es diseñar experimentos que proporcionen valores reales adecuados de dicha respuesta, determinar el modelo matemático que mejor se ajuste a los datos observados y establecer, finalmente, los valores de los factores (variables independientes) que optimicen el valor de la variable respuesta (variable dependiente).

Cuando un valor real de la respuesta depende de los niveles (x_1, x_2, \dots, x_k) de k factores, esto significa que existe una función matemática que predice la variable respuesta (Y), $Y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon$, donde ε es el error observado que engloba las fuentes de variabilidad que no se tuvieron en cuenta. La forma de esta función es, en general, desconocida, por lo que la MSR consiste en establecer experimentalmente una aproximación apropiada de dicha función. Para ello, se propone un modelo de ecuación, generalmente polinómico, en los k factores, y se selecciona un conjunto de tratamientos sobre los que realizar las observaciones experimentales, que se utilizarán para obtener estimaciones de los coeficientes en el modelo propuesto y la variación del error experimental. Este polinomio es empleado para generar una superficie de respuesta representada por $k+1$ dimensiones, de tal manera que, con una función $Y = f(x_1, x_2)$ obtendremos una superficie de respuesta tridimensional que define el dominio experimental (Figura 3A). La forma de esta superficie puede ser representada como una gráfica de contornos, que son curvas correspondientes a valores constantes de la respuesta sobre un plano donde los ejes coordenados representan los niveles de los factores, permitiendo el estudio de aquellos niveles en los que ocurre un cambio en la altura de la superficie (Figura 3B). El estudio de la superficie de respuesta se hace en términos de la superficie ajustada, ya que su análisis será aproximadamente equivalente al del sistema real. Con el modelo ajustado se determinan las condiciones óptimas de operación del sistema. En los

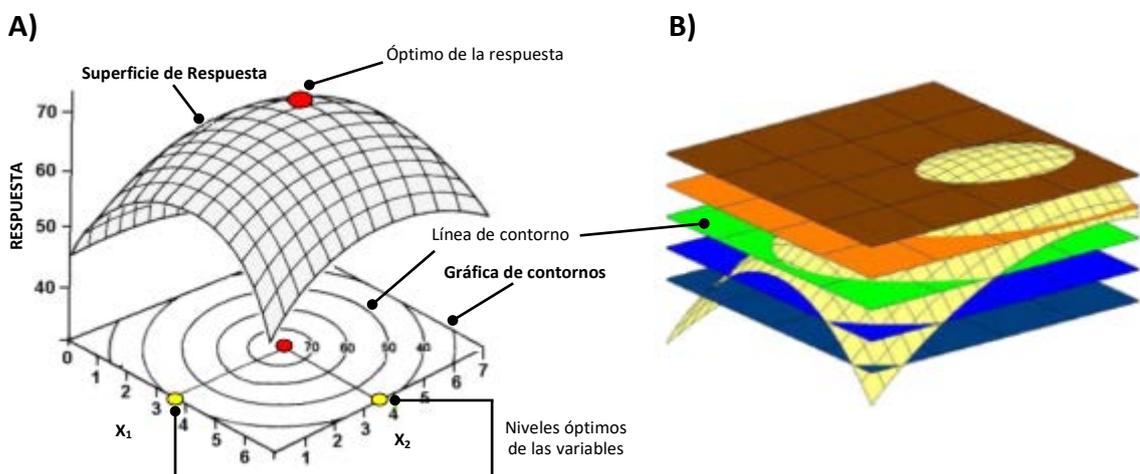


Figura 3. Representación gráfica del modelo de Superficie de Respuesta. A) Componentes de una Superficie de Respuesta y gráfica de contornos. **B)** Cada línea de contorno está formada por todas las combinaciones de los factores que producen una misma respuesta.

capítulos 1, 2 y 3 de esta tesis se aplicará la MSR para el desarrollo de la optimización de la producción de la proteína heteróloga ScAGal empleando diferentes condiciones de cultivo.

3.1.1. Diseños de Superficie de Respuesta

El estudio de una superficie de respuesta consiste en la localización de la región donde se encuentra la respuesta óptima, la cual puede requerir varias etapas que, tras la comprobación experimental, permite reducir la superficie de la misma, en algunos casos hasta alcanzar la convergencia en un punto óptimo. De esta manera, el estudio puede iniciarse con la planificación de un diseño experimental exploratorio que permite la aproximación a la superficie mediante la representación matemática de los modelos más simples. En este caso se utilizan los modelos de primer orden (lineal) sin interacciones o con interacciones o productos cruzados que determinan el estudio de los efectos lineales, o lineales y de interacción entre los factores experimentales, respectivamente. Sin embargo, cuando se espera que el punto óptimo se localice cerca del dominio experimental se pueden utilizar diseños de segundo orden para así estudiar, además de los efectos lineales y de interacción, los efectos cuadráticos o de curvatura pura. El modelo cuadrático o de segundo orden ajustado está dado por la siguiente ecuación polinomial (1):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ji} x_i x_j \quad (1);$$

donde Y es la respuesta predicha; x_i y x_j son las variables independientes que afectan a la variable respuesta; y β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} son los coeficientes de regresión a estimar que representan el término constante, el efecto lineal de x_i , el efecto cuadrático de x_i , y la interacción entre x_i y x_j , respectivamente. Estos diseños requieren al menos tres niveles (-1, 0, 1) para cada factor experimental que son codificados para facilitar los cálculos, estandarizar las variables (eliminando las unidades de medida de las variables reales) e incrementar la precisión al estimar los coeficientes del modelo de regresión cuadrática. Los niveles codificados de los factores se obtienen mediante una ecuación (2) que asigna valores ± 1 a las variables asociadas al arreglo factorial:

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i \quad (2);$$

donde x_i es el valor codificado de la variable independiente, X_i es el valor real de la variable independiente, X_0 es el valor real de la variable independiente en el punto central del dominio experimental y ΔX_i el incremento de X_i correspondiente a una unidad del valor adimensional x_i . Para obtener los valores de los niveles reales, las variables se pueden decodificar posteriormente, aunque la utilización de un *software*

puede evitar el uso de códigos. Considerando todas las posibles combinaciones de los niveles de los k factores, se obtiene una matriz de diseño de $1+2k+k(k-1)/2$ filas, cada una de las cuales representa un tratamiento. El diseño se incrementa con repeticiones de los puntos centrales (0, 0, 0) que corresponden al nivel central de cada factor, con el fin de detectar la falta de ajuste del modelo. Entre los diseños experimentales que pueden ser utilizados en esta etapa están los experimentos factoriales 3^k y los diseños centrales compuestos propuestos por Box y Wilson.

Los diseños centrales compuestos consisten en tratamientos factoriales 2^k con 2^k combinaciones adicionales denominados puntos axiales, cuyas coordenadas vienen representadas por $(\pm \alpha, 0, 0, \dots, 0)$, $(0, \pm \alpha, 0, \dots, 0)$, ..., $(0, 0, 0, \dots, \pm \alpha)$. La propiedad deseable en estos diseños establece que la varianza de los valores estimados sea constante en puntos equidistantes del centro del diseño. Esta propiedad llamada rotabilidad se logra con $\alpha = 2^{k/4}$, de tal manera que, el valor de α para un diseño con tres factores es $\alpha = 1,682$ y para cuatro factores es $\alpha = 2$.

3.1.2. Análisis y optimización de la Superficie de Respuesta

El análisis de la superficie de respuesta requiere, en cada etapa, identificar los factores significativos, examinar la adecuación del modelo y determinar la dirección en la cual se encuentran las condiciones óptimas de experimentación. Para identificar los factores que tienen mayor influencia en la respuesta y examinar la falta de ajuste del modelo se utiliza el análisis de varianza. Si el modelo no explica un mínimo de 70 % del comportamiento de la respuesta, en términos del R^2 ajustada, no se recomienda utilizarlo para fines de optimización porque su calidad de predicción es mala. Si el modelo se ajusta adecuadamente, se utiliza para describir la forma de la superficie a través de la gráfica de contornos y localizar, en el lugar en el que la pendiente de la superficie ajustada es cero, las coordenadas del punto estacionario, que es el punto que proporciona el valor óptimo de la variable respuesta. Si, por el contrario, el punto estacionario no se halla dentro del dominio experimental, se realizan nuevos experimentos en la dirección en la que éste se encuentra mediante el método de máxima pendiente en ascenso, que permite recorrer secuencialmente la trayectoria de la máxima pendiente hacia el máximo aumento de la respuesta (Myers et al., 2016). Frecuentemente, la estimación inicial de las condiciones de operación óptimas esta alejada del óptimo real, en este caso se desea moverse en las proximidades del óptimo. Una vez obtenidas las condiciones óptimas de operación del sistema, según el criterio establecido, éstas deben confirmarse experimentalmente.

3.2. Monitoreo de bioprocesos

Los procesos biotecnológicos son cruciales para el desarrollo de cualquier economía que busca asegurar una posición competitiva en el mercado. Esto incluye un gran rango de sectores, desde el farmacéutico, agroindustrial, alimenticio, bebidas, etc, y todos ellos, conllevan el cultivo de microorganismos bajo condiciones de operación controladas. El cultivo en un biorreactor es una de las operaciones más importantes del proceso productivo y también la más compleja para el monitoreo y control del mismo debido a la combinación de fenómenos físicos, químicos y biológicos que se llevan a cabo. De tal manera que, los biorreactores son sistemas multivariables, ya que durante su operación, hay sustratos que son consumidos y productos y metabolitos intermediarios que son generados en presencia de células vivas. Además, dichas células se encuentran en suspensión en el medio en cantidades que pueden variar desde la ausencia hasta la saturación.

En los últimos años, se ha avanzado en el monitoreo de bioprocesos mediante sensores y analizadores utilizados fuera de línea (*off-line*), en la línea (*on-line*) y en línea (*in-line*), de acuerdo a la localización del sistema analítico en relación con el biorreactor. Las mediciones fuera de línea implican un muestreo manual del fermentador y el análisis de la muestra con un equipo externo, lo que conlleva a un desfase de tiempo respecto al bioproceso. Las mediciones en la línea involucran muestreo automático pero la muestra es analizada fuera del biorreactor; sin embargo, durante un análisis en línea el sensor es insertado dentro del biorreactor. Actualmente, el monitoreo en línea de un biorreactor es considerado una parte esencial de un control efectivo de bioprocesos, el cual puede desembocar en incrementos de eficiencia, productividad, reproducibilidad, calidad, reducción de la contaminación ambiental y optimización de costos globales de producción (Alford, 2006). En general, los parámetros más frecuentes monitoreados en línea son temperatura, presión, pH, oxígeno disuelto, velocidad de agitación, velocidades de entrada y salida de líquidos y gases, entre otros, y se utilizan sondas adicionales que determinan dióxido de carbono disuelto, potencial óxido-reducción y densidad óptica (Schügerl, 2001). En el capítulo 2 y 3 se llevará a cabo el monitoreo de biorreactores dirigido a una primera aproximación al escalado de bioprocesos industriales.

3.3. Bioconversión de subproductos industriales

Las actuales prácticas agrícolas e industriales generan grandes cantidades de residuos de coste bajo o negativo, los cuales pueden ser utilizados para la producción de compuestos de valor añadido y reducir, así, su impacto ambiental. De esta manera, un determinado residuo de un proceso productivo es considerado un subproducto de aprovechamiento que puede formar parte de la materia prima de medios de cultivo

para la elaboración de otros productos industriales, a través de la fermentación por microorganismos. Subproductos tales como, melazas, suero de leche, residuos industriales derivados del procesamiento de maíz, cerveza, manzana, aceites, entre otros, o diferentes combinaciones de los mismos, pueden ser utilizados con interés biotecnológico en la producción de biomasa celular (Revillion et al., 2003), etanol (Akbas and Stark, 2016; Arshad et al., 2017), prebióticos (Belem and Lee, 1998), surfactantes (Almeida et al., 2017; Santos et al., 2010) y enzimas recombinantes (Darvishi et al., 2016; Yaman and Calik, 2016). Algunos de estos subproductos 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 obtención de productos de interés a bajo coste (Ferreira et al., 2010; Santos et al., 2010). Es por ello que, una alternativa atractiva para la producción de proteínas recombinantes de alto valor añadido, como la ScAGal, puede ser el uso de medios de cultivo sostenibles y baratos basados en melazas de remolacha y suero de leche que serán discutidos en los capítulos 2 y 3 de la presente Tesis Doctoral.

3.3.1. Melazas de remolacha

En España, el azúcar comercial se obtiene, principalmente, a partir del cultivo de la remolacha azucarera. En el año 2015, en España se cultivaron 37600 hectáreas, con una producción de unos 3.6 millones de toneladas para obtener alrededor de 482000 toneladas de azúcar (MAPAMA, 2016). Durante el proceso de elaboración del azúcar se genera alrededor de 4 kg de melaza por cada 100 kg de remolacha, lo que implica un volumen económico destacable dentro de la industria agroalimentaria española. La melaza es el líquido oscuro y viscoso producido por la industria azucarera como desecho derivado del procesamiento de la remolacha, del cual no es posible cristalizar más azúcar (Figura 4). La composición química de esta melaza es muy heterogénea ya que depende, considerablemente, del tipo de suelo de la zona de producción, condiciones climáticas, período de cultivo, variedad y estado de calidad de la remolacha en el momento del procesamiento, etc., así como de la tecnología industrial aplicada (Baquero Franco, 1987). Los azúcares de la melaza representan del orden del 80% de su contenido en materia seca, donde el principal componente es la sacarosa, aunque también contiene oligosacáridos (rafinosa), ácidos orgánicos (málico, oxálico, láctico, acotínico y cítrico), proteínas solubles (aunque la proporción de aminoácidos esenciales es muy baja), betaína y minerales (sodio, cloro, potasio). La melaza es empleada para la producción de etanol y levadura de panadería a través de la fermentación por microorganismos y como suplemento energético de alimentos y piensos (Baquero Franco, 1987).

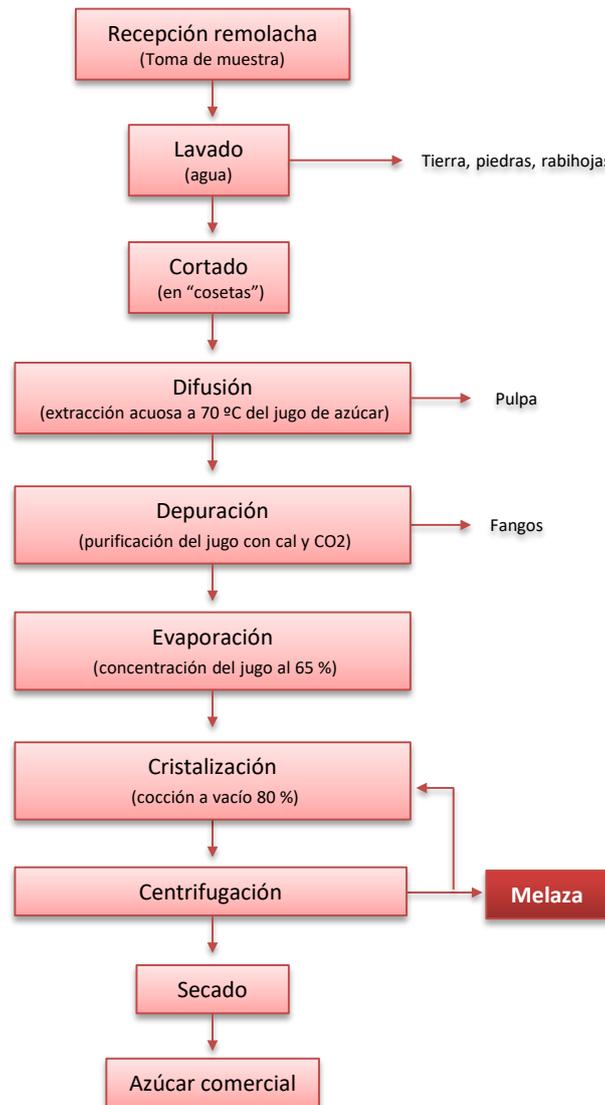


Figura 4. Esquema de un diagrama de flujo del proceso de fabricación de azúcar. Tras la recepción y toma de muestra (determinación del contenido en azúcar), la remolacha es sometida a varios procesos que incluyen lavado, cortado en rebanadas de 2-3 mm (cosetas), difusión, purificación, concentración en evaporadores y cocción hasta obtener los cristales de sacarosa. Finalmente, la centrifugación permite separar el líquido denso que no ha sido posible cristalizar conocido como melaza.

3.3.2. Suero de leche

La importancia del sector lácteo en general y de la industria quesera en particular es evidente para la industria alimentaria española. En el año 2015 se produjeron más de 7.864 millones de litros de leche, siendo Galicia la comunidad autónoma más productora alcanzando el 33,7 % de la producción láctea española (MAPAMA, 2016). Sin embargo, 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 Galicia. Los datos proporcionados por la Consellería de Economía, Empleo e Industria (<http://galiciacalidad.es/ES/>

certificación/Quesos) con respecto a la producción de quesos con denominaciones de origen protegido (Arzúa-Ulloa, Cebreiro, Queixo Tetilla y San Simón da Costa) estiman una producción de 5 millones de kilos en 2014. Esto supone una generación de unos 50 millones de litros de suero de leche al año (a razón de 10 litros de suero por kg de queso), concentrándose esta producción, en las provincias de A Coruña y Lugo.

El suero de leche o lactosuero, es el líquido resultante tras la coagulación de la caseína durante la fabricación del queso. Si el proceso de precipitación de la caseína se realiza a pH 6-7 se obtienen sueros dulces, mientras que si se realiza a pH < 5 se obtienen sueros ácidos. En cualquier caso, el lactosuero representa sobre el 85-90% del volumen de la leche y retiene el 55 % de sus nutrientes, donde destacan lactosa (4.5-5 % p/v), proteínas solubles (0.6-0.8 % p/v), lípidos (0.4-0.5 % p/v), sales minerales (8-10 % de extracto seco), y otros componentes minoritarios como ácidos orgánicos (láctico, cítrico) y vitaminas del grupo B (González Siso, 1996). Dado el gran valor nutritivo, muchas son las aplicaciones de algunos de los componentes de este subproducto dirigido a la elaboración de bebidas y alimentos lácteos, fórmulas infantiles, productos cárnicos, panificados, confitería y productos farmacéuticos (Parra Huertas, 2009). El fraccionamiento del suero permite obtener concentrados de proteína de lactosuero (WPC) mediante ultrafiltración que, posteriormente, son evaporados y liofilizados para uso alimentario (Figura 5).

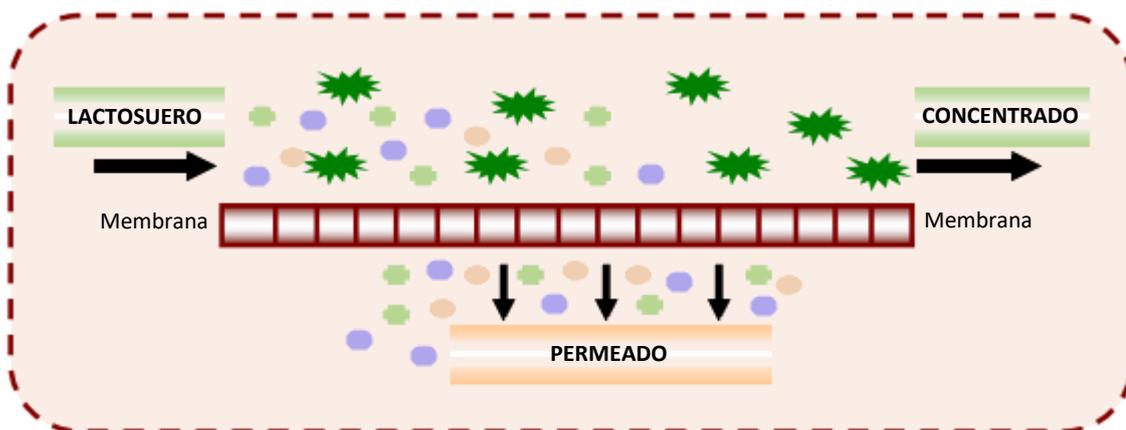


Figura 5. Esquema de flujos durante un proceso de fraccionamiento mediante ultrafiltración. Los WPC son elaborados mediante ultrafiltración del lactosuero a través de una membrana semipermeable, la cual permite pasar selectivamente materiales de bajo peso molecular como agua, iones y lactosa (permeado), mientras retiene materiales de peso molecular alto como la proteína (concentrado). Imagen modificada, (Parzenese, 2008).

Sin embargo, en la actualidad, debido al elevado volumen de suero que es generado a diario, el lactosuero se continúa desechando y formando parte de efluentes de industrias lácteas resultando en un serio problema medioambiental por su elevada carga orgánica (DBO= 30.000-60.000 ppm) (González Siso, 1996). Además, aquellos sueros que poseen un mayor contenido salino (sueros ácidos) no son ni

siquiera aptos para el desecado y no existe ningún sistema para su tratamiento. Nuevas alternativas de tratamiento recurren al uso de los permeados de suero para la producción de etanol, proteína unicelular de levadura (SCP), levadura de panadería, exopolisacáridos, ácidos orgánicos, a través del cultivo de microorganismos del género *Kluyveromyces sp.* (Parra Huertas, 2009).

4. Producción heteróloga de proteínas recombinantes

La biotecnología se fundamenta en el uso de microorganismos o cultivos celulares para la producción de enzimas y otras proteínas, las cuales son muy empleadas en la vida cotidiana. En el 2014, el líder del mercado de enzimas recombinantes fue Novozymes con una cuota del 48 %, seguido por Danisco (21 %), DSM (6 %), AB Enzymes (5 %) y BASF (4 %), donde el 31 % de las ventas era de enzimas de limpieza del hogar, seguido de cerca por las enzimas de alimentos y bebidas (29 %) y otras (13 %) (Spohner et al., 2016). Son muchas las enzimas recombinantes expresadas en diferentes hospedadores procariotas y eucariotas, pero a menudo la producción heteróloga de enzimas funcionales requiere la selección de un sistema de expresión apropiado. En la producción de muchas proteínas eucariotas, entre ellas proteínas humanas, es necesaria la presencia de modificaciones postraduccionales que incluyen: procesamiento proteolítico de péptidos señal, formación de enlaces disulfuro, ensamblaje de subunidades, acilación y glicosilación. Si la proteína soluble puede secretarse al medio extracelular (dirigida por un péptido señal), esto facilitará su posterior purificación mediante etapas sencillas y rentables. Además, alto rendimiento de producto, integración genómica estable de casetes de expresión, rentabilidad, alta densidad celular, rápido crecimiento en medios definidos y ausencia tanto de marcadores genéticos bacterianos que confieren resistencia a antibióticos, como de endotoxinas, carcinógenos y virus, son características a tener en cuenta en un hospedador dirigido a la producción industrial de proteínas heterólogas. Por otro lado, en la industria farmacéutica y alimentaria es requisito exigente que el organismo productor de la enzima recombinante sea generalmente considerado seguro (GRAS) catalogado por la *US FDA*. Las levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis* son candidatos favorables a presentar estas aptitudes, comparten la fácil manipulación genética gracias a la disponibilidad de un genoma completamente secuenciado y ambas han sido muy utilizadas en la producción de productos biofarmacéuticos (Nielsen, 2013; Van Ooyen et al., 2006).

4.1. Secreción de proteínas heterólogas por sistemas de expresión de levaduras

S. cerevisiae es, actualmente, el sistema de modelo eucariota en bioquímica de proteínas, ingeniería metabólica y la producción de bebidas fermentadas y, *K. lactis*, se ha vuelto cada vez más interesante en investigación y biotecnología, especialmente

para la producción industrial de proteínas, debido a que alcanza rápidamente altas densidades de cultivo y ofrece elevados rendimientos de proteínas recombinantes (Van Ooyen et al., 2006). Se han utilizado varias secuencias señal endógenas, heterólogas y sintéticas para secretar proteínas en estas levaduras, aunque la conservación entre secuencias señal eucariotas es tan fuerte que los péptidos señal nativos son a menudo suficientes cuando están presentes en una proteína recombinante. Más de 40 proteínas recombinantes diferentes se han expresado, producido y secretado por *S. cerevisiae*, siendo el factor α (una hormona de la levadura implicada en el apareamiento) el más estudiado y más utilizado para la secreción eficiente de proteínas recombinantes (Nielsen, 2013). Lo mismo sucede con *K. lactis* que secreta naturalmente poca proteína, pero tiene el potencial de secretar proteínas grandes a través de la pre-secuencia de la α -subunidad de la toxina *killer* de esta levadura (Spohner et al., 2016). Estas secuencias señal presentan un sitio de reconocimiento de la proteasa Kex en el extremo amino terminal localizado entre la secuencia señal y la proteína heteróloga que permite la escisión del péptido señal durante la maduración de la proteína (Figura 6). De este modo, la secuencia señal se escinde del polipéptido deseado durante la maduración y se secreta de la célula. En el capítulo 1 de esta tesis se discutirá el sistema de secreción que permita la mayor liberación de la proteína heteróloga ScAGal al medio extracelular utilizando como hospedador una cepa de *S. cerevisiae*.

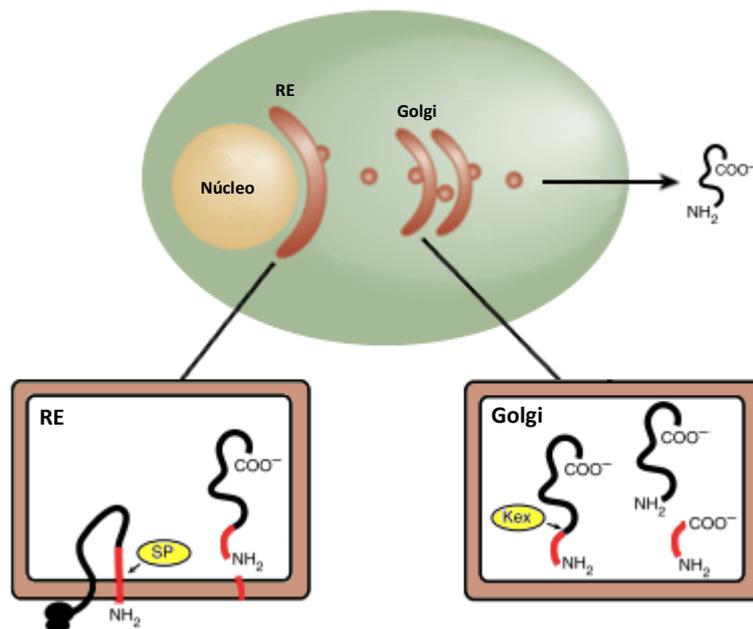


Figura 6. Procesamiento de proteínas heterólogas secretadas en un sistema de expresión de levaduras. Tras la expresión de la proteína heteróloga, el péptido señal (rojo) dirige la translocación de la proteína hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE) y se escinde el pre-dominio por señal peptidasa (SP). Las vesículas secretoras (círculos) transportan la proteína al Golgi, donde la endoproteasa Kex escinde el pre-dominio, liberando la forma madura de la proteína deseada al medio extracelular (imagen modificada; New England Biolabs, Inc., 2005).

4.2. Metabolismo energético de levaduras

Las levaduras pueden metabolizar una gran variedad de fuentes de carbono, pero la glucosa y la fructosa son sus preferidas. Cuando uno de estos azúcares está presente, las enzimas requeridas para la utilización de fuentes alternativas de carbono se sintetizan a bajas tasas o ninguna, fenómeno conocido como represión catabólica. Una alta concentración de glucosa en el medio de cultivo, conlleva a la expresión de los genes específicos implicados en el ciclo de *Krebs* y la fosforilación oxidativa. El ciclo del glioxilato, la gluconeogénesis y el metabolismo de los otros azúcares se reprimen. Simultáneamente, se induce la expresión de genes involucrados en la fermentación alcohólica y se obtendrá el consumo preferencial de glucosa sobre las otras fuentes de carbono (Rodrigues et al., 2015).

La diferencia más importante entre *S. cerevisiae* y *K. lactis* se refiere a la regulación del metabolismo del carbono. Ambas levaduras pertenecen al grupo aeróbico facultativo y metabolizan la glucosa por vías oxidativas y oxidorreductoras; sin embargo, en condiciones aeróbicas, *S. cerevisiae* es una levadura fermentativa y *K. lactis* es respiratoria (González-Siso et al., 1996). La fermentación aeróbica, capacidad para producir etanol en condiciones aerobias bajo la presencia de glucosa, se conoce como el efecto *Crabtree*. El efecto *Crabtree* se explicó inicialmente como la consecuencia de la inhibición de la respiración por sustratos fermentativos y, después, como la saturación del flujo de carbono a través de la glicólisis que excede la capacidad del ciclo de *Krebs* para oxidar completamente el piruvato producido, lo que favorece su degradación por la vía de la piruvato descarboxilasa que conlleva a la formación de etanol, incluso en condiciones aeróbicas (Figura 7). El efecto *Crabtree* tiene una influencia negativa significativa en aplicaciones industriales dirigidas a la producción de proteínas heterólogas. La célula obtiene mucha más energía mediante el metabolismo oxidativo o respiración (38 moléculas de ATP) que mediante el metabolismo oxido-reductor o fermentación (2 moléculas de ATP), aunque ambos metabolismos pueden coexistir. Cada molécula de piruvato que es reducida a etanol no está disponible para su conversión en el ciclo de *Krebs* y por lo tanto, el ATP y el rendimiento de biomasa es mucho menor en levaduras *Crabtree*-positivas que en levaduras negativas (Breunig et al., 2000). *S. cerevisiae* es el prototipo de una levadura *Crabtree* positiva, mientras que *K. lactis* es *Crabtree* negativa, aunque las condiciones de cultivo (aireación, fuente de carbono, fase del cultivo, limitaciones de nutrientes) parecen ser una característica general para determinar la preferencia metabólica de estas levaduras (González-Siso et al., 2000). En el capítulo 2 y 3 se estudiará el metabolismo energético de las cepas de *S. cerevisiae* y *K. lactis*, respectivamente, empleadas en esta tesis para la producción heteróloga de la ScAGal.

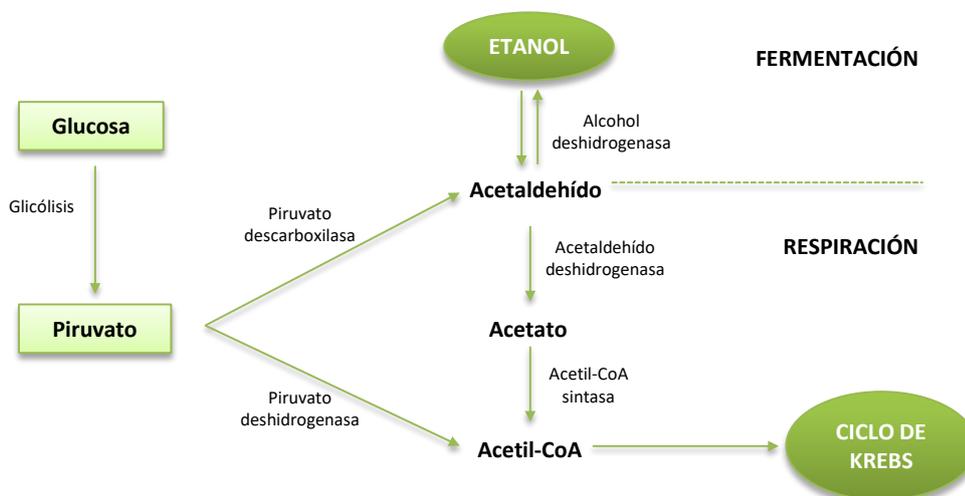


Figura 7. Destino del piruvato durante el metabolismo energético de levaduras. En presencia de glucosa se alcanzan grandes concentraciones de piruvato intracelular, un intermediario glicolítico, que es reducido a etanol vía piruvato descarboxilasa (metabolismo fermentativo), en lugar del complejo piruvato deshidrogenasa, que lleva directamente a acetil-CoA que es dirigido hacia el ciclo de *Krebs* (respiración). Dado que la capacidad de las reacciones posteriores que permitirían la transformación del acetaldehído formado por la piruvato descarboxilasa en acetil-CoA es limitada, esto favorece finalmente la formación de etanol aún en condiciones aeróbicas (Efecto *Crabtree*). Ambos destinos de piruvato pueden coexistir simultáneamente dando lugar a un patrón mixto (respirofermentativo) de metabolismo energético.

5. Inmovilización de enzimas

La aplicación industrial de enzimas a menudo se ve obstaculizada por la falta de estabilidad operativa a largo plazo, dado que las enzimas son biocatalizadores solubles que suelen ser inestables y pueden estar fuertemente inhibidas por sustratos y productos. Además, por razones técnicas y económicas, la mayoría de los procesos catalizados por enzimas requieren la reutilización o el uso continuo del biocatalizador para que el proceso del reactor sea rentable. Una forma inmovilizada del biocatalizador facilita el diseño del reactor, el control de la reacción y permite ahorros significativos en el consumo de enzimas, dado que la simple filtración detiene la reacción y permite la separación del producto final que repercute en la mejora de la calidad del mismo. Es por ello que, la inmovilización enzimática se hace un requisito indispensable para el uso de un biocatalizador a nivel industrial, aunque la estabilidad del derivado enzimático final debe ser lo suficientemente alta como para permitir esta reutilización (Mateo et al., 2007).

Existen diferentes estrategias de inmovilización basadas tanto en métodos químicos, donde intervienen enlaces entre el biocatalizador y un soporte preexistente (adsorción, unión covalente) o mediante agentes entrecruzantes (*cross-linking*); y físicos, donde el biocatalizador es encapsulado en geles sin establecer una interacción con los mismos (encapsulación o inclusión). Además, los procedimientos de inmovilización pueden ser reversibles (adsorción) o irreversibles (unión covalente,

cross-linking, encapsulación), siendo los últimos más estables con el inconveniente de no permitir la separación del biocatalizador unido al soporte sin destruir la actividad biológica de la enzima o el soporte (Brena and Vieira-Batista, 2006). Se han descrito numerosas referencias sobre la inmovilización de α -Gals de diferente origen mediante encapsulación con carragenanos (Girigowda et al., 2007) y bolas de alcohol polivinil-alginato (Patil et al., 2009), inmovilización covalente con soportes de agarosa (Filho et al., 2008), sílica gel (Falkoski et al., 2009), quitosano (Kulkarni et al., 2006), amberlita (Singh and Kayastha, 2012b) y nanopartículas de grafeno (Singh et al., 2014).

Centrándonos en la inmovilización química que implica la fijación enzimática a través de matrices que conforman un soporte preexistente, las características de dicha matriz (tamaño de partícula, resistencia mecánica, comportamientos de hinchamiento y compresión) van a determinar el funcionamiento de los sistemas inmovilizados y el tipo de reactor industrial. Los soportes no porosos muestran pocas limitaciones difusionales (impedimentos de la entrada del sustrato al centro activo de la enzima), pero tienen una baja capacidad de carga enzimática. Sin embargo, los soportes porosos presentan una mayor área superficial para admitir cargas más altas y, además, el biocatalizador inmovilizado estará más protegido del medio que le rodea. Esto se debe a que las moléculas enzimáticas permanecen completamente dispersas, evitando la agregación, autólisis o proteólisis por proteasas del extracto (que también se dispersarán e inmovilizarán) y no estarán en contacto con ninguna interfase hidrófoba externa, como burbujas de aire originadas por el suministro de gases requeridos o promovidos por agitación fuerte del reactor, las cuales, pueden producir la inactivación enzimática de las proteínas solubles. Todo ello conlleva a una estabilización operativa del biocatalizador inmovilizado, incluso sin afectar realmente a la estabilidad estructural de la enzima (Mateo et al., 2007). La agarosa es una matriz con alta porosidad, carácter hidrófilo e inerte, facilidad de derivatización y disponibilidad comercial, con la limitación del alto costo que puede ser solventado con métodos reversibles que permiten la regeneración y reutilización de la matriz. Además, la derivatización con grupos reactivos altamente activados (grupos glioxilo o epóxido) permite, también, la unión covalente multipunto a través de brazos espaciadores cortos con los residuos superficiales de la enzima que promueve la rigidez de la estructura enzimática inmovilizada estabilizándola ante cualquier cambio conformacional inducido por agentes distorsionantes (calor, disolventes orgánicos, valores de pH extremos). Por otro lado, la selección adecuada de las condiciones de inmovilización es crítica para maximizar la unión covalente multipunto: tiempo de reacción (para establecer una alineación correcta de grupos reactivos implicados); pH, la reactividad a valores alcalinos de los nucleófilos de la proteína (los grupos amino terminales presentan un pK_a entre 7 y 8, mientras que los grupos Lys expuestos tienen un pK_a superior a 10.5); temperatura moderadamente alta, siempre que sea posible,

(favorecerá la vibración aumentando la posibilidad de unión); tampones que no interfieran en la reacción (el borato puede interferir en la unión aldehído-amina, los compuestos amino, tales como Tris o etanolamina, pueden modificar soportes epoxi o competir con el Lys por grupos aldehído); inhibidores y otros protectores proteicos para reducir pérdidas de actividad ocasionadas por la inmovilización. Finalmente, este tipo de soportes, también es compatible con el diseño de un proceso de inmovilización altamente selectivo, como es la cromatografía de afinidad a metal quelato inmovilizado (IMAC), que permite enlazar etapas de purificación e inmovilización para disponer de biocatalizadores puros inmovilizados y evitar así, reacciones secundarias no deseadas provocadas por contaminantes de las preparaciones enzimáticas brutas (Ardao et al., 2006).

Por lo tanto, la aplicación industrial de biocatalizadores inmovilizados está íntimamente relacionada con la sencillez, rentabilidad, estabilidad operacional y la estabilización de enzimas. En el capítulo 4 se presenta el desarrollo práctico de diferentes estrategias de inmovilización de preparaciones parcialmente purificadas de la ScAGal utilizando soportes de agarosa mono y bifuncionales.

OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral se proponen los siguientes objetivos:

- I. Expresión y purificación de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- II. Caracterización mediante cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alta resolución de la especificidad de sustrato de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando galactósidos naturales (melibiosa, rafinosa, estaquiosa, galactomanano de algarrobo) y galactomano-oligosacáridos sintéticos.
- III. Construcción de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* deficiente en la enzima nativa invertasa dirigida hacia la mejora de la producción heteróloga de α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de melazas de remolacha.
- IV. Integración genómica de varias copias en tándem del gen que codifica para la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* en un sistema de expresión de *Kluyveromyces lactis* para la producción heteróloga en medios basados en lactosuero.
- V. Optimización de la producción de α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* mediante la Metodología de Superficie de Respuesta utilizando medios convencionales y medios sostenibles a base de melazas de remolacha y lactosuero.
- VI. Estudios preliminares de diferentes mecanismos de inmovilización enzimática para la mejora de la estabilidad operacional de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

CAPÍTULO 1

Optimización del proceso productivo de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* y su aplicación en la degradación de oligosacáridos de la familia de la rafinosa

Resumen

El gen *MEL1* que codifica para la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ScAGal) fue clonado y expresado en la cepa de *S. cerevisiae* BJ3505. Se diseñaron diferentes construcciones con la finalidad, por una parte, de obtener el grado de purificación necesario para los ensayos de caracterización enzimática y, por otra parte, intentar mejorar el proceso productivo de la enzima. La ScAGal presenta mayor especificidad por el sustrato sintético *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (PNPG) seguido de los glucósidos naturales melibiosa, rafinosa y estaquiosa, y sólo actúa sobre la goma de algarrobo tras el tratamiento previo con β -manosidasa. Además, la enzima exhibe una fuerte resistencia a proteasas mostrando una notable activación en presencia de las mismas. La hidrólisis de enlaces galactosa unidos a residuos de manosa no reductora terminal de galactomano-oligosacáridos sintéticos confirma que la ScAGal pertenece al primer grupo de α -galactosidasas según la especificidad de sustrato. La optimización de las condiciones de cultivo mediante el modelo estadístico de Superficie de Respuesta permitió mejorar la productividad hasta más de 10 veces al aumentar la concentración de la fuente de carbono y la aireación del medio de cultivo, y hasta 20 veces al alargar el tiempo de cultivo a 216 h ($R^2 = 86.16\%$, 95 % de nivel de confianza). Las características anteriormente citadas, así como la mejora en la productividad conseguida contribuyen a que la ScAGal sea una buena candidata para su aplicación en la eliminación de oligosacáridos de la familia de la rafinosa presentes en diversos productos de la industria alimentaria.

1. Introducción

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOs), constituidos principalmente por rafinosa y estaquiosa, son azúcares complejos que contienen uno o más residuos de galactosa unidos por enlaces α -1,6-glicosídicos a una sacarosa. Estos α -galactósidos, funcionan como polisacáridos de reserva almacenados en las vacuolas de muchos vegetales, especialmente en legumbres y cereales. Las α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) pueden catalizar la liberación de sustituyentes α -D-galactosil de azúcares como la melibiosa, rafinosa y estaquiosa o incluso galactomananos poliméricos. Dado que los animales monogástricos (incluido el hombre) carecen de α -galactosidasa pancreática, estos carbohidratos indigeribles, identificados como factores antinutricionales, pueden provocar síntomas de flatulencia y otros desórdenes gastrointestinales (Di Stefano et al., 2007). Este hecho, unido al incremento del consumo de productos de soja y derivados de otras legumbres en la alimentación humana y animal, contribuye a la creciente importancia del uso de α -galactosidasas en la degradación de RFOs para mejorar la eficiencia y el valor nutritivo de alimentos (Levine et al., 2004) y piensos (Ghazi et al., 2003a). También en la industria azucarera,

estas enzimas permiten aumentar el rendimiento de sacarosa tras hidrólisis de la rafinosa la cual dificulta la cristalización del azúcar de mesa (Linden, 1982). Los galactomananos o “gomas” se utilizan como aditivos para mejorar la viscosidad de muchos alimentos al modificar su textura y consistencia sin afectar a las características propias de los mismos (Goulas et al., 2016). Dependiendo del grado de polimerización que se desee, las α -galactosidasas actúan sinérgicamente junto a β -mananasas y β -manosidasas en la rotura de estos polisacáridos (Malgas et al., 2015). Además, las α -galactosidasas también pueden sintetizar α -GOS a través de reacciones de transglicosilación que se producen en condiciones de supersaturación de un sustrato. Algunos de estos α -GOS pueden ser utilizados como agentes terapéuticos para prevenir infecciones bacterianas o aportar un valor comercial añadido a los productos que los contienen como alimentos prebióticos (Gong et al., 2016; Morel et al., 2015; Wang et al., 2014). Si bien las α -galactosidasas están implicadas en muchas otras aplicaciones biotecnológicas como: producción de pulpa y papel (Clarke et al., 2000), biocombustibles (Gray et al., 2006), conversión de grupos sanguíneos (Singh and Kayastha, 2012a), tratamiento de la enfermedad de Fabry (Schiffmann, 2009), ... en este trabajo se aborda la capacidad de estas enzimas en la hidrólisis de RFOs y galactomananos por su implicación en la población actual debido al incremento en el consumo de alimentos que los contienen.

La ScAGal pertenece a la familia 27 de glicosil hidrolasas (GH27) por su similitud de secuencia aminoacídica y estructura con otras α -galactosidasas de eucariotas (Cantarel et al., 2009). Es una proteína extracelular gracias a la presencia de un péptido señal que la dirige a la vía secretora (Liljeström, 1985) donde modificaciones postraduccionales conducen a la proteína madura con un 30-40% de su peso molecular en carbohidratos (Sumner-Smith et al., 1985). Presenta una temperatura óptima de 40 °C ($t_{1/2}$ 50 °C = 14 h, $t_{1/2}$ 60 °C = 30 min, $t_{1/2}$ 70 °C = 5 min) y pH óptimo de 4, siendo estable en un rango de pH de 2–7.5 reteniendo más de un 80 % de su actividad (Fernández-Leiro, 2011). La mayoría de las α -galactosidasas aisladas de eucariotas son enzimas ácidas incluidas en la familia GH27. La estabilidad a pH ácido-neutro es compartida con otras enzimas mesófilas (Geng et al., 2015; Kim et al., 2003; Liu and He, 2012; Viana et al., 2006; Yang et al., 2015) mostrando una ventaja apropiada para aplicaciones en la industria alimentaria. Las familias GH son poliespecíficas, es decir, muchas enzimas que actúan sobre un sustrato específico pueden encontrarse en diferentes familias de GH. Otra clasificación establece un primer grupo de α -galactosidasas que sólo son específicas de α -galactósidos pequeños, tales como melibiosa y RFOs, y un segundo grupo que actúa tanto sobre sustratos pequeños como galactomananos poliméricos (Dey et al., 1993). Sin embargo, atendiendo a su especificidad sobre galactomano-oligosacáridos sintéticos, las α -galactosidasas se pueden clasificar en tres grupos dependiendo de si permiten

liberar la galactosa terminal o interna de dichos sustratos (Mitsunori et al., 2001). El uso de este tipo de sustratos sintéticos permite determinar la posición exacta de rotura del enlace α -1,6-glicosídico entre un residuo D-galactosil y un residuo D-manosa de la cadena lineal de β -1,4-D-manosas del galactomanano, pero debido a la dificultad para ser adquiridos hay pocos trabajos que reportan este tipo de datos (Janika et al., 2010; Kim et al., 2003).

Existen muchas referencias de α -galactosidasas aisladas de diferentes organismos y recientemente, se han identificado y caracterizado muchas de ellas con posible potencial industrial destacable sobre la hidrólisis de RFOs y galactomananos (Guo et al., 2016; Hu et al., 2017; Schröder et al., 2016; Zheng et al., 2016). Sin embargo, en la mayoría de los casos, el proceso de purificación de la enzima requiere de muchas etapas y hay pocos estudios que desarrollen una optimización de las condiciones de producción para que sea rentable su uso a escala industrial (Liu et al., 2007). La metodología de superficie de respuesta (MSR) permite conocer las variables influyentes y sus interacciones en procesos biotecnológicos (Dagbagli and Goksungur, 2008; Dilipkumar et al., 2014; Liu et al., 2007), ya que el método tradicional de variar un factor cada vez puede implicar más experimentos de los necesarios. Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende también explorar diferentes sistemas de secreción y purificación de la proteína para la mejora en la obtención de la misma y la posibilidad, mediante experimentos diseñados estadísticamente, de alcanzar la máxima producción de ScAGal dirigida a un potencial uso industrial.

2. Metodología

2.1. Cepas, vectores y medios de cultivo

Escherichia coli XL1-Blue [*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]*], (*Stratagene Cloning Systems*) fue utilizada en la propagación de plásmidos mediante técnicas habituales de biología molecular (Sambrook and Russell, 2001) empleando el medio de cultivo LB (1% bacto triptona, 0.5 % extracto levadura, 0.5 % NaCl) suplementado con 100 mg/L ampicilina. *S. cerevisiae* BJ3505 [*pep4:: HIS3, prb-Δ1.6R HIS3, lys2-208, trp1-Δ101, ura 3-52, gal2, can1*] (*Eastman Kodak Company*) fue el hospedador para la expresión del gen de la ScAGal. Los medios LB y YPD (1% extracto levadura, 0.5% bacto peptona, 0.5% glucosa) se emplearon para el crecimiento y mantenimiento de las cepas XL1-Blue y BJ3505, respectivamente. El plásmido YEpFLAG-1 [*amp^r ori 2μ FLAG TRP1*] (*Eastman Kodak Company*) y las construcciones de plásmidos YEpMEL1, YEpMEL1His y YEpMEL1Flag descritas previamente (Fernández-Leiro, 2011), se utilizaron como vector para el clonaje y expresión de variantes del gen de la ScAGal en *S. cerevisiae* respectivamente (Figura 1). Como medio de cultivo selectivo se empleó un medio completo sin el

aminoácido triptófano (CM-Trp) (Zitomer and Hall, 1976) y el medio YPHSM modificado (1% extracto levadura, 8% bactopectona, 1% glucosa, 3% glicerol) fue el medio de alta estabilidad usado para la expresión de la proteína heteróloga en levaduras. En la preparación de medios sólidos en placa, los medios de cultivo fueron suplementados con 2 % de agar. Todos los componentes de los medios empleados en este trabajo fueron esterilizados por autoclavado a 121 °C durante 20 min, excepto la ampicilina que fue añadida posteriormente después de ser esterilizada a través de filtros de 0.22 micras de tamaño de poro (*Sartorius AG*).

2.2. Construcción de variantes del gen de la ScAGal

El gen *MEL1* (*GeneBank X03102*) que codifica para la ScAGal (*Uniprot P04824*) fue amplificado mediante PCR sin la señal de secreción endógena a partir del vector YEp*MEL1His* [*amp^r ori 2μ MEL1His TRP1*]. En la reacción de PCR se utilizaron 50 ng de ADN molde, 1.55 min de tiempo de copia, 57 °C de anillamiento y el resto de condiciones según las especificadas por el fabricante de la ADN polimerasa de alta fidelidad *Vent DNA polimerase (Biolabs)*. Los productos de PCR amplificados y purificados (*GenJET Gel Extraction Kit, Thermo Fisher Scientific*) se clonaron en el vector YEpFLAG-1, previamente linealizado con *Sall* o *KpnI* y *SacII*, por recombinación homóloga en células BJ3505 competentes transformadas mediante el método de acetato de litio (Ito et al., 1983) (Figura 1). Las colonias transformantes fueron seleccionadas en CM-Trp por complementación de la auxotrofia de dicha cepa y la identificación de recombinantes por análisis de PCR de las colonias transformantes utilizando la Taq polimerasa (*DreamTaq polimerase, Thermo Fisher Scientific*). Finalmente, tras la propagación y purificación (*GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Fisher Scientific*) de los candidatos seleccionados, cada una de las variantes del gen de interés fue verificada por secuenciación (Servicios de Apoyo á Investigación, Universidade da Coruña). En la tabla 1 se detallan los oligonucleótidos empleados como cebadores en la reacción de amplificación y secuenciación, así como las construcciones generadas.

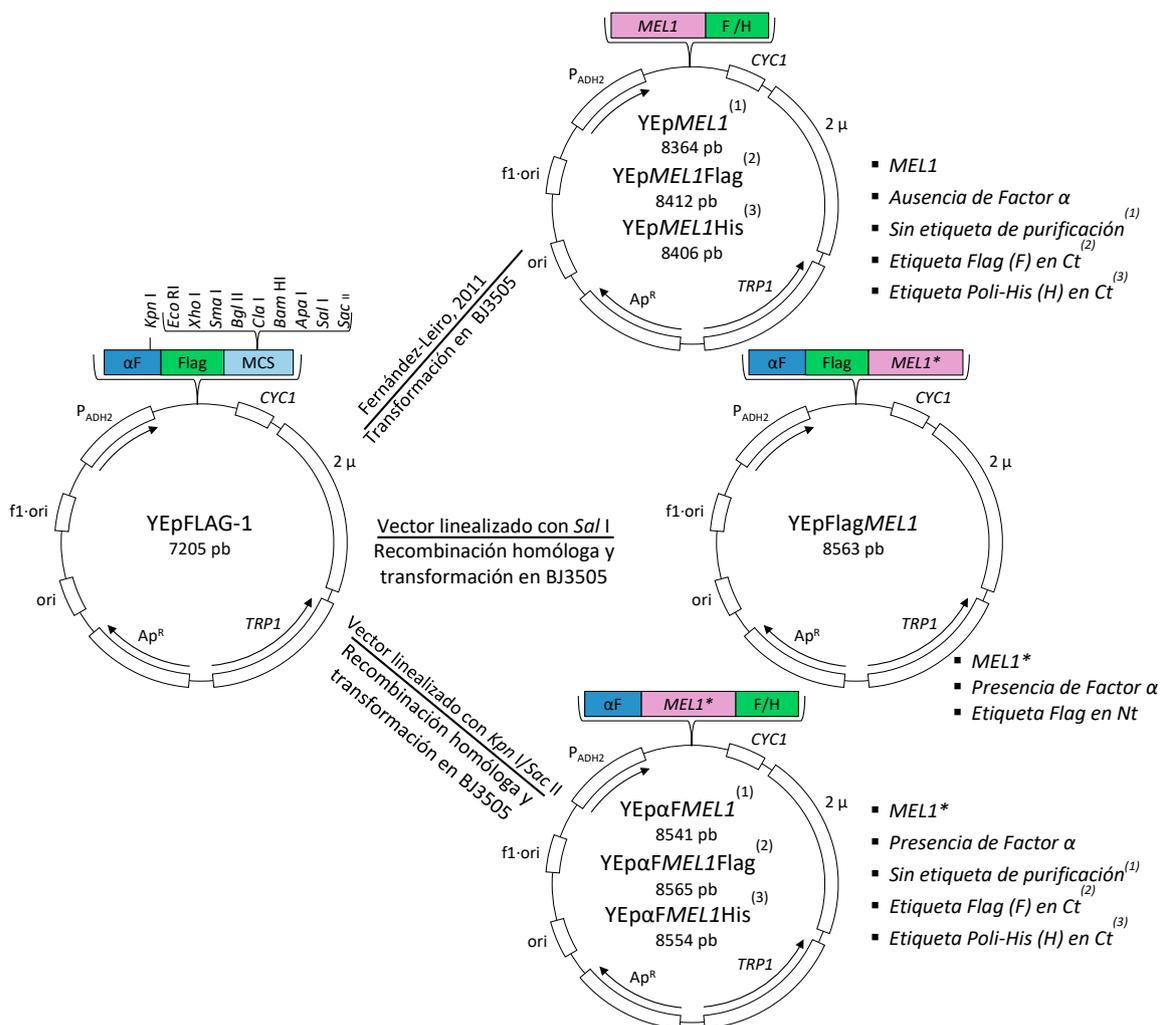
2.3. Expresión heteróloga de variantes del gen *MEL1* en *S. cerevisiae* BJ3505

Las células BJ3505 transformadas con los plásmidos YEp*MEL1*, YEp*MEL1His*, YEp*MEL1Flag*, YEpFlag*MEL1*, YEpα*FMEL1*, YEpα*FMEL1His* y YEpα*FMEL1Flag*, fueron sembradas en placa CM-Trp e incubadas a 30 °C durante 48–72 horas. En cada caso, se seleccionó una única colonia para preparar un precultivo en CM-Trp hasta fase estacionaria (30 °C, 250 r.p.m, 16 h) que fue utilizado como inóculo de medios YPHSM hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5. Los cultivos fueron llevados a cabo por triplicado en matraces *Erlenmeyer* con 20 % de volumen de medio a 250 rpm y 30 °C.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de variantes del gen *MEL1*.

Cebador	Secuencia	Dirección	Estrategia
MAC3	5'ccagcattgtgctaaagaagaaggggtaccttggataaaagaGT GTCTCCGAGTTACAATGGC	Directo	YEp α FMEL1, YEp α FMEL1His, YEp α FMEL1Flag
MAC4	5'tgggacgctcgacggatcagcggccgcttaTCAGTGGTGGTGG <u>TGGTGGTGAGAAGAGGGTCTCAACCTATA</u>	Inverso	YEp α FMEL1His
MAC5	5'tgggacgctcgacggatcagcggccgcttaTCATTGTCATCGT <u>CATCCTTGTAGTCAGAAGAGGGTCTCAACCTATA</u>	Inverso	YEp α FMEL1Flag
MAC6	5'cccgggagatctatcgatggatcgggccGTGTCTCCGAGTT ACAATGGC	Directo	YEpFlagMEL1
MAC7	5'tgggacgctcgacggatcagcggccgcttaTCAAGAAGAGGG TCTCAACCT	Inverso	YEp α FMEL1, YEpFlagMEL1
AVV186	5'CACTCGAAATACTCTTACTACTGC	Directo	Secuenciación de insertos
AVV187	5'GTGTACGCATGTAACATTATACTG	Inverso	Secuenciación de insertos

Las secuencias en minúsculas corresponden a zonas de recombinación en el vector YEpFLAG-1 (en negrita se identifica la secuencia de la endoproteasa Kex). Las etiquetas de purificación (péptido Poli-His o péptido Flag) están subrayadas. El diseño de cebadores se realizó mediante el programa *NetPrimer Analyse* (Premier Biosoft).


Figura 1. Construcción de plásmidos utilizados en la mejora de la expresión del gen de la ScAGal. *MEL1**, gen *MEL1* sin señal de secreción endógena; Ct, extremo carboxilo terminal; Nt, extremo amino terminal; α F, señal de secreción de levaduras Factor α .

Se tomaron muestras a intervalos de tiempo regulares para determinar crecimiento celular, actividad enzimática y estabilidad plasmídica. Un análisis ANOVA simple se utilizó para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los sistemas de expresión diseñados (*StatGraphics Plus* versión 5.1). La siembra de muestras diluidas del cultivo en YPHSM sobre placas CM y CM-Trp hasta obtener colonias aisladas permitió estimar el porcentaje de colonias viables positivas, Trp+ (% estabilidad plasmídica = $(UFC_{CM-Trp}/UFC_{CM}) * 100$).

2.4. Purificación de la ScAGal

Se partió de un cultivo de 1L de YPHSM de la cepa BJ3505 transformada con YEpMEL1His crecida durante 96 horas. El cultivo fue centrifugado (7000 r.p.m, 10 min, 4 °C) y el sobrenadante recuperado, conteniendo la proteína extracelular, fue dializado y concentrado por filtración tangencial (*TFF, Millipore*) con PBS (*Phosphate Buffer Solution: Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 100 mM, pH 7*) hasta un volumen de 100 mL. La muestra concentrada fue purificada por cromatografía de afinidad en una columna de 5 mL de níquel-sefarosa (*HisTrap FF Crude, GE Healthcare*) acoplada al sistema *ÄKTA prime plus (GE Healthcare)*. La columna fue equilibrada con el tampón PBS 100 mM pH 7, NaCl 500 mM, Imidazol 25 mM y después de cargar la muestra, ésta fue lavada con 10 volúmenes de columna del mismo tampón. La proteína de interés fue eluida con PBS 100 mM pH 7, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM recogiendo fracciones de 1 mL a través del colector del sistema. Cuando la proteína fue requerida desglicosilada, tras la digestión con Endo H (*New England Biolabs*), fue necesario un segundo paso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando la columna *Hi-Load Superdex 200 16/60 (GE Healthcare)* pre-equilibrada con 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl. Las fracciones con actividad α -galactosidasa se juntaron, concentraron y se dializaron en caso de ser necesario en el mismo tampón, utilizando membranas de ultrafiltración de 30 KDa (*Amicon Ultra, Millipore*). Finalmente, la proteína pura se congeló en nitrógeno líquido y fue liofilizada para permitir su conservación a largo plazo (Congelación: - 40 °C, 0.010 mBar; Sublimación: 25 °C, 0.010 mBar, 24 h; *LyoQuest de Telstar*). Los tamaños de los diferentes estados moleculares y la pureza de la muestra fue determinada por análisis SDS-PAGE, Nativo-PAGE y tinción *Coomassie* (Laemmli, 1970).

2.5. Ensayo de actividad enzimática y concentración de proteína

Ensayos rutinarios de seguimiento de la actividad α -galactosidasa se llevaron a cabo mediante una modificación del método de Ryan y colaboradores, (Ryan et al., 1998). Un volumen de la preparación de enzima diluida intra o extracelular fue incubado a 40 °C con un volumen de PNPG 10 mM en tampón McIlvaine pH 4. Tras parar la reacción a diferentes intervalos de tiempo con un volumen de Na₂CO₃ 1 M, se

midió el *p*-nitrofenol liberado a 400 nm (coeficiente de extinción molar, 18.20 L.mmol⁻¹.cm⁻¹). Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera un μmol de *p*-nitrofenol por minuto en las condiciones de ensayo. La concentración de proteína se determinó por el método de *Bradford* utilizando el *DC Protein Assay Kit (Bio Rad)* y la albúmina de suero bovino como patrón de la recta de calibrado. En todos los casos se tomaron muestras por triplicado y las lecturas espectrofotométricas se realizaron en placas de microvaloración de fondo plano con *Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (BioTEK)*.

2.6. Estabilidad en condiciones de refrigeración y congelación

Diferentes lotes de proteína pura y parcialmente purificada durante este trabajo fueron utilizados para estudiar la estabilidad enzimática a temperatura ambiente (22 ± 2 °C), a 4 °C y a - 20 °C mediante el análisis de la actividad residual según el método estándar (Sección 2.5).

2.7. Tratamientos con proteasas

El ensayo de resistencia a proteasas se realizó incubando a 37 °C una muestra de ScAGal purificada (1 U/mL) con diferentes proteasas ácido-neutras (2 mg/mL) a una razón 1:1 (v/v) según las especificaciones del fabricante: pepsina en tampón citrato-fosfato (pH 2.5) y proteinasa K, tripsina, α-quimotripsina tipo II y subtilisina en 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4). También se probó la resistencia a proteasas de una muestra de ScAGal pura previamente desglicosilada como se describe anteriormente (Sección 2.4.). Como control positivo de proteólisis se utilizó la enzima β-galactosidasa de *Escherichia coli* en las mismas condiciones de reacción y se determinó cualitativa y cuantitativamente la actividad enzimática utilizando los sustratos cromogénicos X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) y ONPG (2-nitrofenil-β-D-galactopiranosido), respectivamente. Se sacaron muestras a diferentes tiempos de reacción y se determinó la actividad enzimática residual mediante el método estándar (Sección 2.5) utilizando como muestra control la enzima en ausencia de proteasa que se designó con el 100 % de actividad. El ensayo cuantitativo de la actividad β-galactosidasa se realizó según las especificaciones del fabricante y para el ensayo cualitativo se añadió 1 μL de X-gal (20 mg/mL, en dimetilformamida) cuyo producto de degradación presenta coloración azul. Las proteasas, los sustratos y la β-galactosidasa de *E. coli* fueron suministrados por *Sigma Aldrich*.

2.8. Especificidad de sustrato

En el estudio de caracterización de la especificidad de sustrato de la ScAGal se utilizaron los sustratos PNPG, melibiosa, rafinosa, estaquiosa y galactomanano de algarrobo proporcionados por *Sigma Aldrich*, y los sustratos Gal¹Man₃ y Gal^{3,4}Man₅

junto con la enzima β -manosidasa de *Helix pomatia* adquiridos de Megazyme. Los productos de hidrólisis se analizaron por actividad α -galactosidasa, cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizaron las α -Gals de *Aspergillus niger* y *Cyamopsis tetragonoloba* administrados por Megazyme para llevar a cabo un estudio comparativo del seguimiento de los productos de hidrólisis. Cada reacción y los correspondientes controles fueron preparados por triplicado.

Determinación de la actividad α -galactosidasa. La especificidad de la enzima purificada por el sustrato sintético PNPG fue determinada por la medida de la liberación de *p*-nitrofenol a 400 nm como se describe en la Sección 2.5. La especificidad por los sustratos rafinosa, estaquiosa y galactomanano de algarrobo fue determinada midiendo la liberación de azúcares reductores utilizando el reactivo DNS (Miller, 1959). En las muestras de galactomanano de algarrobo digeridas previamente con la enzima β -manosidasa, se cuantificó la cantidad de galactosa liberada mediante la diferencia entre los azúcares reductores liberados antes y después del tratamiento de las muestras con la ScAGal. El GOD-POD kit (*Sigma Aldrich*) fue utilizado para determinar la actividad enzimática en presencia del sustrato melibiosa midiendo la liberación de glucosa. Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de producto (galactosa o glucosa) por minuto bajo las condiciones de ensayo.

Hidrólisis enzimática. En cada caso, la reacción de hidrólisis (Kaneko et al., 1991) se llevó a cabo a 40 °C con una mezcla de una disolución acuosa de cada sustrato (5 mg/mL) y α -Gals probadas (1 U/mL en tampón de reacción), (1:1, v/v). Por otro lado, para determinar la posición de rotura de enlaces entre galactosa y manosa, y la eficiencia de hidrólisis sobre galactomano-oligosacáridos complejos, se incubó a 40 °C durante 24 h una mezcla de β -manosidasa (1.2 U/mL en acetato 5 mM, pH 4.5) con una disolución acuosa al 1 % (p/v) de galactomano-oligosacáridos sintéticos (Gal¹Man₃ y Gal^{3,4}Man₅) y galactomanano de algarrobo, respectivamente (1:1, v/v). Finalmente, tras parar la reacción, parte del hidrolizado anterior fue incubado con ScAGal (0.3 U/ml, en tampón de reacción) a 40 °C durante 24 h (1:1, v/v). Todas las muestras recogidas fueron sometidas a 100 °C durante 5 min para parar la reacción antes de ser analizadas. Se utilizó como tampón de reacción para la ScAGal y la α -Gal de *A. niger*, ácido cítrico 61 mM, Na₂HPO₄ 77 mM, pH 4; y para la α -Gal *C. tetragonoloba*, acetato 10 mM pH 4,5.

Análisis de los productos de hidrólisis por TLC y HPLC. En los análisis de TLC, cada muestra fue colocada con un capilar sobre placas de gel de sílice (*Merck Silica Gel 60F 254, Germany*) y los productos de hidrólisis se desarrollaron sobre el sistema solvente 1-propanol-nitrometano-agua (5:2:3, v/v). Los azúcares fueron detectados por

calentamiento en un horno tras pulverizar sobre las placas una mezcla de metanol:ácido sulfúrico (95:5, v/v). Las imágenes y análisis de las placas se recogieron con un transiluminador (*Molecular Imager Gel Doc XR+, BioRad*). En el análisis por HPLC se utilizó la columna *Sugar Pack Waters* (6.5 mm x 300 mm) y los azúcares eluidos en EDTA-Calcio 100 μ M (*Sigma Aldrich*) como fase móvil (T^a columna, 80°C; T^a detector, 37°C; sensibilidad, 32; Flujo, 0,5ml/min) fueron detectados con un *Refractive Index Detector (Cienytech)*. La identificación y cuantificación de azúcares por HPLC se realizó mediante el método estándar interno (Xu et al., 2014). Se utilizó sorbitol (1 mg/mL) como patrón interno por no interferir éste con los azúcares de estudio y mezclas comprendidas entre 4 – 0.06 mg/mL de melibiosa, glucosa y galactosa y; estaquiosa, rafinosa, sacarosa y galactosa como patrones externos para elaboración de las rectas de calibrado.

2.9. Modelo estadístico de Superficie de Respuesta

La MSR fue el método estadístico utilizado para optimizar parámetros del proceso productivo y mejorar la producción de ScAGal empleando la cepa recombinante BJ3505/yEPME1His y el medio de cultivo YPHSM modificado. Los parámetros seleccionados como factores experimentales fueron, aireación, concentración de glucosa, pH y tiempo de crecimiento, y la respuesta medida fue el análisis de la actividad α -galactosidasa extracelular de los cultivos ensayados. El pH fue ajustado mediante la adición de NaOH 1 M o HCl 1 M y se siguió el resto de condiciones de cultivo según el procedimiento descrito anteriormente (Sección 2.3.). El diseño experimental de compuesto central (DCC) fue empleado en el estudio de los factores experimentales (variables independientes) a cinco niveles diferentes (tabla 2) que conduce a 30 grupos de experimentos utilizados para verificar los factores más significativos que afectan a la actividad α -galactosidasa extracelular (variable dependiente). Los valores codificados de los niveles fueron, $-\alpha$, -1, 0, +1, +2, $+\alpha$, donde $\alpha = 2^{k/4}$, k es el número de variables independientes y 0 corresponde al punto central del dominio experimental. Los datos de los factores tomados para el punto central fueron elegidos después de una serie de experimentos preliminares y la correspondencia entre los valores codificados y reales de las variables independientes se muestra en la Tabla 2. Para estimar el error experimental, el punto central (todos los factores en el nivel cero) se repitió 6 veces. La MSR fue ajustada a la variable dependiente o respuesta mediante una ecuación polinómica de segundo orden que relaciona la respuesta medida con las variables independientes. Los datos estadísticos fueron analizados con la ayuda del programa informático *StatGraphics Plus* para Windows versión 5.1 (*Statistical Graphics Corporation*).

Tabla 2. Factores experimentales y niveles del DCC estudiados en la optimización de la producción de ScAGal por la cepa recombinante BJ3505/yEP*MEL1*His.

Factores experimentales Valores reales	Valores codificados				
	-2	-1	0	1	2
Aireación (Vc/Ve)*	0.5 (50/100)	0.6 (40/100)	0.7 (30/100)	0.8 (20/100)	0.9 (10/100)
Glucosa (%)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
pH	4	5	6	7	8
Tiempo (h)	48	72	96	120	144

$x_i = (X_i - X_0)/\Delta X_i$; donde x_i es el valor codificado de la variable independiente, X_i es el valor real de la variable independiente, X_0 es el valor real de la variable independiente en el punto central del dominio experimental y ΔX_i el incremento de X_i correspondiente a una unidad del valor adimensional x_i . *El valor del factor aireación corresponde a la relación volumen de medio de cultivo en mL (Vc) en un matraz *Erlenmeyer* de 100 mL (Ve), Aireación = 1 - (Vc/Ve).

3. Resultados y discusión

3.1. Seguimiento de la expresión de variantes de *MEL1*

Para seleccionar el mejor sistema de secreción y purificación de la proteína ScAGal, se realizó el seguimiento de diferentes variantes del gen *MEL1* en la cepa BJ3505 utilizando el medio YPHSM. Para ello, además de las construcciones disponibles previamente en el laboratorio, YEp*MEL1*, YEp*MEL1*His y YEp*MEL1*Flag (Fernández-Leiro, 2011), portadoras del gen *MEL1* íntegro con su señal de secreción nativa, se crearon otras construcciones (YEpFlag*MEL1*, YEp α *FMEL1*, YEp α *FMEL1*His y YEp α *FMEL1*Flag) con ausencia y presencia de etiquetas de purificación y donde, por recombinación homóloga, la secuencia de la señal de secreción nativa de *MEL1* fue reemplazada por la secuencia de la señal de secreción Factor α de *S. cerevisiae* proporcionada por el vector YEpFlag-1 (Figura 1). El péptido señal está presente en el extremo amino terminal de la proteína recién sintetizada, la dirige hacia la vía secretora y es escindido de la misma por proteasas específicas una vez que ésta es liberada al medio extracelular. Aunque los péptidos señal son extremadamente heterogéneos y muchos pueden ser funcionalmente intercambiables entre especies diferentes (Von Heijne, 1985), la eficacia de la secreción de la proteína está fuertemente determinada por el mismo (He et al., 2012; Achstetter et al. 1992). Dado que el promotor *ADH2* presente en el plásmido de origen de dichas construcciones está sujeto a represión catabólica por glucosa, el medio YPHSM empleando un 1.5 % de glucosa en lugar del 1 % permite incrementar el número de células antes de inducirse la expresión génica (observado en ensayos preliminares). En la figura 2 se muestra el transcurso de la actividad α -galactosidasa intra y extracelular de los cultivos ensayados a lo largo del tiempo. Aunque en todos los casos los cultivos alcanzaron la fase estacionaria a las 96 h con valores de crecimiento similares ($OD_{600} = 90 \pm 10$), la presencia de la señal de secreción nativa permite que la cepa recombinante secrete una media de actividad α -galactosidasa 10 veces superior que en presencia del Factor α . Los mejores resultados de expresión que derivaron en producción de proteína recombinante fueron obtenidos con las construcciones

YEpMEL1Flag, YEpMEL1 y YEpMEL1His alcanzando una actividad extracelular a las 96 h de cultivo de 25 U/ml, 19 U/ml y 10 U/ml, respectivamente (Figura 2A). Un ANOVA simple muestra en la comparación de medias, que la mayor actividad fue observada con el sistema BJ3505/YEpMEL1Flag (grupo B), seguido de BJ3505/YEpMEL1 (grupo A) y BJ3505/YEpMEL1His (grupo C), donde las estadísticas sesgo y curtosis estandarizados están dentro del rango esperado para datos que provienen de una distribución normal (-2 y +2) (Tabla 3). Así, la razón-F de la tabla ANOVA muestra que hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos A, B y C (p -valor<0,05) determinándose finalmente, que las medias entre los grupos A y B no son significativamente diferentes al realizar una prueba de rango múltiple (método LSD).

Tabla 3. Análisis de Varianza de los diferentes sistemas de expresión.

Resumen estadístico						
<i>Sistema de expresión (Grupos)</i>		<i>Media</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Sesgo</i>	<i>Curtosis</i>
BJ3505	YEpMEL1 (A)	21.049	14.571	26.209	-0.644	0.685
	YEpMEL1Flag (B)	23.329	15.604	26.560	-1.525	1.429
	YEpMEL1His (C)	9.886	5.434	12.418	-1.274	1.067
	YEpFlagMEL1 (D)	1.274	0.624	1.721	-0.759	-0.099
	YEp α FMEL1 (E)	2.244	0.965	3.065	-0.564	-0.877
	YEp α FMEL1Flag (F)	2.772	1.412	3.790	-0.504	-0.765
	YEp α FMEL1His (G)	1.403	0.614	2.135	-0.137	-1.117
ANOVA						
<i>Variabilidad</i>		<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre-grupos (A-C)		414.066	2	207.033	10.36	0.0046
Dentro-grupos (A-C)		179.930	9	19.992		
Total (Corregido)		593.996	11			
Prueba de Rangos Múltiples						
<i>Contraste</i>		<i>Significancia</i>		<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>	
A - B				-2.28	7.15219	
A - C		*		11.1635	7.15219	
B - C		*		13.4435	7.15219	

La medida de la actividad α -galactosidasa extracelular de los cultivos ensayados es la variable independiente o respuesta de estudio. El método utilizado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD). *Denota una diferencia estadísticamente significativa entre parejas de grupos (contraste); Gl, grados de libertad.

Por otra parte, mientras que el rendimiento medio de secreción de ScAGal dirigida por el Factor α muestra un valor entre el 45-50 % con respecto a la actividad total a las 120 h, la secreción dirigida por la señal nativa fue del 30% en el mismo intervalo de tiempo (Figura 2B). El resultado de que la actividad intracelular sea mucho mayor que la extracelular puede ser debido a que la producción de ScAGal es demasiado rápida para ser procesada eficientemente por la vía secretora. Además, la actividad α -galactosidasa asociada a la pared celular de la levadura podría ser una alternativa atractiva al incrementar el valor añadido de la biomasa generada destinada a su aplicación como suplemento alimenticio. YEpMEL1Flag contiene el péptido etiqueta Flag en posición carboxilo terminal para la detección específica por inmunofluorescencia de la proteína expresada. Esta construcción permitió la obtención de proteína de alto

grado de pureza necesaria para la resolución cristalográfica (Fernández-Leiro et al., 2010) pero encarece considerablemente la etapa de purificación si se desea llevar el proceso de producción a gran escala. Por otro lado, YEpMEL1 al no contener etiqueta de purificación, dificulta la obtención de proteína pura, en caso de ser necesaria. Sin embargo, YEpMEL1His permite la expresión de la proteína con una etiqueta Poli-His (6 His) en su extremo carboxilo terminal para la purificación mediante afinidad. Es por ello que, teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, se considera como más adecuado el sistema de expresión BJ3505/YEpMEL1His por ofrecer una purificación fácil que permite mayor margen de beneficio sobre el coste de producción.

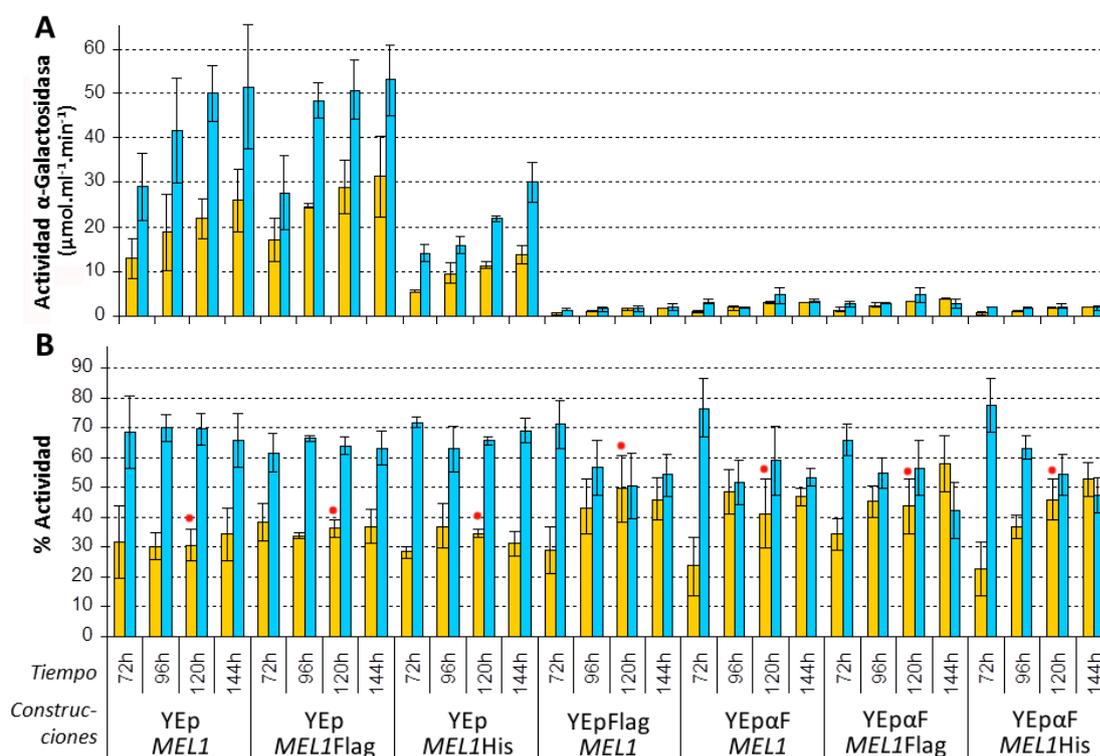


Figura 2. Seguimiento de la expresión de variantes MEL1 en la cepa BJ3505 con el medio de cultivo YPHSM. A) Actividad extracelular (■) e intracelular (■) de YEpMEL1, YEpMEL1Flag y YEpMEL1His, que contienen el gen completo de la ScAGAL, y YEpFlagMEL1, YEpαMEL1, YEpαMEL1Flag y YEpαMEL1His, donde la señal de secreción nativa de la ScAGAL fue sustituida por la señal Factor α. **B)** Porcentaje de actividad de la fracción extracelular (■) e intracelular (■) con respecto a la actividad total. (●) Rendimiento medio de secreción de ScAGal a las 120 h de cultivo. Media ± DS, N = 3.

Finalmente, el seguimiento en el tiempo de cultivos en medio YPHSM muestran una retención del plásmido de hasta el 80 % durante las 96 horas de crecimiento disminuyendo hasta el 30% conforme se alarga el tiempo de cultivo (Figura 3A), datos de estabilidad plasmídica superiores al reportado por otras proteínas (López-López et al., 2010). La pérdida del plásmido es asumible porque la cepa recombinante en YPHSM no está sometida a presión selectiva, el uso de CM-Trp como medio selectivo limita la densidad celular y con ello la producción enzimática. En YPHSM, BJ3505/YEpMEL1His secreta una media de 10 U/mL a las 96 horas de cultivo que

continúa incrementando ligeramente hasta las 144 horas (Figura 3B), sin embargo en CM-Trp apenas alcanza una media máxima de secreción de 0.53 U/mL en el mismo intervalo de tiempo (Fernández-Leiro, 2011).

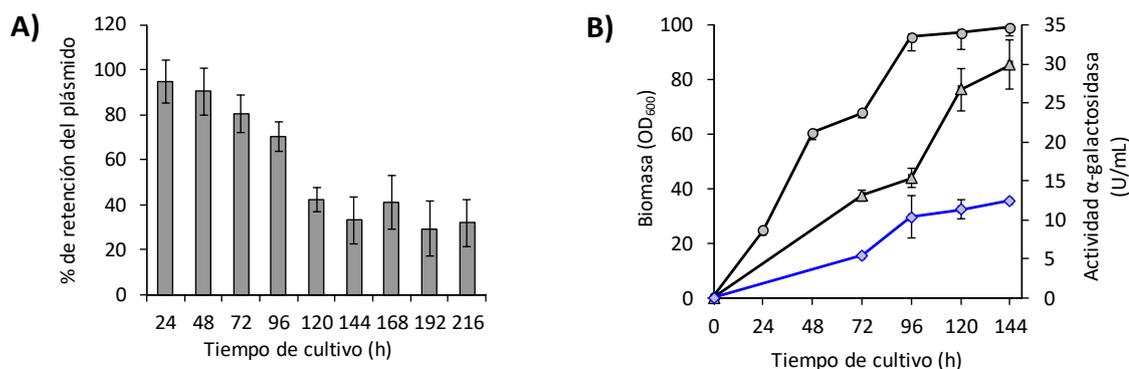


Figura 3. Estabilidad plasmídica (A) y perfil típico de crecimiento celular (círculos) y producción de actividad α -galactosidasa extracelular (rombos) e intracelular (triángulos) (B) de cultivos de BJ3505/YEpMEL1His en YPHSM con 1.5 % de glucosa. Media \pm DS, N = 3.

3.2. Purificación de la ScAGal

La tabla 4 muestra la purificación de la proteína extracelular por cromatografía de afinidad en columnas de níquel-sefarosa dando lugar a una recuperación de la proteína del 1.14 % con un factor de purificación de 10 veces y un rendimiento en unidades totales de la enzima del 13 %. Por otro lado, hay que tener en cuenta que durante las etapas de diálisis, concentración y liofilización se asume una pérdida del 20 % de proteína purificada. Sin embargo, cabe resaltar que, aunque en este caso la producción extracelular de ScAGal dio lugar a una actividad específica de 13 U/mg, esta cantidad puede ser mejorada durante el proceso de optimización del cultivo de la cepa recombinante (sección 4.6) obteniendo nuevos aumentos en los niveles de expresión.

Tabla 4. Etapas del proceso productivo de la ScAGal

		UT	PT (mg)	AE (U/mg)	FP	% Act	% Prot
Medio extracelular	1000 ml	3530	280	12,61	1,0	100	–
Medio concentrado	100 ml	2598	160	16,23	1,3	74	–
Cromatografía de afinidad	10 ml	454	3,5	129,60	10,3	13	100
Diálisis y concentración	1 ml	238	3,2	74,55	–	7	91
Liofilización	*169 mg	207	2,8	73,85	–	6	80

UT: Unidades totales; PT: Proteína total; AE: Actividad Específica; FP: Factor de purificación; % Act: Rendimiento del proceso en actividad; % Prot: Rendimiento de proteína pura final. *mg de peso seco.

El análisis SDS-PAGE de cada uno de los pasos de purificación permitió comprobar el estado y pureza final de la proteína (Figura 4A). En la proteína pura se observa una banda difusa entre los tamaños 180 y 70 kDa que confirma el elevado estado de glicosilación que representa un 50 % del peso molecular final de la misma (Figura 4B, calle 1) reportado previamente (Fernandez-Leiro et al., 2010). Por otro lado, la

proteína desglicosilada presenta un peso molecular de 55 kDa (Figura 4B, calle 2, 3 y 4) y mantiene casi el 100 % de su actividad inicial (Fernandez-Leiro et al., 2010), cualidad importante dependiendo de su aplicación industrial. La desglicosilación de la α -galactosidasa de *Cicer arietinum* provoca la pérdida de actividad enzimática (Singh and Kayastha, 2012a). Un gel nativo de la proteína pura antes y después de desglicosilar (Figura 4C, calle 1 y 2, respectivamente) demuestra su naturaleza oligomérica que corresponde al estado tetramérico de la ScAGal observado con la resolución de la estructura cristalográfica de la misma (Fernandez-Leiro et al., 2010).

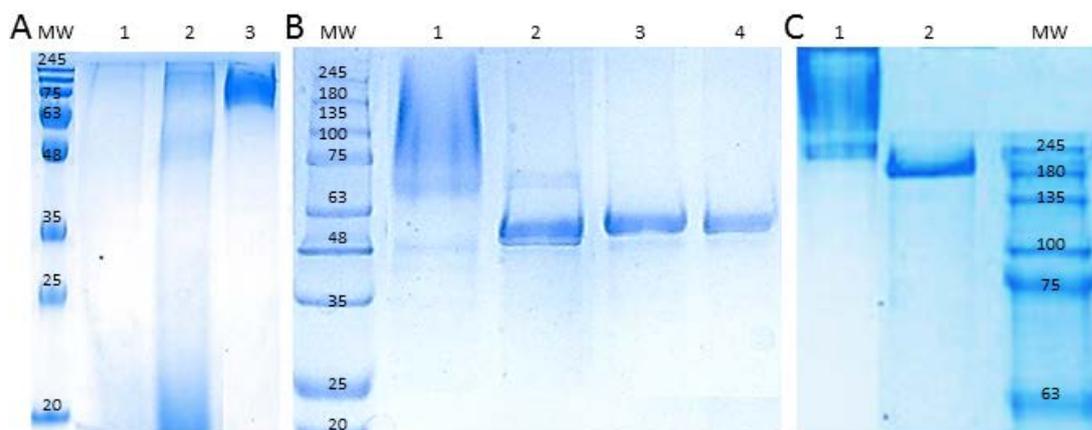


Figura 4. Análisis PAGE de la ScAGal purificada. A) Etapas del proceso de purificación de la ScAGal en SDS-PAGE al 10%: medio de cultivo extracelular (calle 1), medio concentrado (calle 2), proteína purificada por cromatografía de afinidad (calle 3); **B)** Forma monomérica de la ScAGal en SDS-PAGE al 8%: proteína glicosilada y desglicosilada (calle 1 y 2), proteína desglicosilada purificada por exclusión molecular (calle 3), proteína desglicosilada liofilizada (calle 4); **C)** Forma tetramérica de la ScAGal en Nativo-PAGE al 8%: proteína glicosilada (calle 1) y desglicosilada (calle 2). MW, marcador de peso molecular.

3.3. Estudio de las condiciones de conservación de la ScAGal

Con el objeto de poder valorar el mejor método de conservación de los productos obtenidos durante las etapas de purificación de la enzima, se realizó un estudio de estabilidad en condiciones de frío y medioambientales (Figura 5). Muestras de ScAGal purificadas por cromatografía de afinidad conservadas durante 5 años a 4 °C y - 20 °C mantuvieron una actividad residual del 68 % y 93 %, respectivamente. Por otro lado, la ScAGal pura presenta un 80 % de actividad después de 22 días a temperatura ambiente (22 °C \pm 2), y la recuperación observada de casi el 100 % de actividad a los 41 días es debido posiblemente a la evaporación de la muestra dado el periodo de tiempo alcanzado. La ScAGal parcialmente purificada mediante filtración tangencial muestra más del 80 % de actividad residual después de 5 años a - 20 °C. Sin embargo, en este caso no se recomienda el mantenimiento de la proteína a largo plazo tanto a temperatura ambiente como, aunque en menor medida, en condiciones de refrigeración dado el alto riesgo de contaminación que conlleva al no estar totalmente purificada (datos no mostrados). Si es necesario mantener la ScAGal largos periodos

de tiempo a temperatura ambiente es preferible que la proteína sea liofilizada para su conservación.

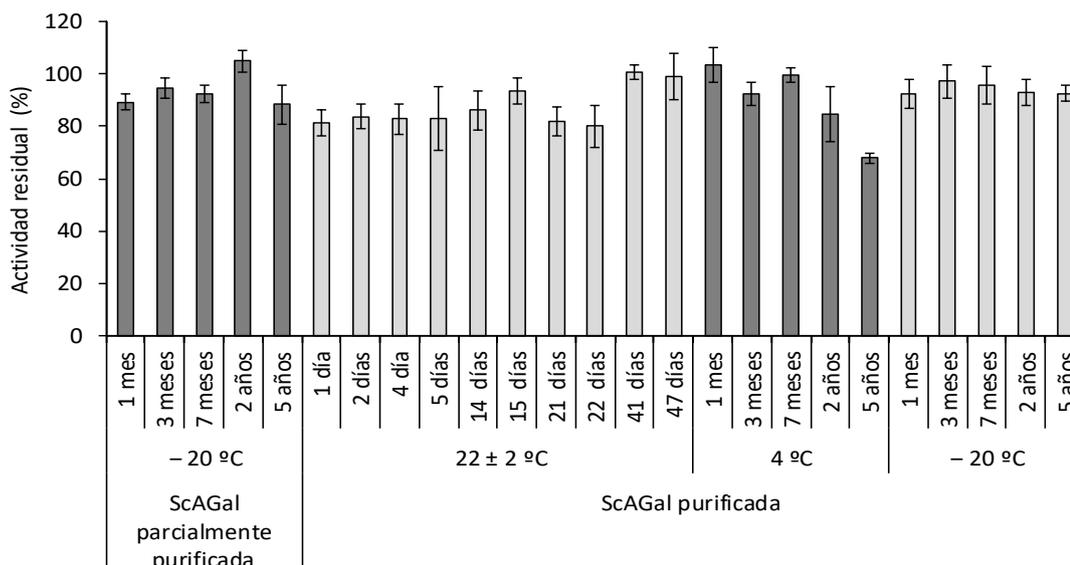


Figura 5. Estabilidad de la ScAGal ante condiciones medioambientales, refrigeración y congelación. Actividad residual alcanzada de diferentes lotes de ScAGal parcialmente purificada conservados a -20 °C y lotes de ScAGal pura conservados a temperatura ambiente ($22 \pm 2\text{ °C}$), 4 °C y -20 °C . (Media \pm DS, N =3).

3.4. Resistencia a proteasas

La ScAGal no sólo mostró una fuerte resistencia al tratamiento con todas las proteasas probadas sino que además presentó un notable aumento de la actividad enzimática en presencia de las mismas (Figura 6). Después del tratamiento a 37 °C durante 1 hora con tripsina, quimotripsina, proteinasa K, subtilisina y pepsina, la ScAGal exhibe un 122 %, 132 %, 142 %, 117 % y 164% de su actividad inicial, respectivamente, manteniéndose ligeramente hasta las 16 horas, siendo éstos los mejores resultados reportados hasta el momento (Hu et al., 2017; Katrolia et al., 2012; Zhou et al., 2012). Además, la enzima desglicosilada también posee fuerte resistencia a la digestión con pepsina (103 % actividad residual) y subtilisina (98 % actividad residual) y cierta tolerancia en presencia de tripsina (52 % actividad residual), quimotripsina (53 % actividad residual) y proteinasa K (45 % actividad residual) tras 1 hora de tratamiento, lo que supone una ventaja en aplicaciones que requieran la proteína desglicosilada (Figura 7). En la industria de alimentos y piensos se utilizan combinaciones enzimáticas que deben trabajar en sinergia, entre ellas, α -galactosidasas, β -mananasas, β -manosidasas y proteasas, para así mejorar el valor nutritivo y la digestibilidad de alimentos (Ghazi et al., 2003b). Por otro lado, es necesario que la enzima pueda evadir el pH ácido del jugo gástrico donde actúa la pepsina y a continuación, una vez alcanzado el intestino delgado debe ser resistente a

la acción de las enzimas tripsina y quimotripsina secretadas por el páncreas junto con bicarbonato para neutralizar el pH. Por lo tanto, la resistencia a proteasas es una característica favorable que permite ampliar el campo de acción de la ScAGal en aplicaciones biotecnológicas.

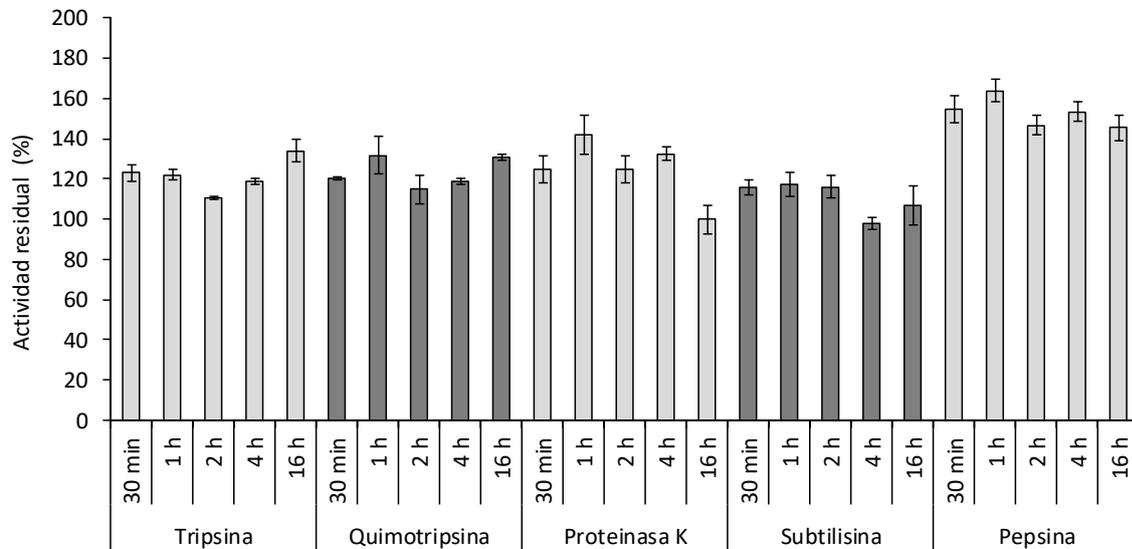


Figura 6. Efecto del tratamiento de proteasas ácido-neutras sobre la actividad de la ScAGal. Cada proteasa (2 mg/mL) disuelta en su tampón de reacción fue incubada a 37 °C en presencia de ScAGal (1 U/mL) y tras recoger muestras a diferentes tiempos de digestión, se determinó la actividad utilizando como control la enzima en ausencia de proteasa. Media \pm DS, N =3.

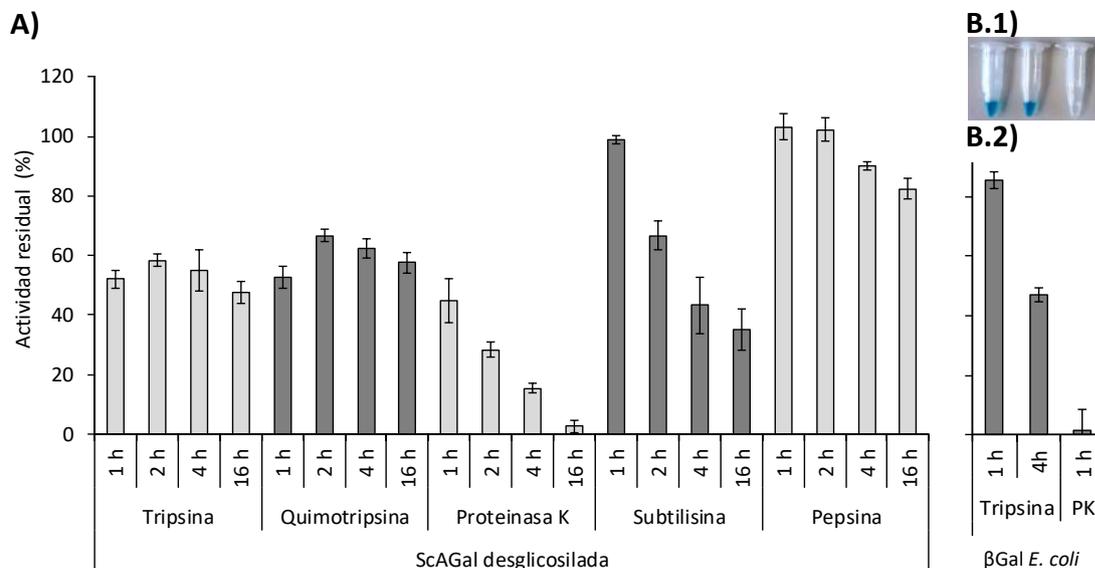


Figura 7. A) Efecto del tratamiento de proteasas ácido-neutras sobre la ScAGal desglycosilada. B) Control positivo de proteólisis de la enzima β -galactosidasa (β Gal) de *E. coli* mediante determinación cualitativa con el sustrato X-gal (1) y cuantitativa con el sustrato ONPG (2) de la actividad enzimática. Cada proteasa (2 mg/mL) disuelta en su tampón de reacción fue incubada a 37 °C en presencia de ScAGal ó β Gal (1 U/mL) y tras recoger muestras a diferentes tiempos de digestión, se determinó la actividad enzimática utilizando como control la enzima en ausencia de proteasa (Media \pm DS, N = 3).

3.5. Caracterización de la especificidad de sustrato

Actividad α -galactosidasa. La ScAGal purificada se utilizó para determinar la actividad α -galactosidasa con los sustratos PNPG, melibiosa, rafinosa, estaquiosa y galactomanano de algarrobo (Tabla 5). Al igual que la gran mayoría de α -Gals, la enzima presenta mayor afinidad por el sustrato sintético PNPG que por sustratos naturales, como se ha determinado previamente (Fernandez-Leiro et al., 2010). Tomando como referencia el PNPG (100%), los datos de actividad relativa muestran que la enzima es más específica por melibiosa (95 %), seguido de rafinosa (15 %) y estaquiosa (11 %), lo cual se corresponde con la tasa de hidrólisis detectada por HPLC y TLC que se mencionará posteriormente. La ScAGal no actúa directamente sobre galactomananos complejos como la goma de algarrobo, pero sí cuando ésta se somete a un tratamiento previo con la enzima β -manosidasa. Como se ha indicado anteriormente, esto último supone una ventaja en la aplicación de esta enzima en combinación con β -manosidasas y/o β -mananasas para mejorar las propiedades gelificantes de galactomananos utilizados en la industria biotecnológica.

Tabla 5. Especificidad de sustrato de la ScAGal (media \pm SD, n = 3)

Sustratos	Concentración (mg/ml)	Actividad Relativa (%)*
PNPG	3	100**
Melibiosa	5	95 \pm 0.11
Rafinosa	5	15 \pm 0.01
Estaquiosa	5	11 \pm 0.01
Goma algarrobo	5	–
Goma algarrobo tratada con β -manosidasa	2.5	1 \pm 0.00

* Porcentaje de actividad enzimática con respecto al sustrato PNPG. ** Valor tomado como máxima referencia obtenido de la media de tres medidas independientes con una desviación estándar (SD) \pm 0,063.

Análisis de los productos de hidrólisis. Los análisis cuantitativos de la hidrólisis de melibiosa, rafinosa y estaquiosa mediante HPLC muestran que alrededor del 90% de la melibiosa y de RFOs son hidrolizados por la ScAGal a los 15 min y las 4 h de reacción, respectivamente (Figura 8B y 8C). La melibiosa representa el mejor sustrato para la enzima porque puede ser hidrolizada a un ritmo mucho más rápido que la rafinosa y estaquiosa ($K_{cat}=193 \text{ S}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 17 \text{ S}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) (Fernandez-Leiro et al., 2010). Es por ello que, en la Figura 8A, al inicio de la reacción de hidrólisis (tiempo = 5 min) tiene lugar, simultáneamente, la síntesis de un galactotrisacárido como producto de la reacción de transglicosilación. Esto sucede porque todavía hay suficiente sustrato para favorecer dicha reacción, pero conforme transcurre el tiempo, tanto la melibiosa como el galactotrisacárido desaparecen. Este resultado nos confirma que la ScAGal puede llevar a cabo reacciones de transglicosilación si favorecemos las condiciones de supersaturación de melibiosa, lo que sugiere una posible aplicación en la síntesis de α -GOS. La ScAGal puede hidrolizar Gal^3Man_3 pero no puede actuar sobre Gal^3Man_4 (Yoshida et al., 1997), lo que significa que puede romper el enlace de un residuo galactosa unido a la manosa del extremo no reductor del galactomano-oligosacárido

pero no el enlace a una manosa interna. Sin embargo, no hay evidencias documentadas de su acción sobre una galactosa unida a la manosa del extremo reductor de este tipo de sustratos, como Gal¹Man₃.

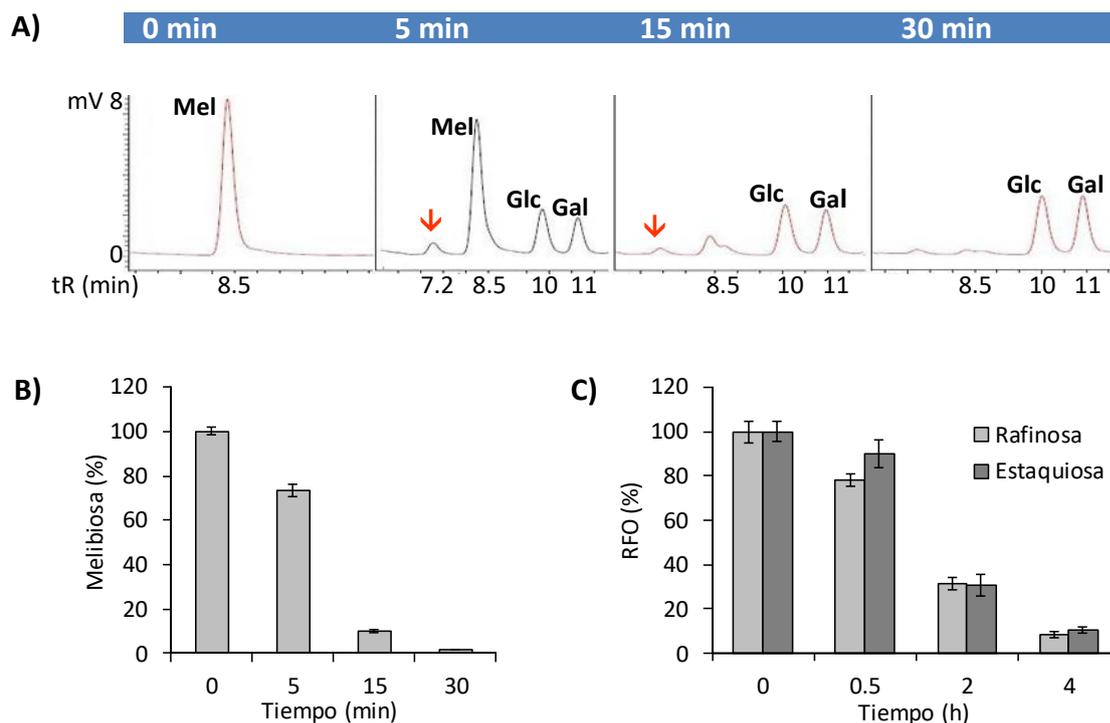


Figura 8. Acción de la ScAGal sobre los sustratos melibiosa, rafinosa y estaquirosa estimada por HPLC. Análisis cromatográfico de la identificación de los productos de la hidrólisis de melibiosa (A); y porcentaje del contenido de melibiosa (B) y RFOs (C), durante el tiempo de reacción de hidrólisis (Media \pm DS, N =3). \rightarrow Trigalactosacárido sintetizado por la reacción de transglucosilación de la ScAGal; mV, milivoltios; tR, tiempo de retención; Mel, melibiosa; Glc, glucosa; Gal, galactosa.

El resultado de la acción de la ScAGal sobre Gal¹Man₃, Gal^{3,4}Man₅ y goma de algarrobo previamente tratados con β -manosidasa son analizados mediante TLC (Figura 9) y HPLC (Figura 10). Tras dicho tratamiento, Gal¹Man₃ resultó en la liberación de la manosa no reductora terminal generando el producto Gal¹Man₂ y, finalmente, GalMan después de las 24 h de reacción, el cual pudo ser accesible por la ScAGal liberando galactosa y manosa (Figura 10A). El análisis por TLC de la hidrólisis de Gal^{3,4}Man₅ es más confuso pero los datos son finalmente confirmados mediante HPLC (Figura 10B). Dado que la β -manosidasa elimina la manosa del extremo no reductor de la cadena lineal del β -1,4-mano-oligosacárido hasta alcanzar un residuo galactosa, su acción sobre galactomananos expone grupos galactosa en el extremo no reductor que son rápidamente hidrolizados por la ScAGal (Figura 9 y 10C). Aunque el sistema cromatográfico HPLC-RID no permite separar la manosa de la galactosa, presentando el mismo tiempo de retención (tR), tras la acción de la ScAGal se observa un incremento en la concentración del producto a ese tR que nos indica la liberación de

galactosa. Los picos no caracterizados se identificaron con los tR de los componentes del tampón de reacción (datos no mostrados). Dependiendo de la especificidad sobre galactomano-oligosacáridos sintéticos, las α -Gals que liberan la galactosa que ataca a la manosa no reductora pero no liberan los residuos de galactosa internos se clasifican en un primer grupo; aquellas que sólo liberan residuos unidos a posiciones internas en un segundo grupo; y las que liberan tanto residuos internos como terminales en un tercer grupo (Mitsunori et al., 2001). En este trabajo, se demuestra que la ScAGal sólo puede actuar sobre Gal^1Man_3 y $\text{Gal}^{3,4}\text{Man}_5$ tras hidrólisis previa con la β -manosidasa de *Helix pomatia*, por lo que se confirma que pertenece al primer grupo de α -galactosidasas según la especificidad sobre galactomano-oligosacáridos.

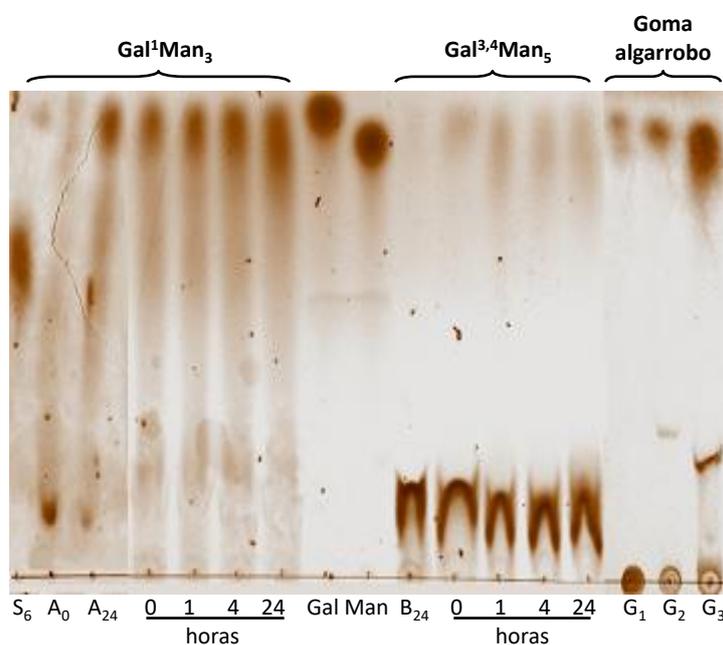


Figura 9. Análisis de los productos de hidrólisis Gal^1Man_3 , $\text{Gal}^{3,4}\text{Man}_5$ y goma de algarrobo mediante TLC. 0.3 U/mL de ScAGal se incubaron a 40 °C con 2.5 mg/mL del sustrato previamente hidrolizado con 1.2 mL de β -manosidasa y se recogieron muestras a 1, 4 y 24 h de reacción. A₂₄, B₂₄ y G₂, Gal^1Man_3 , $\text{Gal}^{3,4}\text{Man}_5$ y goma de algarrobo digeridos con β -manosidasa durante 24 h. A₀, muestra Gal^1Man_3 a tiempo cero de reacción; G₃, muestra G₂ hidrolizada con ScAGal durante 24 h. S₆, Gal^1Man_3 control; Gal, Galactosa control; Man, Manosa control; G₁, Galactomanano control. Se utilizaron 8 μL de muestra y 4 μL de control.

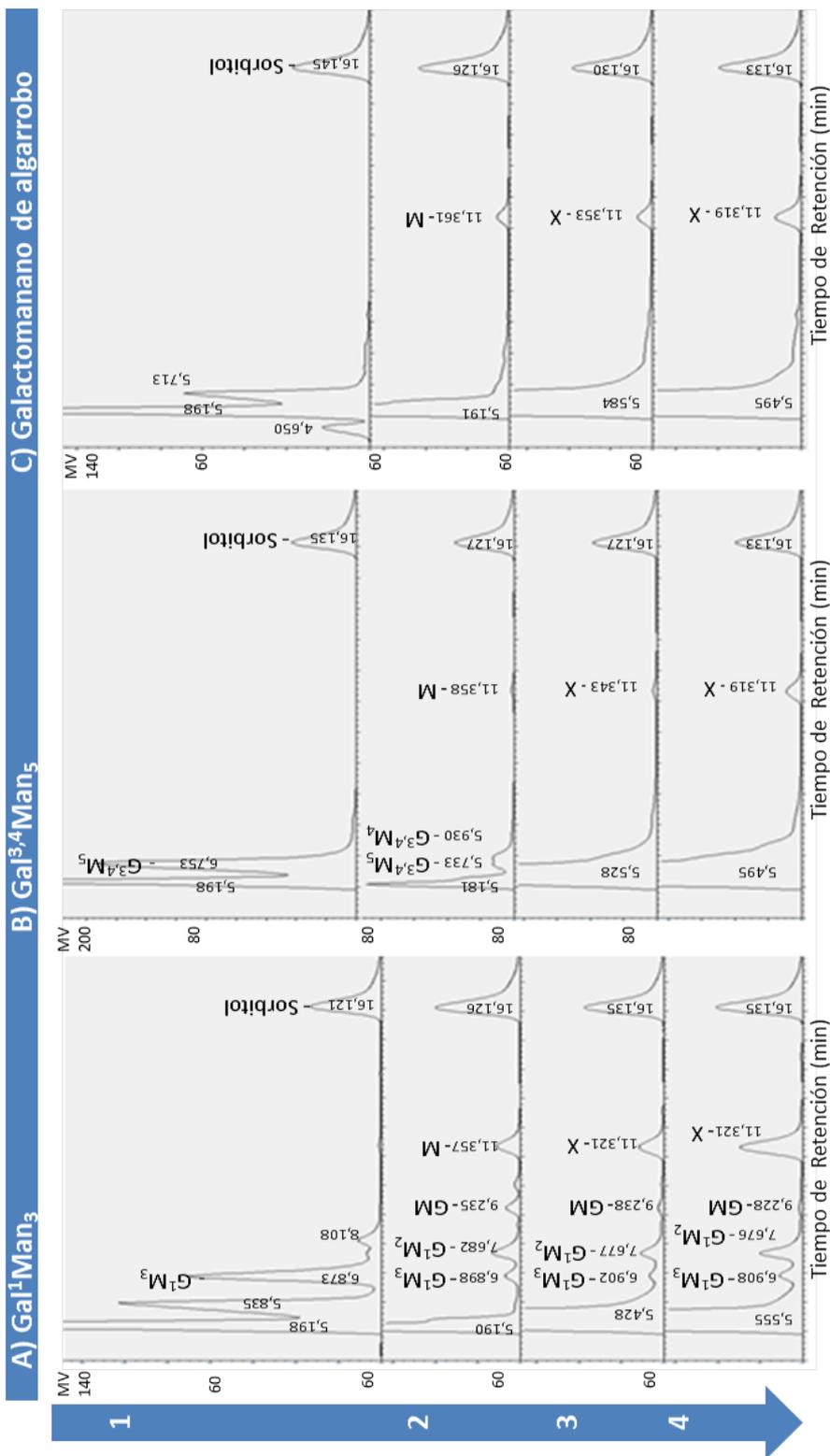


Figura 10. Caracterización de los productos de hidrólisis de Gal¹Man₃ (A), Gal^{3,4}Man₅ (B) y galactomanano de algarrobo (C) mediante HPLC. Identificación de los productos obtenidos tras la digestión de los sustratos con β -manosidasa a las 0 y 24 h de reacción (1 y 2) y tras la acción de la ScAGal (0.3 U/ml en tampón ácido cítrico 61 mM, Na₂HPO₄ 77 mM, pH 4) durante 4 y 24 h en las muestras tratadas, previamente, con β -manosidasa (3 y 4). Cada muestra (15 μ l) fue inyectada utilizando EDTA-Calcio 100 mM como fase móvil en la columna Sugar-Pack Waters (T^a columna, 80 $^{\circ}$ C; T^a detector, 37 $^{\circ}$ C; sensibilidad, 32; Flujo, 0.5ml/min) y los azúcares fueron detectados con un Refractive Index Detector. G¹M₃, Gal¹Man₃; GM, Gal¹Man₂; GM, Gal¹Man₂; GM, Gal¹Man₂; G^{3,4}M₅, Gal^{3,4}Man₅; G^{3,4}M₄, Gal^{3,4}Man₄; M, Manosa; X, Manosa y Galactosa.

Estudio comparativo de la hidrólisis de sustratos por la ScAGal y las α -Gals de *A. niger* y *C. tetragonoloba*. Dada la cantidad de estudios reportados sobre α -Gals de diferente origen y su diversidad en cuanto a especificidad de sustrato, surge nuestro interés por localizar aquellas disponibles en el mercado y realizar un análisis comparativo con la ScAGal. Las más accesibles fueron, la α -Gal de *A. niger*, cuyo suministrador no proporciona datos de cual es de las tres α -Gals caracterizadas hasta el momento (Ademark et al., 2001), y la α -Gal de *C. tetragonoloba* (planta de guar), que actúa sobre el galactomanano de guar (Overbeeke et al., 1990). Durante el transcurso de la hidrólisis de los sustratos analizados por TLC, se observa que sólo la ScAGal hidroliza completamente la melibiosa a glucosa y galactosa después de 30 min de reacción (Figura 11A). Está descrito que la α -Gal de *A. niger* no actúa sobre la melibiosa incluso después de 12 h de reacción (Kaneco R. et al., 1991), pero en este trabajo se observó que era totalmente hidrolizada después de 4 h (Figura 11D). En cuanto a la rafinosa y estaquiosa, la ScAGal presenta mayor especificidad por los sustratos que la α -Gal de *A. niger*, mientras que la α -Gal de *C. tetragonoloba* no actúa sobre la estaquiosa y muy poco sobre la rafinosa (Figura 11B). Por el contrario, la ScAGal y la α -Gal de *A. niger* no pueden hidrolizar los sustratos Gal¹Man₃ y Gal^{3,4}Man₅, mientras que la α -Gal de *C. tetragonoloba* lo hace cuando tan sólo ha transcurrido 1 h de reacción (Figura 11C). Estos resultados determinan que la α -Gal de *A. niger* utilizada en estos ensayos podría ser la AglC, caracterizada como una enzima tetramérica que no puede actuar directamente sobre galactomananos y clasificada en la familia GH36. Otras dos α -Gals, AglA y AglB, pertenecen a la familia GH27 y actúan en menor o mayor medida sobre la degradación de galactomananos (Ademark et al., 2001; de Vries et al., 1999). La especificidad de sustrato parece estar más bien determinada por el estado molecular de la proteína que por similitudes de secuencia aminoacídica. Enzimas monoméricas pertenecientes a diferentes familias de GH pueden actuar sobre pequeños oligosacáridos y galactomananos poliméricos (Fialho et al., 2008; Guo et al., 2016; Hu et al., 2017), sin embargo aquellas que se organizan como complejos multiméricos de alto peso molecular, sólo pueden hidrolizar pequeños oligosacáridos (Katrolia et al., 2012; Mitsunori et al., 2001). La ScAGal es una enzima tetramérica y un ejemplo más de que la incapacidad de actuar sobre sustratos poliméricos es debido, posiblemente, a que la estructura multimérica restringe el acceso de ellos al sitio activo de la enzima. La tabla 6 resume los sustratos específicos de la ScAGal y las α -Gals de *A. niger* y *C. tetragonoloba*.

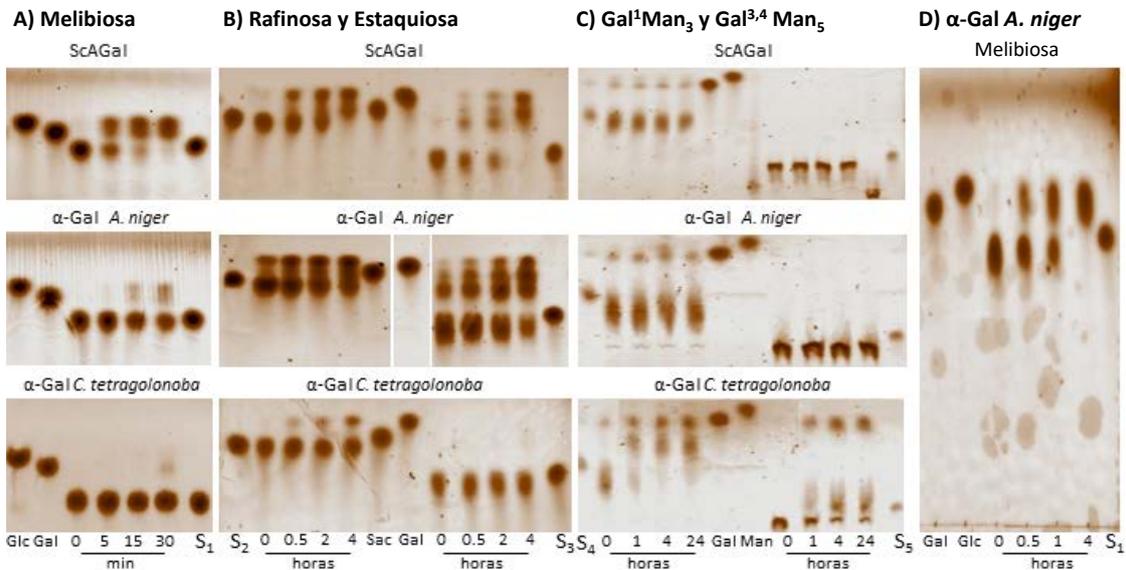


Figura 11. Análisis comparativo de los productos de hidrólisis de la ScAGal con las α -Gals de *A. niger* y *C. tetragonoloba* (planta Guar) mediante TLC. S₁, Melibiosia; S₂, Rafinosa; S₃, Estaquirosa; S₄, Gal¹Man₃; S₅, Gal^{3,4}Man₅; Gal, Galactosa; Glc, Glucosa; Sac, Sacarosa; Man, Manosa.

Tabla 6. Sustratos específicos de la ScAGal y las α -Gals de *A. niger* y *C. tetragonoloba* (planta de Guar).

SUSTRATO	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. tetragonoloba</i>
Melibiosia	Gal-Glc	Gal-Glc	Gal-Glc
Rafinosa	Gal-Glc-Fru	Gal-Glc-Fru	Gal-Glc-Fru
Estaquirosa	Gal-Gal-Glc-Fru	Gal-Gal-Glc-Fru	Gal-Gal-Glc-Fru
Gal ¹ Man ₃	Gal M-M-M	Gal M-M-M	Gal M-M-M
GalMan*	M-Gal	**	**
Gal ^{3,4} Man ₅	Gal Gal M-M-M-M-M	Gal Gal M-M-M-M-M	Gal Gal M-M-M-M-M
Gal ^{3,4} Man ₄ *	Gal Gal M-M-M-M	**	**

↑ Enlaces hidrolizados rápidamente por α -Gal
 ↑ Enlaces hidrolizados moderadamente por α -Gal
 ↑ Enlaces hidrolizados débilmente por α -Gal
 ↑ Enlaces hidrolizados por β -manosidasa

M Residuo de manosa reductora terminal
 M Residuo de manosa no reductora terminal
 * Sustratos obtenidos por acción de β -manosidasa
 ** Ensayos no realizados en este estudio

3.6. Optimización de la producción de ScAGal mediante la MSR

La Metodología de Superficie de Respuesta (MRS) y el Diseño Compuesto Central (DCC) nos permitió conocer los valores óptimos de los factores experimentales elegidos (aireación, concentración de glucosa, pH y tiempo de cultivo) para alcanzar la máxima actividad α -galactosidasa extracelular, y por lo tanto mejorar la producción de ScAGal. En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos y ajustados por la MSR de acuerdo con el DCC descrito previamente en la Sección 2.9. Se alcanzó la mayor actividad α -galactosidasa extracelular (21.09 U/mL) con una aireación 0.7 (30/100), glucosa al 1.5 % y pH 6 después de 144 h de cultivo (Experimento 24, Tabla 7), mientras que disminuyó drásticamente (3.45 U/mL) durante 48 h de cultivo en las mismas condiciones (Experimento 23, Tabla 7). En la tabla 8 se muestran los resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) de un diseño factorial 2^4 que permitió evaluar la significancia estadística del modelo de regresión tras la eliminación de aquellos efectos estadísticamente insignificantes (valor-P > 0.05). En este caso, la aireación, la concentración de glucosa, el tiempo y los efectos cuadráticos de las variables pH y tiempo presentan un valor-P menor que 0.05 con un nivel de confianza del 95 %, mientras que el pH y el resto de efectos e interacciones entre variables no son incluidas por no ser estadísticamente significativas como se confirma en el diagrama de Pareto (Figura 12). El estadístico R^2 explica el 86.16 % de la variabilidad en la actividad α -galactosidasa extracelular y el porcentaje restante (13.84 %) es atribuido a desviaciones del modelo y no a factores experimentales. Por otro lado, el modelo se ajusta adecuadamente a los datos observados (test de falta de ajuste, valor-P > 0.05) y muestra una satisfactoria correlación entre los valores experimentales y los predichos (Figura 13A). Es, por tanto, que la ecuación de regresión del modelo ajustado a los datos observados (Actividad α -galactosidasa extracelular = $-38,7343 + 13.8846A + 2.1334G + 11.1035P - 0.0970T - 0.9252P^2 + 0.0014T^2$) establece una relación causa-efecto de manera significativa entre los factores aireación, concentración de glucosa y tiempo de cultivo, y la producción de ScAGal. El efecto que más influye en la respuesta estimada por el modelo es el tiempo de cultivo seguido por la aireación y la concentración de glucosa, como se puede observar en el gráfico de efectos principales (Figura 13B). La respuesta óptima alcanzada por el modelo de superficie de respuesta dentro del espacio de diseño se obtiene con las condiciones experimentales A = +2 (0.9), G = +2 (2.5 %), P = 0 (pH 6), T = +2 (144 h). Sin embargo, podemos aplicar el método de máxima pendiente en ascenso para estimar la trayectoria que seguiría desde el centro del diseño (Figura 14A) y los análisis de superficie de respuesta para observar el comportamiento de las variables experimentales (Figura 14B). Esto nos confirma que el tiempo de cultivo posee un efecto positivo importante sobre la producción de ScAGal en comparación con la aireación y la concentración de glucosa.

Tabla 7. Matriz experimental para la optimización de ScAGal producida por BJ3505/YEpMEL1His según el DCC y resultados observados y predichos por la MSR para cada uno de los experimentos.

No.	Valores codificados				Valores reales				α -Gal (U/ml)	
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_1	X_2	X_3	X_4	Observado	Ajustado
1	-1	-1	-1	-1	0.6	1	5	72	5.73	4.29
2	1	-1	-1	-1	0.8	1	5	72	8.86	7.07
3	-1	1	-1	-1	0.6	2	5	72	10.12	6.43
4	1	1	-1	-1	0.8	2	5	72	11.30	9.21
5	-1	-1	1	-1	0.6	1	7	72	4.90	4.29
6	1	-1	1	-1	0.8	1	7	72	6.87	7.07
7	-1	1	1	-1	0.6	2	7	72	6.64	6.43
8	1	1	1	-1	0.8	2	7	72	8.40	9.21
9	-1	-1	-1	1	0.6	1	5	120	13.77	1.,37
10	1	-1	-1	1	0.8	1	5	120	17.77	15.14
11	-1	1	-1	1	0.6	2	5	120	14.24	14.50
12	1	1	-1	1	0.8	2	5	120	19.59	17.28
13	-1	-1	1	1	0.6	1	7	120	11.92	12.37
14	1	-1	1	1	0.8	1	7	120	12.89	15.14
15	-1	1	1	1	0.6	2	7	120	14.47	14.50
16	1	1	1	1	0.8	2	7	120	19.73	17.28
17	-2	0	0	0	0.9	1.5	6	96	8.34	8.14
18	2	0	0	0	0.5	1.5	6	96	13.20	13.69
19	0	-2	0	0	0.7	0.5	6	96	7.71	8.78
20	0	2	0	0	0.7	2.5	6	96	9.62	13.05
21	0	0	-2	0	0.7	1.5	4	96	4.37	7.21
22	0	0	2	0	0.7	1.5	8	96	6.40	7.21
23	0	0	0	-2	0.7	1.5	6	48	3.45	6.02
24	0	0	0	2	0.7	1.5	6	144	21.09	22.17
25	0	0	0	0	0.7	1.5	6	96	9.97	10.92
26	0	0	0	0	0.7	1.5	6	96	10.20	10.92
27	0	0	0	0	0.7	1.5	6	96	11.42	10.92
28	0	0	0	0	0.7	1.5	6	96	10.31	10.92
29	0	0	0	0	0.7	1.5	6	96	10.18	10.92
30	0	0	0	0	0.7	1.5	6	96	10.91	10.92

X_1 , aireación; X_2 , concentración de glucosa (%); X_3 , pH; X_4 , tiempo de cultivo (h). Para facilitar la comprensión de los resultados, X_1 , X_2 , X_3 , X_4 fueron nombrados como A, B, C, D, respectivamente. La respuesta, actividad α -galactosidasa extracelular (α -Gal), fue definida como la cantidad de enzima que libera un μ mol de *p*-nitrofenol por minuto en las condiciones de ensayo, pH 4 y 40 °C (ver Sección 2.5).

Tabla 8. Análisis de Varianza (ANOVA) del modelo para la producción de ScAGal por BJ3505/YEpMEL1His.

Efectos	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
A: Aireación	46,27	1	46,27	21,72	0,0004
B: Glucosa	27,31	1	27,31	12,82	0,0030
D: Tiempo	390,94	1	390,94	183,53	< 0,0001
CC	24,35	1	24,35	11,43	0,0045
DD	17,99	1	17,99	8,44	0,0115
Falta de ajuste	52,43	10	5,24	2,46	0,0603
Error total	29,82	14	2,13		
Total (corregido)	594,34	29			

$R^2 = 86.16 \%$, R^2 (ajustado para Gl) = 83.28 %, Error estándar de la estimación = 1.46, Error medio absoluto = 1.29. Gl, grados de libertad. Efectos cuadráticos de las variables pH (CC) y tiempo (DD).

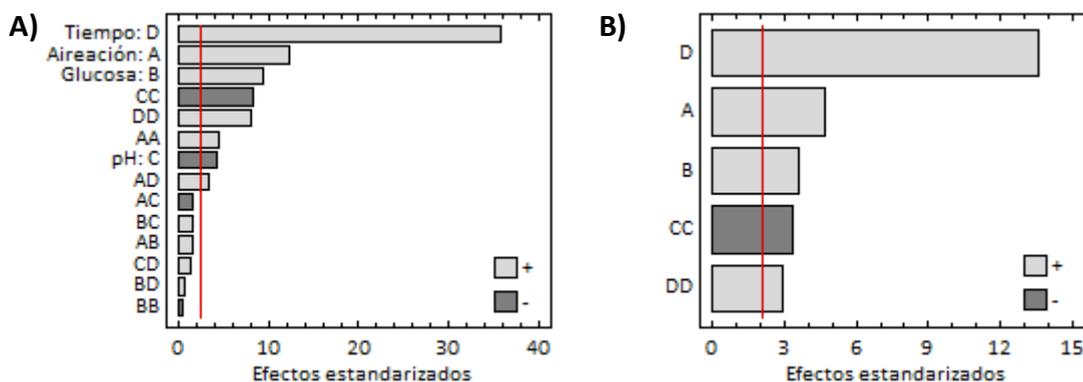


Figura 12. Diagrama de Pareto antes (A) y después (B) de eliminar los efectos estadísticamente no significativos. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado que representa el efecto estimado dividido entre el error estándar. La línea vertical roja indica la significancia (95 % de nivel de confianza) y +/- indica el efecto positivo y negativo sobre la producción de ScAGal. El gráfico representa las variables lineales (A, B, C y D), sus efectos cuadráticos (AA, BB, CC, DD) e interacciones (AB, AC, AD, BC, BD, CD).

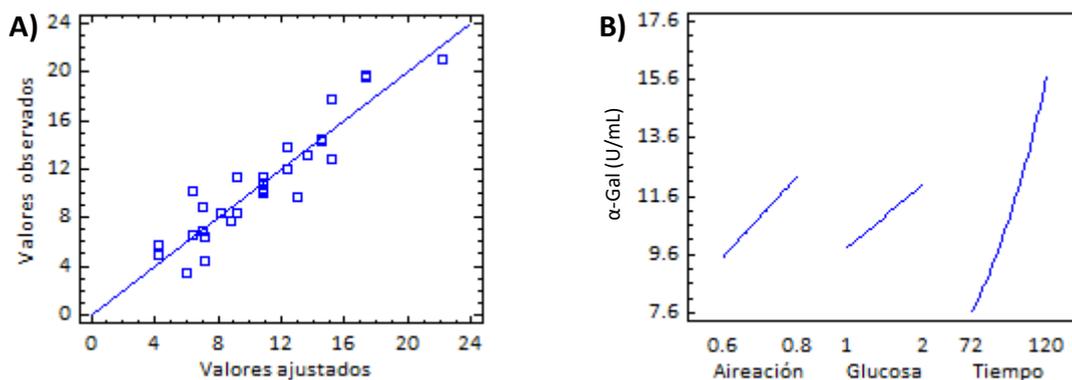


Figura 13. Gráficos de valores observados versus valores ajustados (A) y efectos lineales (B) establecidos por el modelo de regresión. A) Los puntos cercanos alrededor de la diagonal indican el óptimo del modelo y determinan que la desviación entre dichos valores fue mínima. B) El factor elegido se varía del nivel -1 al +1, mientras que el resto se mantienen constantes en sus valores centrales. Cuanto mayor es la pendiente mayor será el efecto sobre la respuesta, actividad α -galactosidasa extracelular (α -Gal).

Por otro lado, cabe resaltar que en este caso la estimación inicial de las condiciones óptimas está alejada del óptimo real porque YEpMEL1His está sujeto a represión catabólica, conforme incrementamos el nivel de glucosa aumenta el tiempo necesario para producir ScAGal. Por lo tanto, debemos controlar la concentración de glucosa para evitar tiempos largos de crecimiento que encarezcan la producción de ScAGal. La figura 15 muestra el seguimiento en el tiempo de la cepa recombinante BJ3505/YEpMEL1His empleando las condiciones de cultivo estimadas en el camino de máxima pendiente; A = 0.8, G = 2, P = 6. Se detectó una media de 24 U/mL con un incremento del 48 % en la actividad α -galactosidasa extracelular respecto a lo observado anteriormente (Sección 4.1, Figura 2). Es posible que no se alcanzara el valor estimado por el plan factorial debido a la represión catabólica que ejerce la

A)	Aireación	Glucosa (%)	pH	Tiempo (h)	Act. α Gal extracelular
	0,7	1,5	6	96	10,916 ^a
	0,73	1,61	5,99	120	16,39
	0,75	1,69	5,99	144	23,29
	0,77	1,76	5,99	168	31,68
	0,78	1,82	5,99	192	41,61
	0,79	1,86	5,99	216	53,07
	0,80	1,91	5,99	240	66,10

^aCentro del espacio del diseño actual

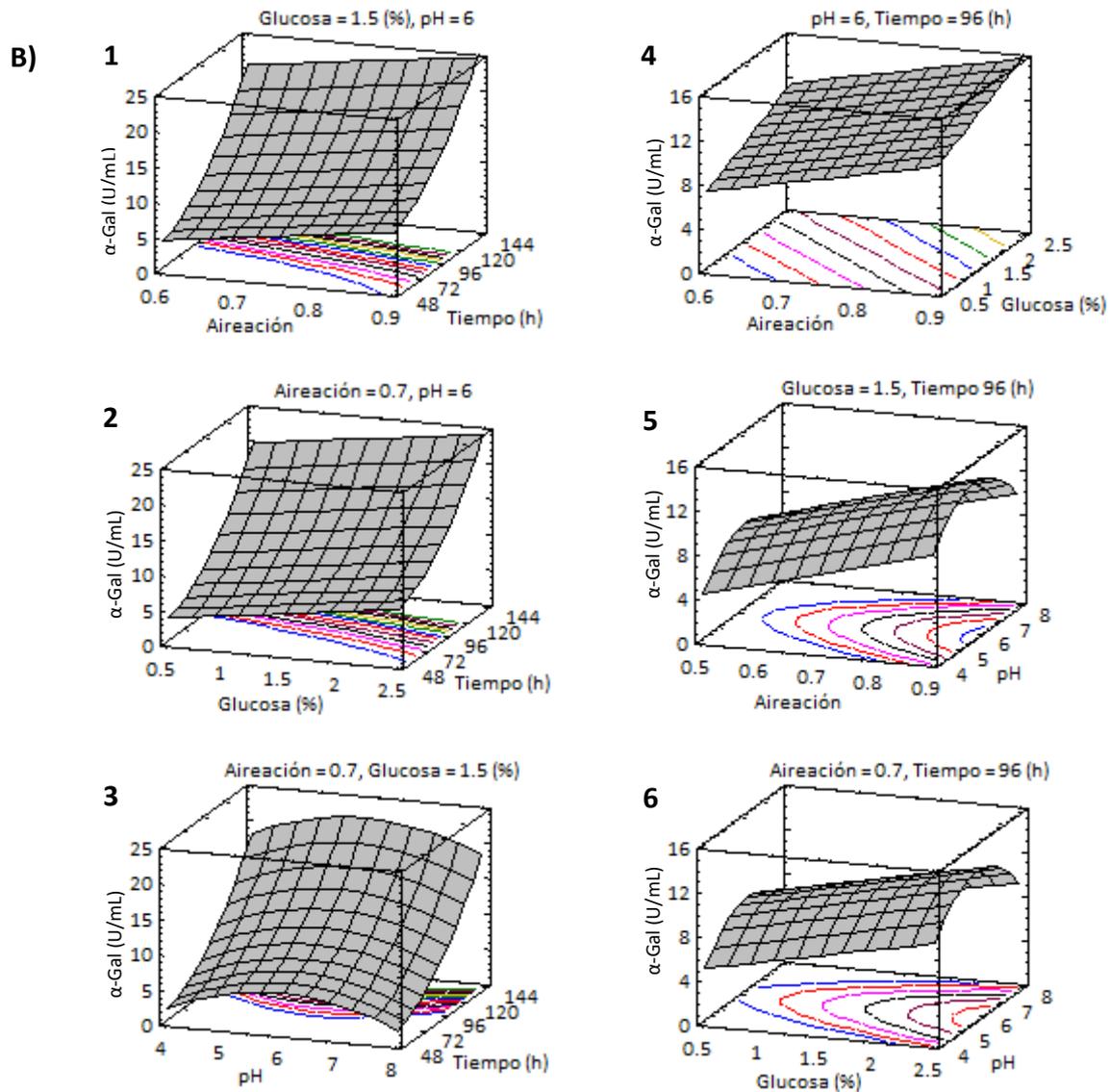


Figura 14. Optimización de la producción de ScAGal. A) El método de máxima pendiente ascendente muestra el camino desde el centro de la región experimental generado por el cambio de la variable T (incrementos de 24) y estima cuánto deben cambiar el resto de factores para así ejecutar experimentos adicionales con el objeto de aumentar la actividad α -galactosidasa extracelular. **B)** Gráficos de superficie estimados por el modelo.

glucosa sobre el promotor (*ADH2*) del plásmido que dirige la expresión génica de *MEL1*. Aunque el plan factorial sólo se realizó con la cepa recombinante BJ3505/YEp*MEL1*His, aplicando las condiciones predichas por el modelo en cultivos de BJ3505/YEp*MEL1* y BJ3505/YEp*MEL1*Flag se consiguió incrementar en un 52% y un 56% respectivamente los valores de actividad α -galactosidasa extracelular con respecto a los obtenidos en el apartado 4.1 (Figura 16A).

Por otro lado, la represión catabólica provoca que la maquinaria celular dirija el gasto de energía al crecimiento celular antes de iniciar la expresión de la proteína recombinante alargando el máximo de producción a las 216 h de cultivo. Con el propósito de evitar esto y teniendo en cuenta que la proteína sobre-expresada no es tóxica para la célula, se decidió iniciar el cultivo con una densidad celular mayor (10 OD₆₀₀ en vez de la empleada anteriormente de 0.5) y utilizar el medio YPHSM con un 1.5 % de glucosa manteniendo el resto de los parámetros predichos por el método de la máxima pendiente ($A=0.8$ y $P=6$) lo que permitió alcanzar una actividad de 66 U/mL y establecer la producción máxima a las 190 h de cultivo (Figura 16B). Por lo tanto, la optimización de las condiciones de cultivo permitió mejorar la productividad de ScAGal hasta más de 10 veces al aumentar la concentración de la fuente de carbono y la aireación en un periodo de 96 h de cultivo, y hasta 20 veces al alargar el tiempo de crecimiento a 216 h.

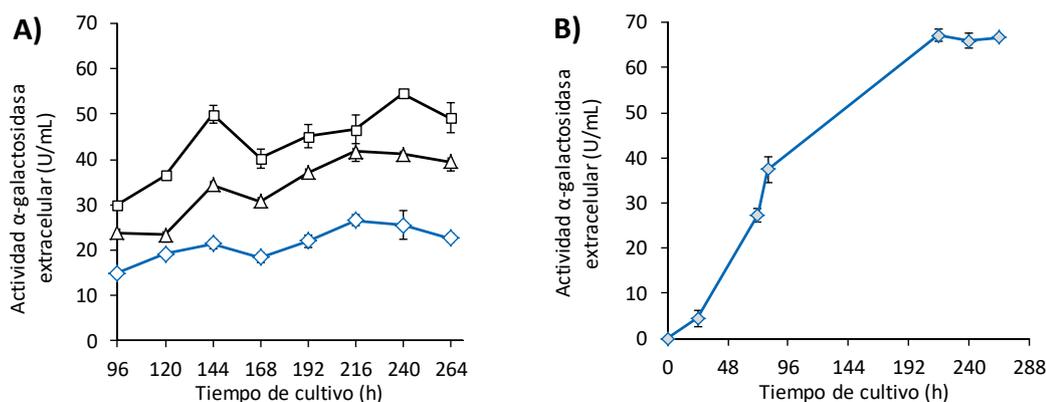


Figura 16. A) Seguimiento de la actividad α -galactosidasa extracelular de cultivos con las cepas recombinantes BJ3505/yEP*MEL1* (triángulos), BJ3505/yEP*MEL1*Flag (cuadrados) y BJ3505/yEP*MEL1*His (rombos) empleando las condiciones estimadas en el modelo ($A = 0.8$, $G = 2$, $P = 6$). **B)** Seguimiento de la actividad α -galactosidasa del medio extracelular de la cepa BJ3505/yEP*MEL1*His iniciando el cultivo a 10 OD₆₀₀ y manteniendo el resto de factores experimentales estimadas por el modelo ($A = 0.8$, $G = 1.5$, $P = 6$).

CAPÍTULO 2

Bioconversión de melazas de remolacha en la producción de α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* por una cepa de *S. cerevisiae* mejorada genéticamente

Resumen

Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* deficiente en la enzima invertasa, BJ3505 Δ suc2, fue creada para ser utilizada en la producción heteróloga de la enzima α -galactosidasa de *S. cerevisiae* (ScAGal) a partir de la reutilización de melazas de remolacha. La optimización estadística del proceso productivo mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) permitió obtener 24 U/mL, la mayor producción de α -galactosidasa extracelular descrita hasta el momento empleando medios de cultivo a base de melazas como única fuente de carbono. El cultivo en biorreactores incrementó en un 21 % el rendimiento de la producción de ScAGal en comparación con los mejores resultados alcanzados en los medios optimizados en cultivos de matraces agitados. Este estudio muestra una estrategia atractiva y novedosa, con doble valor añadido, al permitir la producción de proteína heteróloga generando etanol colateral mediante la bioconversión de residuos agroindustriales de difícil reciclaje como son las melazas de remolacha.

1. Introducción

La melaza, subproducto de la industria azucarera, es un residuo líquido denso y negruzco obtenido tras el proceso de cristalización del azúcar procedente de la remolacha o caña, tras el cual ya no es posible recuperar más azúcar. Dada la carga orgánica de este desecho, constituido principalmente por sacarosa (44–50 %), ha sido objeto de estudio pionero su bioconversión, a través de la fermentación microbiana, para la obtención de bioetanol como forma de recuperación de recursos (Basso et al., 2011). Aunque la sacarosa de la caña de azúcar o el almidón de maíz siguen siendo las materias primas predominantes para generar bioetanol, a costa de un uso abusivo de tierras de cultivo, desde hace años existen referencias sobre la aplicación de melazas, suero de leche o subproductos derivados del procesamiento de alimentos, como fuente eficiente de energía más respetuosa con el medioambiente (Akbas and Stark, 2016). Es por ello que, alternativas más baratas basadas en residuos industriales como sustratos renovables se han convertido también en el factor clave para reducir costos y aumentar la competitividad en la producción de enzimas y otros productos biotecnológicos (Darvishi et al., 2009; Gassara et al., 2010). En la producción a gran escala de proteínas recombinantes se utilizan medios convencionales a base de una fuente de carbono y nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede ser aportada mediante el tratamiento adecuado de la biomasa de levadura generada durante el proceso productivo ya que contiene proteínas, ácidos nucleicos, complejo de vitaminas B y minerales (Ferreira et al., 2010). Mientras que la fuente de carbono suele ser el principal costo de producción y la posibilidad de integrar en el medio de cultivo un subproducto barato como las melazas puede establecer un bioproceso rentable tanto desde el punto de vista económico como medioambiental (Santos et al., 2010).

S. cerevisiae presenta tolerancia a altas concentraciones de azúcar y una eficiente conversión del mismo a etanol que lo identifican como microorganismo ideal en la reutilización de melazas para la producción de bioetanol (Arshad et al., 2014). Gracias a su catalogación GRAS, es también un hospedador ampliamente utilizado en la expresión y secreción de proteínas heterólogas al permitir su plegamiento correcto y modificaciones postraduccionales eucariotas (Nielsen, 2013). Sin embargo, no hay referencias descritas hasta el momento del cultivo en melazas de remolacha para tal fin. Una levadura no convencional, *Yarrowia lipolytica* ha sido modificada para poder crecer en presencia de sacarosa y producir lacasa recombinante (Darvishi et al., 2016). Otros autores han utilizado hidrolizados de melazas de remolacha para expresar glucosa isomerasa recombinante en *Escherichia coli* con las limitaciones que supone el gasto económico del pretratamiento (Yaman and Calik, 2016). Las células de *S. cerevisiae* poseen la enzima invertasa (β -D-fructosidasa) que cataliza la hidrólisis de sacarosa en glucosa y fructosa. Ambos azúcares son metabolizados durante la glucólisis alcanzándose grandes concentraciones de piruvato intracelular cuyo excedente tiene que ser degradado a través de la vía fermentativa que conduce a la formación de etanol, incluso en condiciones aeróbicas (efecto Crabtree) (Marques et al., 2015). En este caso, la fermentación alcohólica es indeseable, ya que reducirá el rendimiento de la biomasa y finalmente la obtención de proteína heteróloga. Un metabolismo completamente respiratorio sólo tiene lugar ante concentraciones bajas de azúcar, tasas lentas de consumo de azúcar y crecimiento, y alta oxigenación. Desarrollar un bioproceso que implique un crecimiento oxidativo óptimo requiere de un cultivo en *fed-batch* o lote alimentado con equipo suplementario y sistemas de control para evitar en lo posible la producción de etanol que encarecen el proceso productivo (Finn et al., 2006). Sin embargo, los ensayos de cultivo en biorreactores ofrecen un mayor control de parámetros para la producción de proteína heteróloga y un escalado adecuado hacia una posible comercialización (Darvishi et al., 2016). Por otro lado, ya que *S. cerevisiae* secreta niveles altos de invertasa, incluso en ausencia de sacarosa, una cepa libre de invertasa podría incrementar la obtención de proteínas heterólogas extracelulares evitando el colapso de la vía secretora además de facilitar su purificación a partir del medio de extracelular. Así, se ha reportado que la mejora en la producción de α -galactosidasa recombinante a partir de una cepa de *S. cerevisiae* podría lograrse inactivando el gen o genes que codifican para la enzima invertasa (Liljestriim et al., 1991).

Dado el interés en la reutilización y valorización de subproductos agroindustriales, se decidió continuar los estudios de expresión heteróloga de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ScAGal) utilizando melazas de remolacha como sustrato sostenible alternativo. Como se ha mencionado en el capítulo 1, la actividad catalítica de esta enzima posee amplio potencial sobre la hidrólisis de oligosacáridos de la

familia de la rafinosa (*RFOs*) y galactomananos poliméricos presentes en muchos productos de interés para la industria alimentaria y farmacéutica. Es una proteína extracelular muy estable tanto a temperatura ambiente como a amplio rango de pH y presenta gran resistencia a proteasas, cualidades deseables en aplicaciones biotecnológicas. Por último, con el fin de acercarse a la implementación de la producción a escala industrial, se hace esencial el uso de biorreactores que permiten controlar adecuadamente parámetros que afectan al proceso productivo y que son seleccionados previamente durante la optimización estadística mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (Almeida et al., 2017). Es por todo ello, que en este trabajo se describe la optimización y desarrollo de bioprocesos para la producción de ScAGal u otras proteínas heterólogas a partir de una cepa de *S. cerevisiae* deficiente en invertasa empleando melazas de remolacha como única fuente de carbono, permitiendo así la valorización y disminución de la contaminación ambiental de estos residuos agroindustriales.

2. Metodología

2.1. Microorganismos, vectores de expresión y medios de cultivo

S. cerevisiae BJ3505 [*pep4:: HIS3, prb-Δ1.6R HIS3, lys2-208, trp1-Δ101, ura 3-52, gal2, can1*] (*Eastman Kodak Company*) fue la cepa elegida para construir un mutante deficiente en actividad invertasa como hospedador para la expresión de proteína heteróloga. Los vectores de expresión utilizados fueron los plásmidos YEpMEL1 [*amp^r ori 2μ MEL1 TRP1*] y YEpMEL1His [*amp^r ori 2μ MEL1His TRP1*] (Fernández-Leiro, 2011) que contienen el gen *MEL1* que codifica para la ScAGal. El vector YEpFLAG-1 (*Eastman Kodak Company*) fue utilizado como control del sistema de expresión. En las manipulaciones de ADN estándar se empleó *Escherichia coli* XL1-Blue [*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]*] (*Stratagene Cloning Systems*) utilizando técnicas habituales de biología molecular (Sambrook and Russell, 2001). Los medios de cultivo YPD (1% extracto levadura, 0.5% bactopectona, 0.5% glucosa), LB (1% bacto triptona, 0.5 % extracto levadura, 0.5 % NaCl) se utilizaron para el crecimiento y mantenimiento de BJ3505 y XL1-Blue, respectivamente. LB suplementado con 100 mg/L ampicilina fue el medio para la propagación de plásmidos en XL1-Blue y el medio completo sin el aminoácido uracilo (CM-Ura) o triptófano (CM-Trp) (Zitomer and Hall, 1976) para la selección en *S. cerevisiae*. Cuando fue necesario, se suplementaron con un 2 % de agar para la preparación de medios sólidos en placa. En la producción de ScAGal se empleó el medio convencional YPHSM modificado (composición en Tabla 2) y medios basados en melazas de remolacha azucarera, donadas por la empresa nacional AB Azucarera Iberia, descritos más adelante. Para facilitar la manipulación de la melaza, ésta fue diluida en agua destilada en una ratio 1:1 (v/v) y centrifugada a 10000 rpm durante 15 min para

permitir la eliminación de impurezas sólidas. Todos los componentes de los medios descritos en este trabajo fueron esterilizados por autoclavado a 121 °C durante 20 min, excepto la ampicilina que fue añadida posteriormente después de ser esterilizada a través de filtros de 0.22 micras de tamaño de poro (*Sartorius AG*).

2.2. Construcción de una cepa de *S. cerevisiae* deficiente en invertasa

El gen *SUC2* que codifica para la enzima invertasa de *S. cerevisiae* fue anulado en la cepa BJ3505 mediante el diseño del casete integrativo *suc2Δ(266-388)URA3* que contiene la delección *suc2Δ(266-388)* y el gen *URA3* como marcador de selección (Figura 1). La tabla 1 muestra los cebadores utilizados en este trabajo.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en la construcción de la cepa BJ3505Δ*suc2*.

Cebador	Secuencia	Dirección	Sitio de restricción
MAC14	5'CCACGATGGTAATAGACG	Sentido	
MAC15	5'GAGATAAATATCCTCCAGTCC	Antisentido	
MAC18	5'GCGGATCCCCTTTAGCTGTTCTATATGCTGC	Sentido	<i>Bam</i> HI
MAC19	5'CCGGTACCCACCTGACGTCTAAGAAACC	Antisentido	<i>Kpn</i> I
MAC23	5'CGCTGTATTCTTAGGTGCTATACC	Sentido	
MAC24	5'CATTTCATATTTCTAACTCACTAACC	Antisentido	
ECV700	5'TTGTAAGTGGCGGATAATGC	Sentido	
ECV699	5'ACCAATCGTAACCTTCATCTCTT	Antisentido	

El diseño de cebadores se realizó mediante el programa *NetPrimer Analyse*. Los sitios de restricción son subrayados.

Obtención de los casetes *SUC2* y *URA3*. La identificación y el análisis para localizar la *ORF* del gen *SUC2* se realizó con la herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (*BLAST*) de la base de datos *GeneBank* donde están anotados varios genomas de diferentes cepas de *S. cerevisiae* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dada la homología entre cepas, en el diseño del casete *SUC2* se utilizó la secuencia nucleotídica [36185 – 40044] que contiene el gen *SUC2* localizada en el cromosoma 9 de *S. cerevisiae* S288c (*Gene ID*: 854644; NC_001141.2) (Figura 1A). Se incluyó una zona de más de 1 Kb “aguas arriba” y “aguas abajo” de la *ORF* de *SUC2* para ejercer presión competitiva sobre el marcador genético *ura3-52* que posee la cepa BJ3505. El fragmento de 3831 pb de longitud correspondiente al casete *SUC2* fue amplificado con los cebadores MAC14 y MAC15 a partir de ADN genómico aislado de la cepa BJ3505 mediante el protocolo de extracción rápida de ADN cromosómico de levaduras (Ausubel et al., 2003). Por otro lado, un fragmento de 1308 pb flanqueado por los sitios de restricción *Bam*HI y *Kpn*I fue amplificado a partir del vector YEplac195 (Gietz and Sugino, 1988) utilizando los cebadores MAC18 y MAC19 para obtener el casete *URA3* con su región promotora y terminadora. Todas las PCRs fueron llevadas a cabo con la ADN polimerasa de alta fidelidad *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (*Thermo Scientific*).

Construcción de los plásmidos pJETSUC2, pSparkURA3 y pJETSuc2Δ(266-388)URA3. Los productos de PCR obtenidos de la amplificación de los casetes *SUC2* y *URA3* fueron clonados en los vectores linealizados pJET1.2/blunt (*CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific*) y pSpark IV (*pSpark DNA Cloning System, Canvax Biotech*) respectivamente, según el protocolo descrito por cada fabricante para crear los plásmidos *pJETSUC2* y *pSparkURA3*. El fragmento de 1308 pb *Bam*HI-*Kpn*I de *pSparkURA3* se clonó entre los sitios *Bam*HI-*Kpn*I de *pJETSUC2* para generar el plásmido *pJETSuc2Δ(266-388)URA3* con las secuencias de recombinación SR1 (1962 pb) y SR2 (1503 pb) que permitieron la integración cromosómica (Figura 2). La identificación de recombinantes se realizó mediante análisis de PCR de las colonias transformantes utilizando una *Taq* polimerasa (*DreamTaq polimerase, Thermo Fisher Scientific*). Los plásmidos fueron purificados (*GeneJET Plasmid Miniprep Kit*) y los insertos verificados por secuenciación (Servicios de Apoyo á Investigación, Universidade da Coruña).

Integración del casete *suc2Δ(266-388)URA3* en el genoma de la cepa BJ3505. El plásmido *pJETSuc2Δ(266-388)URA3* fue digerido con *Bgl*II para liberar el casete *suc2Δ(266-388)URA3* y clonarlo en células BJ3505 competentes transformadas mediante el método de acetato de litio (Ito et al., 1983). La integración cromosómica se logró mediante dos puntos de recombinación homóloga aportados por las secuencias SR1 y SR2 (Figura 1B). Las colonias transformantes fueron seleccionadas en cultivo en placa CM-Ura por complementación de la auxotrofia. Finalmente, la cepa deficiente en invertasa, nombrada como BJ3505Δ*Suc2*, fue verificada mediante ensayo funcional de actividad invertasa (Figura 3A) y análisis de PCR utilizando cebadores que anillan en el genoma de la cepa de origen confirmaron la integración del casete *suc2Δ(266-388)URA3* en el lugar correcto dentro del cromosoma 9 de la cepa de origen (Figura 3B).

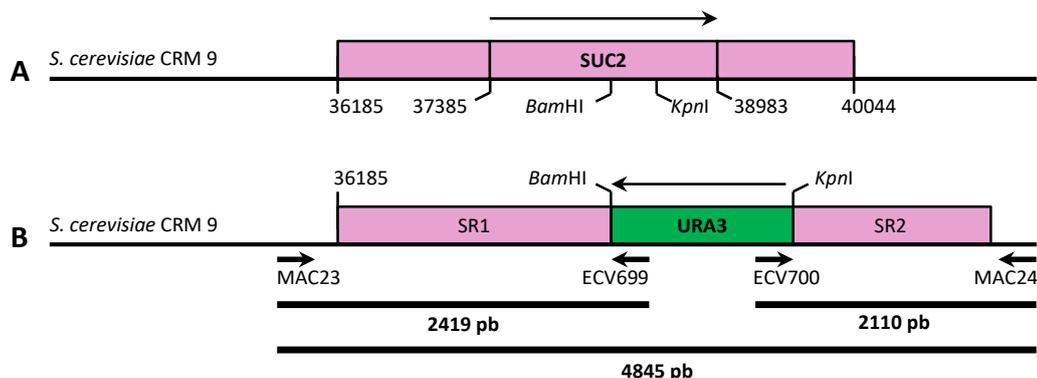


Figura 1. Diseño del casete integrativo *suc2Δ(266-388)URA3*. **A)** La secuencia de nucleótidos [36185-40044]pb del cromosoma 9 (CRM 9) de *S. cerevisiae* tomada de datos del Gene Bank (Gene ID: 854644; NC_001141.2) permitió elaborar el casete *SUC2* que contiene la *ORF* de *SUC2*. **B)** Los sitios de restricción, *Bam*HI y *Kpn*I, fueron elegidos para llevar a cabo la delección *suc2Δ(266-388)* por reemplazamiento con el casete *URA3* derivado del vector YEplac195. SR 1 y SR2 son las secuencias de recombinación cromosómica y los pares de cebadores MAC23 y ECV699, ECV700 y MAC24, y MAC23 y MAC24, se emplearon para obtener por PCR los fragmentos 2419 pb, 2110 pb y 4845 pb, respectivamente, y comprobar la integración cromosómica del casete *suc2Δ(266-388)URA3*.

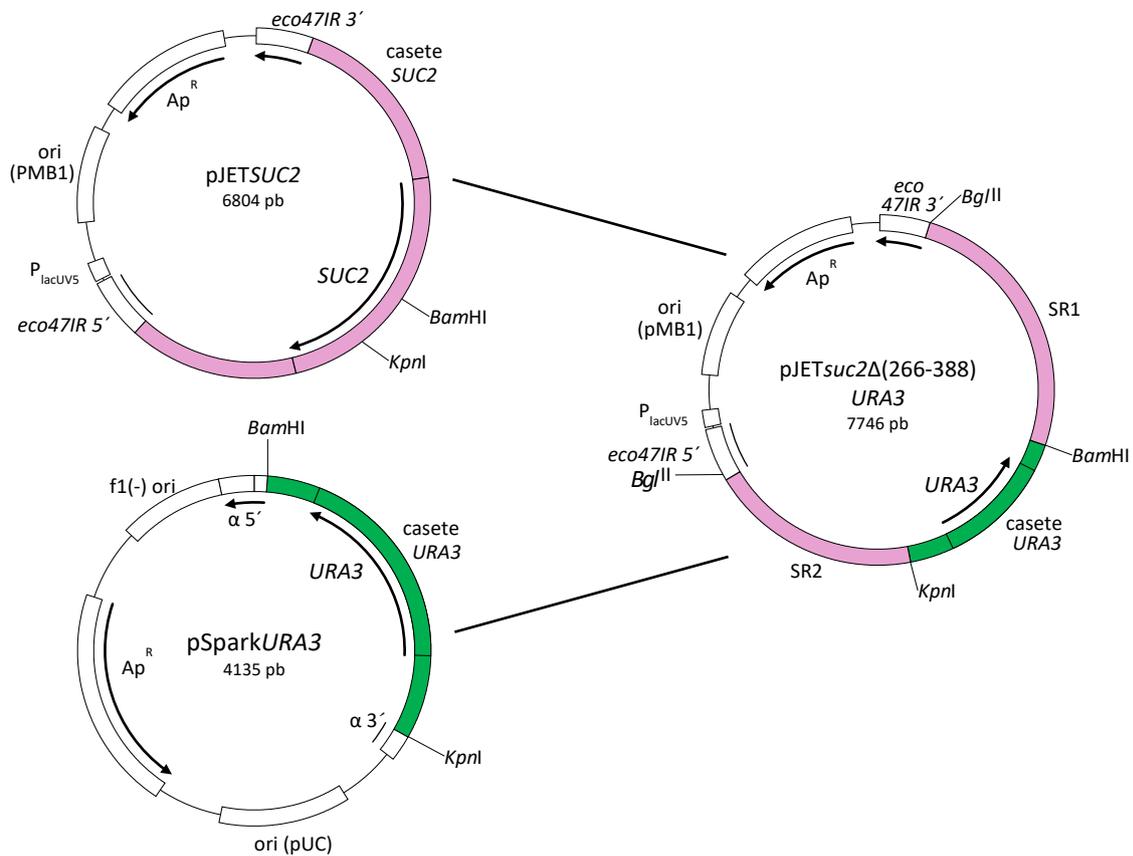


Figura 2. Mapas físicos de los plásmidos construidos para generar la cepa BJ3505Δ*suc2*. pJETSUC2 y pSparkURA3 se crearon mediante el clonaje de los casetes SUC2 y URA3 en los vectores linealizados pJET1.2 y pSpark IV, respectivamente. Un fragmento de 1308-pb BamHI-KpnI de pSparkURA3 fue clonado entre los sitios BamHI-KpnI de pJETSUC2 para obtener pJETSuc2Δ(266-388)URA3. La digestión de pJETSuc2Δ(266-388)URA3 con BglII liberó el casete *suc2*Δ(266-388)URA3 que fue integrado por recombinación homóloga a través de las secuencias SR1 y SR2 en el CRM 9 de la cepa de partida utilizando el gen URA3 como marcador de selección. Las barras vacías representan secuencias de nucleótidos derivados de los plásmidos de origen y las coloreadas a los fragmentos de ADN insertados para obtener cada una de las construcciones plasmídicas.

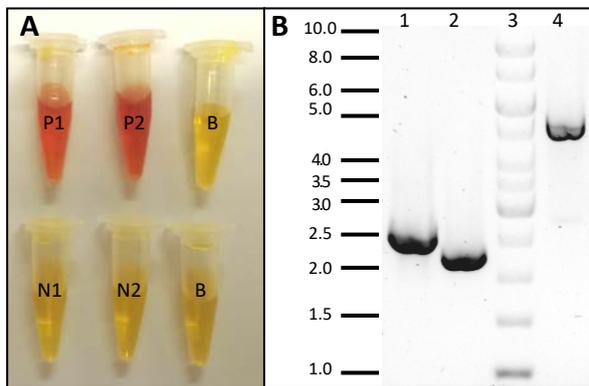


Figura 3. Confirmación de la obtención de la cepa de *S. cerevisiae* BJ3505Δ*Suc2*. A) Ensayo funcional negativo (color amarillo) y positivo (color naranja) de actividad invertasa extracelular (1) e intracelular (2) según se describe en la Sección 2.8. N, cepa BJ3505Δ*Suc2*; P, cepa BJ3505 (parental); B, blanco. B) Análisis de PCR de las zonas “aguas arriba” (2419 pb, calle 1), “aguas abajo” (2110 pb, calle2) y entre ambas (4845 pb, calle 4) del gen SUC2 que codifica para la enzima invertasa. Calle 3, marcador de peso molecular (Kb) GeneRuler 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

2.3. Transformación y preparación del inóculo de los medios de producción

Las cepas BJ3505 Δ Suc2 y parental fueron transformadas con los plásmidos YEpFLAG-1, YEpMEL1 y YEpMEL1His, descritos en el capítulo 1, mediante una modificación del método de acetato de litio (Chen et al., 1992). Los recombinantes se seleccionaron en placa CM-Trp tras un periodo de incubación de 48 horas a 30 °C. Una única colonia fue seleccionada para preparar un precultivo líquido en CM-Trp hasta alcanzar la fase estacionaria (30 °C, 250 r.p.m, 16 h) que fue utilizado como inóculo de los medios de producción ensayados.

2.4. Medios y estudio preliminar de las condiciones de producción

En la tabla 2 se describe la composición de los medios de cultivo empleados en el estudio de crecimiento celular y producción de ScAGal a partir de las cepas BJ3505 Δ Suc2 y parental transformadas. La melaza de remolacha fue añadida a la concentración deseada como medida de porcentaje en azúcar total y suplementada con extracto de levadura y/o bactopectona para aportar la fuente de nitrógeno. El extracto de levadura procedente de la biomasa recuperada de cultivos finales fue preparado mediante una modificación del procedimiento de autólisis celular descrito previamente (Belem et al., 1997). En este caso, las células de levadura centrifugadas (5000 rpm, 15 min, 4 °C) fueron resuspendidas en 0.1 M KH₂PO₄ pH 6.5 a razón 1:2 (p/v) y autolisadas a 50 °C con agitación moderada (150 rpm) durante 30 h. Tras ser recuperado este primer sobrenadante por centrifugación (10000 rpm, 15 min), los restos celulares fueron de nuevo resuspendidos en el mismo tampón a razón 1:10 y desintegrados con un ultrasonicador (*Sonics Vibra cell*) durante 10 min a intervalos de 7 s para facilitar la liberación de todo el material soluble celular en un segundo sobrenadante previamente recentrifugado. Finalmente, un 0.5 % de la mezcla de ambos sobrenadantes fue utilizado como suplemento en la preparación de los medios de cultivo correspondientes. El ARN liberado del autólisis final fue analizado mediante un gel de electroforesis de agarosa al 1.5 % utilizando como control un extracto de levadura comercial al 1 % (Figura 6A). Todos los cultivos fueron inoculados por triplicado en matraz agitado con un 20 % de volumen de medio e incubados a 30 °C y 250 rpm de agitación a partir de precultivos de cepas transformadas. El medio YPHSM inoculado hasta alcanzar una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.5 fue empleado para evaluar estadísticamente los sistemas de expresión YEpMEL1 y YEpMEL1His mediante un ANOVA simple (*StatGraphics Plus* versión 5.1). La evaluación inicial del consumo de azúcar y formación de productos en medios basados en melazas de remolacha YPR, YP y PR se realizó con cultivos inoculados a 2OD₆₀₀. Por otro lado, cultivos en medios YR y YR* sembrados a 4OD₆₀₀ fueron empleados en el estudio de la asimilación de la fuente de carbono utilizando extracto de levadura comercial y biomasa autolisada, respectivamente. Finalmente, se realizó una evaluación de la

cinética de crecimiento y conversión de sustratos a productos en cultivos YR a $4OD_{600}$. En este caso, tras un periodo de 40 h de crecimiento, se separó a parte la mitad del volumen de cada uno de los cultivos mientras que la otra mitad se mantuvo en las mismas condiciones. Conservando la esterilidad, el volumen retirado de cada cultivo se centrifugó (5000 rpm, 10 min, 4 °C), el sobrenadante fue refrescado con 1 % de extracto de levadura e inoculado con la misma densidad celular inicial a partir del sedimento recuperado. Tras detener todos los cultivos a las 84 h de crecimiento, se repitió el paso anterior sólo con los cultivos procedentes de la cepa recombinante, pero utilizando como inóculo la cepa parental mantenida a la misma densidad celular inicial. En los casos indicados, se recogieron muestras de cultivo a diferentes tiempos de incubación para la determinación de biomasa, azúcar residual, etanol y las actividades enzimáticas α -galactosidasa e invertasa.

Tabla 2. Medios de cultivo empleados en la evaluación de la producción de ScAGal

<i>Medio de cultivo</i>	<i>Composición</i>
YPHSM modificado	1 % extracto levadura, 8 % bactopectona, 3 % glicerol, 0.5-2 % glucosa
YG	1 % extracto levadura, 0.5 % glucosa
YPR	1 % extracto levadura, 2 % bactopectona, 8 % melaza de remolacha
PR	2 % bactopectona, 8 % melaza de remolacha
YR	1 % extracto levadura, 6-7-8 % melaza de remolacha
YR*	0.5 % biomasa autolisada, 8 % melaza de remolacha

La concentración de melaza de remolacha fue determinada como medida del porcentaje en azúcar total. La biomasa autolisada preparada según se describe en el texto fue añadida al medio de cultivo correspondiente.

2.5. Microscopía

Se utilizó un microscopio óptico (*Nikon Eclipse 50*) para el análisis microscópico de células recogidas de muestras de cultivo a diferentes intervalos de tiempo observadas inmediatamente sin fijación. Por otro lado, las células fueron fijadas y digeridas en tampón cacodilato sódico 100 mM (pH 7.2) como se describe previamente (Bauer et al., 2001) para la visualización de compartimentos y orgánulos celulares mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) realizado por un servicio exterior (Servicios de Apoyo á Investigación, Universidade da Coruña).

2.6. Optimización de la producción de ScAGal mediante la Metodología de Superficie de Respuesta

La optimización estadística de los medios de producción de ScAGal a partir de melazas de remolacha se realizó con la metodología de superficie de respuesta (MSR) utilizando la cepa recombinante BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1. La concentración de melaza de remolacha y de extracto de levadura, el tamaño del inóculo y el tiempo de cultivo fueron los factores experimentales seleccionados como variables independientes y, la variable dependiente o respuesta medida fue el análisis de la actividad α -galactosidasa extracelular de los cultivos ensayados. La composición del medio de producción varió según el diseño experimental y la preparación del inóculo y resto de

condiciones de cultivo se realizaron según las indicaciones descritas anteriormente. Se aplicó el diseño de compuesto central (DCC) para estudiar los efectos e interacciones de los cuatro factores elegidos a cinco niveles diferentes, cuyos valores codificados fueron $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$, donde $\alpha = 2^{k/4}$, k es el número de variables independientes y 0 corresponde al punto central. En la tabla 3 se indican los niveles y valores reales de los factores calculados según la ecuación descrita previamente (de Faria et al., 2013). La MSR fue ajustada mediante una ecuación polinómica de segundo orden que relaciona la respuesta medida con las variables independientes, (Dilipkumar et al., 2013) y los valores óptimos del DCC se obtuvieron resolviendo la ecuación de regresión y analizando las gráficas de contorno de superficie de respuesta. Se realizó un ANOVA con intervalos de confianza del 95 % para determinar la importancia de los efectos. El tratamiento de datos estadísticos y la construcción de los gráficos se llevaron a cabo con la ayuda del programa *StatGraphics Plus para Windows* versión 5.1 (*Statistical Graphics Corporation*).

Tabla 3. Factores experimentales, niveles del DCC y su correspondencia entre los valores codificados y reales estudiados en la optimización de la producción de ScAGal por la cepa BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1.

Factores experimentales Valores reales	Valores codificados				
	-2	-1	0	1	2
Melaza (%), X_1	11	12.5	14	15.5	17
Extracto de levadura (%), X_2	1	1.5	2	2.5	3
Inóculo (OD ₆₀₀), X_3	0.5	2.5	4.5	6.5	8.5
Tiempo (h), X_4	36	60	84	108	132

$x_i = (X_i - X_0)/\Delta X_i$; donde x_i es el valor codificado de la variable independiente, X_i es el valor real de la variable independiente, X_0 es el valor real de la variable independiente en el punto central del dominio experimental y ΔX_i el incremento de X_i correspondiente a una unidad del valor adimensional x_i .

2.7. Condiciones de operación de biorreactores

Como sistema de producción a escala laboratorio, se realizaron cultivos en biorreactores *Biostat-MD (Braun-Biotech)* 2 L con un volumen de trabajo de 1 L de capacidad que permitió llevar a cabo un control de pH para evaluar su efecto en el medio de producción. La composición del medio basado en melazas de remolacha y el tamaño del inóculo fueron seleccionados a partir de los resultados obtenidos durante los ensayos de optimización anteriores. Tras la esterilización del biorreactor a 121°C durante 30 min, éste fue inoculado, según se describe en la Sección 2.3., y suplementado asépticamente con 300 mg/L de ampicilina manteniendo condiciones controladas de 30 °C, 2 L/min de flujo de aire y 300 rpm de agitación mecánica durante 120 h de cultivo. Se añadió NaOH 1 M o HCl 1 M previamente esterilizados cuando fue requerido ajustar el pH durante el cultivo. Se tomaron muestras a intervalos regulares de tiempo para la determinación de la biomasa celular, la actividad α -galactosidasa extracelular y la conversión de sustratos en metabolitos secundarios. Por otro lado, se determinó la estabilidad plasmídica como porcentaje de colonias viables Trp+ tras la siembra de muestras diluídas del cultivo sobre placas CM

y CM-Trp y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), % estabilidad plasmídica = $(UFC_{CM-Trp}/UFC_{CM}) * 100$.

2.8. Métodos analíticos

Contenido de azúcar en melazas. Los azúcares presentes en la melaza de remolacha diluida empleada en la preparación de los medios de cultivo fueron identificados y cuantificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un patrón externo compuesto por concentraciones conocidas de rafinosa, sacarosa, glucosa y fructosa comprendidas entre 4 – 0,06 mg/mL.

Determinación de biomasa, azúcar residual y etanol. El crecimiento celular de cultivos en matraz agitado se midió por densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) con un espectrofotómetro UV-Visible (*Biospectrometer Kinetic eppendorf*). El medio libre de células fue utilizado para la determinación de etanol con el ensayo enzimático *Ethanol, UV method (NZYTtech)* y azúcar residual. Éste último fue cuantificado de forma indirecta con el método del DNS (Miller, 1959) mediante el análisis del contenido en azúcar antes y después de una hidrólisis de las muestras a 95 °C durante 5 min con HCl al 18.5 %, seguida de un paso de neutralización con NaOH al 25 %. En biorreactores, la biomasa fue determinada por el método de peso seco a partir de muestras de 5 mL de cultivo tras ser centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min, lavadas con agua destilada, recentrifugadas y secadas en un horno a 105 °C hasta alcanzar un peso constante. Con el sobrenadante recuperado se midió el consumo de azúcar y formación de etanol y otros subproductos mediante HPLC utilizando un patrón externo compuesto por concentraciones de rafinosa, sacarosa, galactosa, glucosa, fructosa, glicerol y etanol comprendidas entre 4 – 0,06 mg/mL.

Análisis de HPLC. Los análisis de HPLC se realizaron con la columna *Sugar Pack Waters* (6.5 mm x 300 mm) equipada con un *Refractive Index Detector (Cienytech)*. Todas las muestras fueron previamente clarificadas mediante extracción en fase sólida con los cartuchos *HyperSep Silica SPE Column (Fisher Scientific)* para eliminar interferencias por pigmentos y otras impurezas de las melazas. Las condiciones de trabajo fueron, temperatura de la columna 80 °C, temperatura del detector 37 °C y sensibilidad 32 empleando como fase móvil EDTA-Calcio 100 μ M (*Sigma Aldrich*) a un flujo de 0.5 mL/min. Los compuestos eluidos fueron identificados y cuantificados utilizando sorbitol (1 mg/mL) como patrón interno, el cual no interfiere con los tiempos de retención de los compuestos de estudio (Xu et al., 2014).

Actividad enzimática y concentración de proteína. La actividad α -galactosidasa extracelular se midió con el método descrito previamente (Ryan et al., 1998) incubando las muestras con el sustrato sintético PNPG 10 mM (*Sigma Aldrich*) en

tampón McIlvaine pH 4 a 40 °C. A dos intervalos de tiempo consecutivos, la reacción se paró con Na₂CO₃ 0.5 M y se midió el *p*-nitrofenol liberado a 400 nm (coeficiente de extinción molar, 18.20 mmol⁻¹.cm⁻¹). Se determinó la actividad invertasa extracelular e intracelular a partir de sobrenadante y sedimento celular previamente permeabilizado con cloroformo 15 % y SDS 0.01 %, separados por centrifugación de las muestras de cultivo. Tras llevar a cabo la reacción incubando cada muestra con sacarosa 100 mM en tampón acetato 50 mM pH 5 durante 10 min a 40 °C, ésta se detuvo por ebullición y se determinó el azúcar reductor generado mediante el método del DNS (Miller, 1959). La unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera un μmol de producto por minuto en las condiciones de ensayo. La concentración de proteína se determinó por el método de *Bradford* utilizando el *DC Protein Assay Kit (Bio Rad)* y la albúmina de suero bovino como patrón de la recta de calibrado. En todos los casos se tomaron muestras por triplicado y se utilizó como espectrofotómetro un lector de placas (*BIO RAD Molecular Imager Gel Doc XR*).

3. Resultados

3.1. Aproximación a la obtención de un medio de producción de ScAGal basado en melazas de remolacha

En primer lugar, cultivos en YPHSM de las cepas BJ3505Δ*Suc2* y parental, que contienen los plásmidos YEp*MEL1His* o YEp*MEL1*, con o sin etiqueta de purificación, respectivamente, fueron utilizados para evaluar la elección del mejor sistema de expresión de ScAGal. YPHSM es el medio convencional recomendado para la producción de proteína heteróloga con el sistema de expresión en levaduras YEpFLAG-1 (Eastman Kodak Company) empleado previamente para generar dichas construcciones (Fernández-Leiro, 2011). YEp*MEL1His* permite la obtención de la proteína recombinante con una etiqueta Poli-His (6 His) en su extremo carboxilo terminal para su purificación mediante cromatografía de afinidad. Todos los cultivos mostraron un crecimiento parejo ($OD_{600} = 90 \pm 10$) y, además, ambas cepas alcanzaron a las 216 h una actividad α-galactosidasa extracelular máxima similar alrededor de 43 U/mL y 25 U/mL con YEp*MEL1* y YEp*MEL1His*, respectivamente (Figura 4).

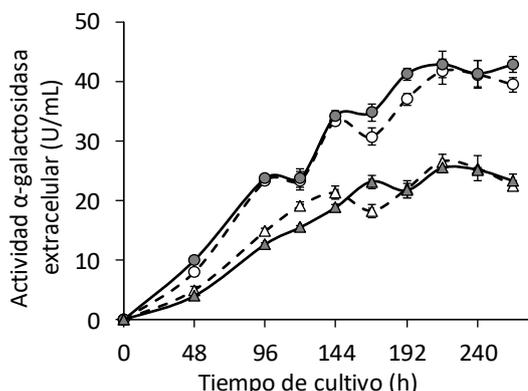


Figura 4. Seguimiento de la actividad α-galactosidasa extracelular empleando un medio de cultivo convencional. Los cultivos en el medio YPHSM modificado (1% extracto de levadura, 8 % bactopectona, 2 % glucosa, 3 % glicerol) fueron inoculados a una OD_{600} de 0.5 a partir de precultivos de las cepas BJ3505Δ*suc2* (línea continua) y BJ3505 (línea discontinua) transformadas con los plásmidos YEp*MEL1* (círculo), y YEp*MEL1His* (triángulo).

Esto demuestra que la cepa secreta la misma cantidad de ScAGal a pesar de tener anulado el gen que codifica para la invertasa y descarta la mejora descrita previamente (Liljestriim et al., 1991). Sin embargo, la utilización de esta cepa como hospedador de proteína heteróloga, posee la ventaja de permitir obtener preparaciones enzimáticas de ScAGal que no están contaminadas con actividad invertasa para su uso en la industria azucarera u otras aplicaciones que así lo requieran. Por otro lado, si bien la razón-F de la tabla ANOVA muestra que hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de todos los grupos de cultivos (p -valor $< 0,05$), la prueba de rango múltiple eliminó los pares de grupos 1-3, y 2-4 (Tabla 4) confirmándose, por lo tanto, que el mejor sistema de expresión es YEpMEL1 independientemente de la cepa utilizada. La ScAGal expresada a partir de YEpMEL1 puede ser parcialmente purificada a través de membranas de filtración tangencial evitando el uso de otros sistemas de purificación que conllevan un costo adicional en el proceso productivo a nivel industrial. Por otro lado, en caso de ser necesario, el producto final puede obtenerse totalmente puro mediante un sistema de inmovilización enzimática (Cárdenas-Fernández et al., 2012) que será discutido en el capítulo 4. Por consiguiente, se eligió el sistema de expresión BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 para realizar los siguientes ensayos utilizando melazas de remolacha como medio de producción.

Tabla 4. Análisis de Varianza de cultivos empleando YPHSM como medio de producción de ScAGal.

Resumen estadístico						
<i>Sistema de expresión (Grupos)</i>		<i>Media</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Sesgo</i>	<i>Curtosis</i>
BJ3505 Δ suc2	YEpMEL1 (1)	35.33	23.30	43.85	-0.685	-0.811
	YEpMEL1His (2)	20.75	12.66	25.49	-0.985	-0.301
BJ3505	YEpMEL1 (3)	33.94	23.36	41.70	-0.678	-0.749
	YEpMEL1His (4)	21.26	14.85	26.57	-0.300	-0.141
ANOVA						
<i>Variabilidad</i>		<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre-grupos		1493.92	3	497.97	12.43	0.000
Dentro-grupos		1121.86	28	40.07		
Total (Corregido)		2615.78	31			
Prueba de Rangos Múltiples						
<i>Contraste</i>		<i>Significancia</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Limites</i>		
1 - 2		*	14.576	6,483		
1 - 3			1.392	6,483		
1 - 4		*	14.066	6,483		
2 - 3		*	-13.184	6,483		
2 - 4			-0.510	6,483		
3 - 4		*	12.674	6,483		

La medida de la actividad α -galactosidasa extracelular de los cultivos ensayados es la variable independiente o respuesta de estudio. El método utilizado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD). *Denota una diferencia estadísticamente significativa entre parejas de grupos (contraste); Gl, grados de libertad.

La melaza de remolacha además de ser un sustrato rico en fuente de carbono, posee también biotina, sales de potasio, calcio y cloro, y pequeñas cantidades de

proteína soluble siendo la proporción de aminoácidos esenciales muy baja (FEDNA, www.fundacionfedna.org). La melaza bruta utilizada en este trabajo contiene 59.7 % de sacarosa, 2.9 % rafinosa, 1.2 % glucosa, 2.4 % fructosa y una fracción nitrogenada del 0.3 %. Al no resultar ser una buena fuente de nitrógeno, de fósforo ni de magnesio, las melazas son suplementadas con sales de amonio, urea, ácido fosfórico y sulfato de magnesio (Arshad et al., 2014; Darvishi et al., 2016). Sin embargo, en este caso no se añadieron sales porque datos preliminares de cultivos BJ3505/YEpMEL1His empleando 1.5 % de melaza de remolacha con 1 % extracto de levadura mostraron una biomasa celular máxima mayor ($OD_{600} = 30$) en comparación a medios a los que se le adicionaron sales ($OD_{600} = 20$) alcanzando en ambos casos la fase estacionaria a las 96 h de cultivo (Martínez Moro, 2015). En la figura 5 se muestra el transcurso del consumo de azúcar y producción de actividad α -galactosidasa extracelular de cultivos inoculados a una OD_{600} de 2 en melaza de remolacha suplementada con extracto de levadura y/o peptona como fuente de nitrógeno. Dado que BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 es deficiente en invertasa sólo puede utilizar como fuente de carbono primero la glucosa y fructosa presente en la melaza y después galactosa obtenida tras la hidrólisis de rafinosa por acción de la ScAGal expresada, lo que le permite consumir a las 48 h de cultivo alrededor del 19 %, 20 % y 10 % del azúcar proporcionado por los medios YPR, YR y YP, respectivamente. Sin embargo, la cepa parental transformada, que ahora en adelante nombraremos como “parental”, es capaz, por la presencia de invertasa que permite la hidrólisis de sacarosa a glucosa y fructosa, de utilizar hasta el 90 % del azúcar de los medios probados en el mismo intervalo de tiempo (Figura 5A). Por otro lado, aunque ésta presentó la máxima actividad α -galactosidasa extracelular (8 U/mL) con el medio YPR, esto se debe al incremento de la fuente de carbono fácilmente asimilable proporcionada por la acción de la invertasa junto al aporte extra de fuente de nitrógeno por la combinación de extracto de levadura y peptona. Sin embargo, en los medios YR y PR, BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 posee una actividad mayor de 4 U/mL y 3.5 U/mL en comparación con la parental que fue de 2.4 U/mL y 1.6 U/mL, respectivamente (Figura 5B), lo que significa que el uso de peptona es evitable, dado que además es un sustrato que encarece los procesos industriales (Johansson et al., 2001). De la misma manera, se valoró la reutilización de la biomasa generada durante la producción de proteína recombinante para rentabilizar el proceso productivo final. El extracto de levaduras autolisadas obtenido resultó ser una fuente de nitrógeno rica en nucleótidos de bajo peso molecular (Figura 6A) que podría ser mejorable mediante la adición de 1 % (p/v) de fosfodiesterasa como es bien documentado (Belem et al., 1997). Así, durante el seguimiento de cultivos inoculados a una OD_{600} de 4 se alcanzó una actividad α -galactosidasa extracelular de 7 U/mL empleando extracto de levadura comercial y 5 U/mL con el uso de biomasa autolisada (Figura 6B). Por todo ello, en los siguientes experimentos se eligió el extracto de levadura como única fuente de nitrógeno.

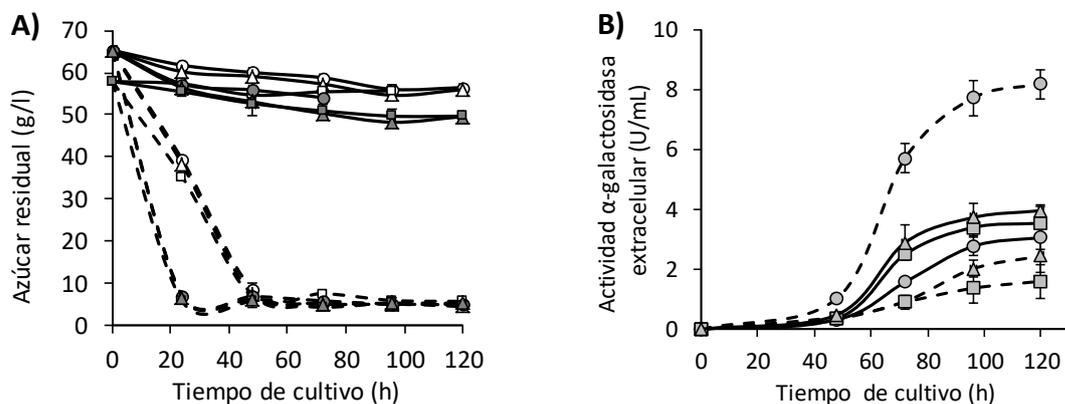


Figura 5. Evaluación de medios de producción de ScAGal basados en melaza de remolacha. Seguimiento en el tiempo del azúcar residual (**A**) y actividad α -galactosidasa extracelular (**B**) por BJ3505 Δ suc2 (línea continua) y BJ3505 (línea discontinua) en los medios de cultivo YPR (círculo), YR (triángulo) y YP (cuadrado). Los símbolos vacíos y llenos corresponden a las cepas transformadas con el plásmido YEpFLAG-1 y YEpMEL1, respectivamente. Los medios (YPR, YR, YP) se prepararon con 6-7 % de melaza suplementados con 1 % de extracto de levadura y/o 2 % de bactopectona y los cultivos fueron inoculados a 2OD₆₀₀ (ver Sección 2.4).

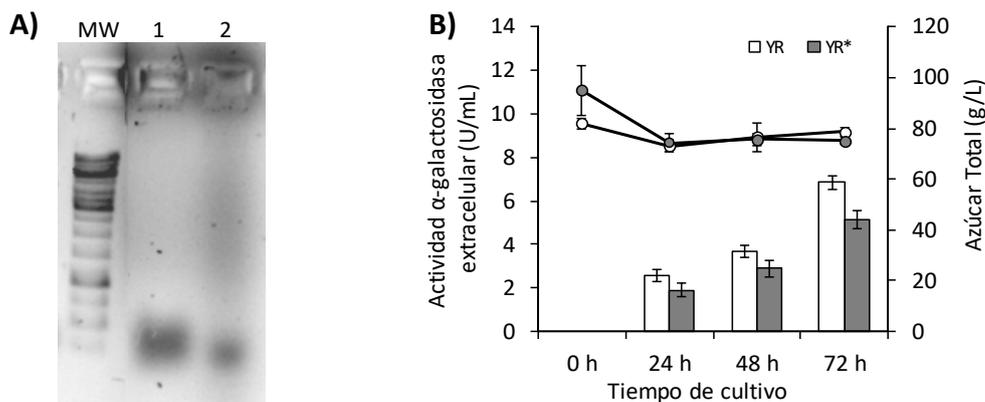


Figura 6. Reutilización de biomasa autolisada por la cepa recombinante BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1. **A)** Análisis comparativo de un extracto de levaduras autolisadas (calle 1) y extracto de levadura comercial al 1 % (calle 2) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. La autólisis fue llevada a cabo en tampón 0.1 M KH₂PO₄ pH 6.5 a razón 1:2 (p/v), a 50 °C, 150 rpm durante 30 h. MW, marcador de peso molecular (*GeneRuler 1Kb DNA Ladder*, Thermo Scientific). **B)** Actividad α -galactosidasa extracelular (gráfico de barras) y contenido en azúcar residual (gráfico de líneas) de cultivos en medios que contienen extracto de levadura comercial (símbolos vacíos) o procedente de biomasa autolisada (símbolos llenos) como única fuente de nitrógeno. Los medios de cultivo fueron inoculados con una OD₆₀₀ inicial de 4 y los resultados de los cultivos corresponden a la media de tres réplicas biológicas, N = 3 \pm DE. YR, 8 % melaza de remolacha y 1 % extracto de levadura comercial; YR*, 8 % melaza de remolacha suplementada con biomasa autolisada según metodología.

Finalmente, en la figura 7 se muestra el transcurso de cultivos utilizando el medio de producción YR con el fin de analizar la cinética de crecimiento y conversión de sustratos a productos. Ambas cepas alcanzaron la fase estacionaria a las 32 h de cultivo con valores de crecimiento celular similares, sin embargo la parental asimiló el 88 % del azúcar del medio, gracias a la invertasa nativa, para producir 13 g/L de etanol, mientras que el poco etanol (1.8 g/L) que produce BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 es rápidamente consumido como fuente de carbono para la expresión de ScAGal que

además permite que la cepa asimile hasta el 12 % del azúcar disponible en el medio (Etapa 1, Figura 7A y 7B). Cuando los medios fueron suplementados con extracto de levadura, la parental comienza a utilizar el etanol como fuente de carbono a las 24 horas de cultivo, inicia la secreción de ScAGal y alarga su fase estacionaria a un periodo de más de 84 h alcanzando una biomasa 4 veces superior que BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1. Aunque ésta última alcanza tan sólo una densidad celular máxima de 15 unidades (OD₆₀₀) continúa produciendo la proteína heteróloga porque es capaz de agotar totalmente el azúcar reductor residual disponible mientras que la parental mantiene alrededor de 3 g/L de azúcar sin consumir (Etapa 2, Figura 7C y 7D). Después, el medio libre de células recuperado de cultivos finales de BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 fue reutilizado por la parental para la producción máxima de 10 g/L de etanol a las 48 h de cultivo consumiendo el 93 % del azúcar del medio (Etapa 3, Figura 7E y 7F). Con estos resultados, podemos concluir que en presencia de un 8 % de melaza de remolacha la cepa parental desplaza su metabolismo hacia la fermentación de azúcar para la obtención de etanol incluso manteniendo condiciones aeróbicas (efecto *Crabtree*) (Marques et al., 2015), mientras que BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 posee un metabolismo preferentemente respiratorio y utiliza de manera más eficiente todo el azúcar disponible. Por otro lado, también se apreciaron diferencias entre ambas cepas en cuanto a su fisiología celular, y los detalles de cambios morfológicos en compartimentos y orgánulos se muestran en las figuras 8 y 9. En la parental, se observa la presencia de partículas alrededor y en el interior de la vacuola la cual se hace más prominente conforme aumenta el tiempo de cultivo, mientras que en BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 no se aprecia la vacuola y aparecen partículas citoplasmáticas a las 48 h (Figura 8A-C). Como se ha mencionado anteriormente, la parental es productora de etanol por lo que es posible que su morfología sea resultado del incremento de la concentración del mismo, mientras que BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 produce proteína heteróloga como resultado de la intensa actividad citoplasmática y vacuolar (Figura 9A-D) y la presencia de partículas coincide con el periodo de inanición que comienza a las 48 h. Sin embargo, cuando la parental consume el etanol como fuente de carbono, la morfología de ambas cepas es prácticamente la misma (Figura 8D). Varios estudios han demostrado que en *S. cerevisiae* se forman acúmulos citoplasmáticos en respuesta a la adaptación a diferentes situaciones de estrés ambiental como el agotamiento de glucosa o la tolerancia al etanol (Grousl et al., 2013). Para ahorrar energía, la célula es capaz de interrumpir la traducción, regular el tránsito de moléculas de ARNm y acumular en el citoplasma componentes de la maquinaria de traducción conocidos como gránulos de estrés y cuerpos P aunque la naturaleza de las interacciones entre ellos es todavía desconocida (Kato et al., 2011). Además, bajo condiciones de estrés, la vacuola es propensa a fluir entre formas no fragmentadas y fragmentadas (Figura 9D) debido en parte, a su asociación con otros orgánulos celulares (retículo endoplásmico, complejo

de Golgi, vesículas secretoras y endocíticas) como componentes de sistemas ramificados interconectados (Gibson et al., 2007).

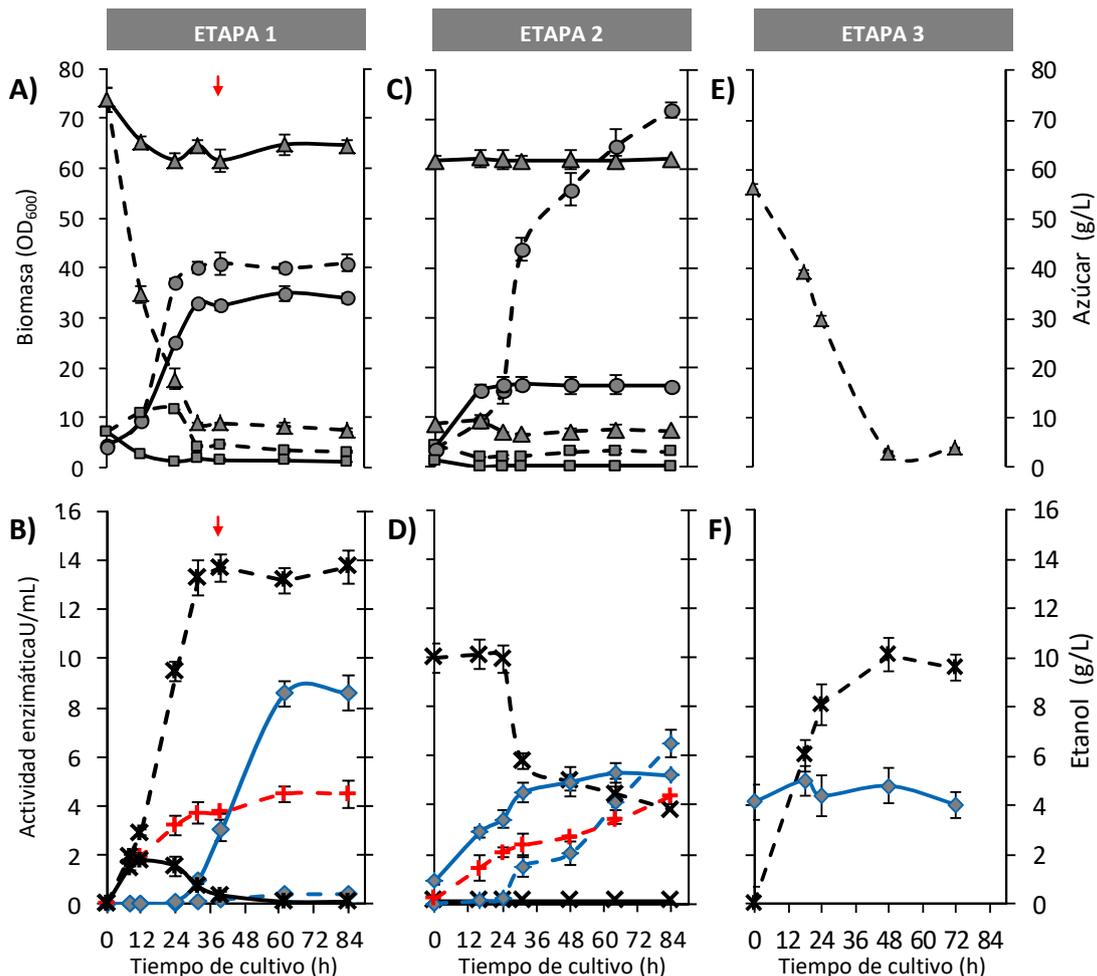


Figura 7. Cinética de crecimiento y conversión de sustratos a productos de BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 y parental. Biomasa (círculos), azúcar total (triángulos), azúcar reductor (cuadrados), etanol (aspas), actividad α -galactosidasa extracelular (rombos) y actividad invertasa extracelular (cruces) de cultivos BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 (línea continua) y BJ3505/YEpMEL1 (línea discontinua). Los cultivos fueron inoculados en el medio de producción YR (8 % melaza de remolacha, 1 % extracto de levadura) (Etapa 1). Tras un periodo de crecimiento de 40 h, parte de cada uno de los cultivos fue separado (\rightarrow) y refresco con 1 % extracto de levadura (Etapa 2) mientras que el resto se mantuvo en las mismas condiciones de la etapa 1. El medio libre de células recuperado de cultivos finales de BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 fue reutilizado como medio de producción empleando la cepa BJ3505/YEpMEL1 (Etapa 3). En cada etapa se mantuvo la misma densidad celular inicial (OD₆₀₀ = 4).

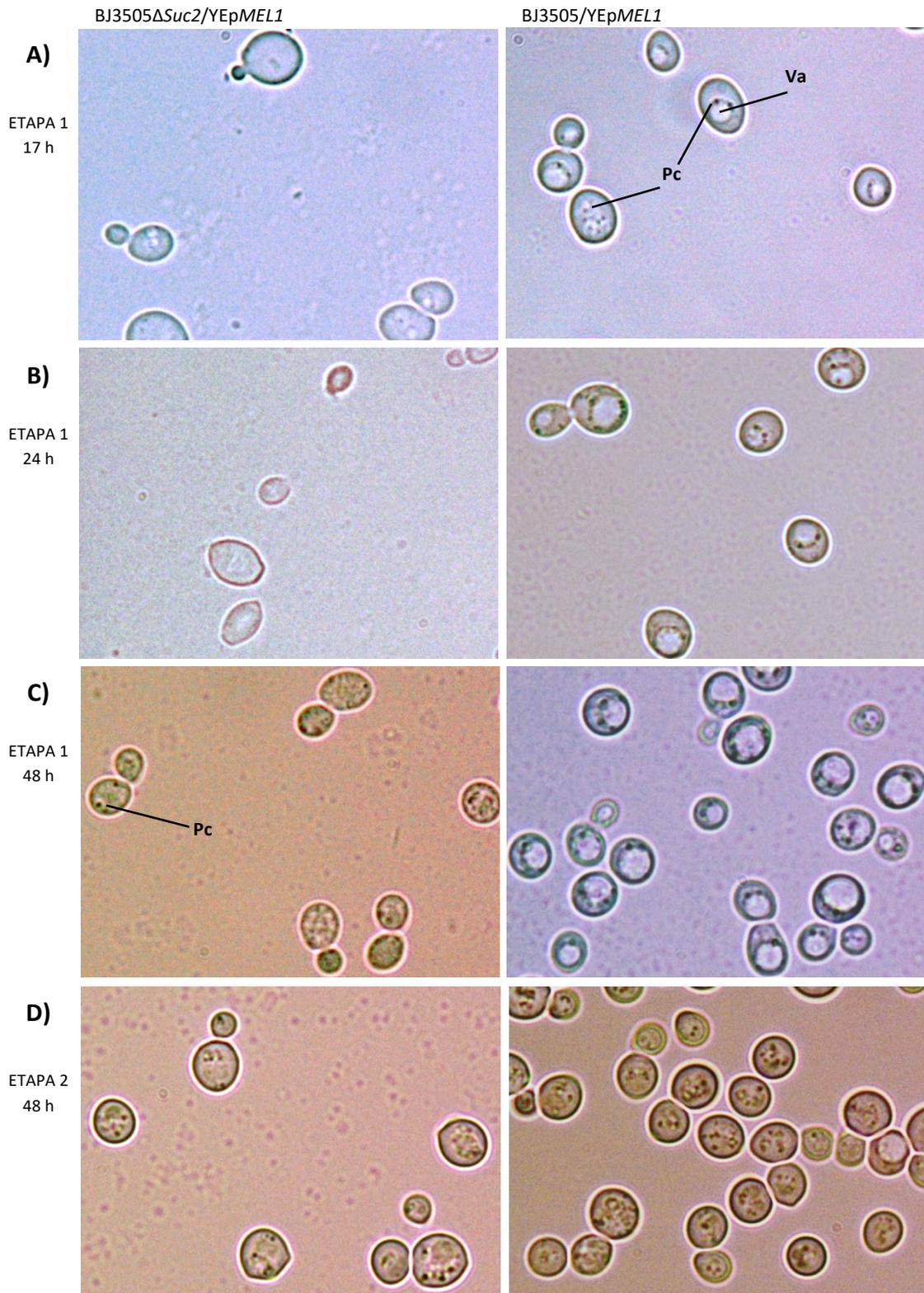


Figura 8. Visualización mediante microscopía óptica de cultivos de BJ3505Δ*suc2*/YEp*MEL1* y parental. Etapa 1, cultivos inoculados en el medio de producción YR (8 % melaza de remolacha, 1 % extracto de levadura). Etapa 2, cultivos refrescados con 1 % extracto de levadura tras un periodo de crecimiento de 40 h. En ambas etapas se mantuvo la misma densidad celular inicial ($OD_{600} = 4$). Va, vacuola; Pc, partículas citoplasmáticas.

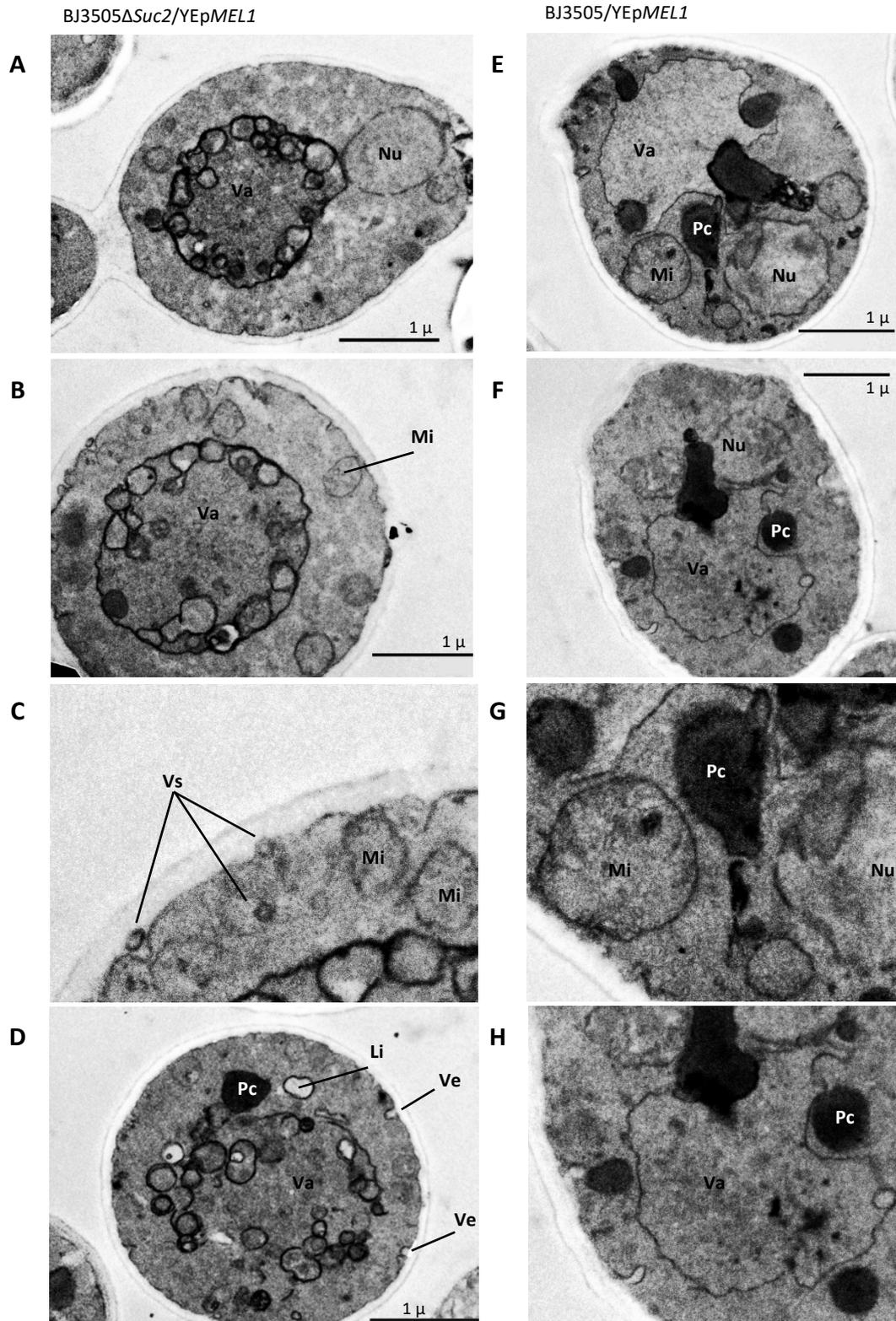


Figura 9. Visualización mediante MET de células BJ3505Δ*Suc2* /YEp*MEL1* y parental. Tras un periodo de 48 h de cultivo en el medio de producción YR, las células fueron fijadas y digeridas en tampón cacodilato sódico 100 mM (pH 7.2) según se describe en Bauer et al., 2001. Nu, núcleo; Va, vacuola; Mi, mitocondria; Li, lisosoma; Vs, vesículas de secreción; Ve, vesículas endocíticas; Pc, partículas citoplasmáticas. Las imágenes C, G y H son ampliaciones de las imágenes B, E y F, respectivamente.

3.2. Optimización de la producción de ScAGal por la cepa deficiente en invertasa a partir de melazas de remolacha

La matriz del diseño experimental de compuesto central (DCC) dio lugar a un conjunto de 30 experimentos con seis repeticiones en los puntos centrales para estimar el error experimental de la técnica de producción, y los resultados correspondientes se muestran en la tabla 5. Se aplicó la metodología de superficie de respuesta (MRS) a los datos experimentales observados para ajustar la función de respuesta (actividad α -galactosidasa extracelular) e investigar la influencia simultánea de las cuatro variables seleccionadas (concentración de melaza, concentración de extracto de levadura, tamaño de inóculo y tiempo de cultivo). La mejor condición para la producción de ScAGal se localizó en el experimento 13 que alcanzó una actividad α -galactosidasa extracelular de 17 U/mL. Para validar la significación y aceptabilidad del modelo se realizó un ANOVA que se presenta en la tabla 6. En el análisis gráfico del modelo se muestra la influencia de la respuesta ante cambios en las variables (Figura 10A) y los efectos que no alcanzaron la línea de significancia estadística con un nivel de confianza del 95 % se eliminaron por representar un aporte insignificante, excepto la concentración de extracto de levadura que fue conservada para mejorar el ajuste del modelo (Figura 10B). El tiempo de cultivo y el tamaño de inóculo fueron los efectos positivos y, la concentración de melaza el efecto negativo que mayor predominio tuvieron sobre la respuesta como se confirma en el gráfico de efectos principales (Figura 11A). Por otro lado, la interacción entre el tamaño de inóculo y el tiempo de cultivo demuestra que una cantidad mayor de inóculo es adecuado para incrementar el rendimiento de la respuesta conforme aumentamos el tiempo de cultivo (Figura 11B). Además, tanto el coeficiente de correlación que explica el 86.80 % de la variación total de la α -galactosidasa extracelular, el valor-P > 0.05 para la prueba de falta de ajuste y el gráfico de datos observados frente a los predichos (Figura 12) indican que el modelo de regresión fue significativo y podría utilizarse adecuadamente para describir la producción de ScAGal bajo las condiciones experimentales. Por lo tanto, la aplicación de la MSR para la estimación de los parámetros óptimos resultó en una relación empírica entre la respuesta y las variables de estudio descrita por la siguiente ecuación polinómica cuadrática: Actividad α -galactosidasa extracelular = $122.116 - 16,478A + 1,155B - 3,465C + 0,009D + 0,548A^2 + 0,212C^2 + 0,035CD$. En los análisis gráficos de superficies de respuesta y diagramas de contorno, se observa que el incremento del tiempo de cultivo posee un efecto positivo importante dentro del diseño experimental conforme aumenta el tamaño del inóculo y disminuye la concentración de melaza (Figuras 13A y 13B). Sin embargo, es realmente la combinación del tamaño máximo del inóculo y la concentración mínima de melaza la que conduce a un aumento en la producción de ScAGal (Figura 13C) mientras que el efecto del extracto de levadura es poco relevante en toda la región del espacio experimental (Figuras 13D-F).

Tabla 5. Matriz experimental para la optimización de ScAGal producida por BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 según el DCC y resultados observados y predichos por la MSR para cada uno de los experimentos.

No. Exp.	Valores codificados				Valores reales				α -Gal (U/ml)	
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_1	X_2	X_3	X_4	Observado	Ajustado
1	-1	-1	-1	-1	12.5	1.5	2.5	60	0.465	1.952
2	1	-1	-1	-1	15.5	1.5	2.5	60	0.316	-1.447
3	-1	1	-1	-1	12.5	2.5	2.5	60	0.706	3.107
4	1	1	-1	-1	15.5	2.5	2.5	60	0.268	-0.292
5	-1	-1	1	-1	12.5	1.5	6.5	60	1.721	4.061
6	1	-1	1	-1	15.5	1.5	6.5	60	1.306	0.662
7	-1	1	1	-1	12.5	2.5	6.5	60	1.935	5.216
8	1	1	1	-1	15.5	2.5	6.5	60	1.451	1.817
9	-1	-1	-1	1	12.5	1.5	2.5	108	6.763	6.580
10	1	-1	-1	1	15.5	1.5	2.5	108	6.038	3.181
11	-1	1	-1	1	12.5	2.5	2.5	108	7.107	7.735
12	1	1	-1	1	15.5	2.5	2.5	108	5.440	4.336
13	-1	-1	1	1	12.5	1.5	6.5	108	17.431	15.360
14	1	-1	1	1	15.5	1.5	6.5	108	11.071	11.961
15	-1	1	1	1	12.5	2.5	6.5	108	15.709	16.515
16	1	1	1	1	15.5	2.5	6.5	108	12.478	13.116
17	-2	0	0	0	11	2	4.5	84	16.005	12.117
18	2	0	0	0	17	2	4.5	84	2.345	5.319
19	0	-2	0	0	14	1	4.5	84	1.081	2.630
20	0	2	0	0	14	3	4.5	84	8.019	4.940
21	0	0	-2	0	14	2	0.5	84	0.299	1.732
22	0	0	2	0	14	2	8.5	84	14.968	12.621
23	0	0	0	-2	14	2	4.5	36	0.001	-4.178
24	0	0	0	2	14	2	4.5	132	10.846	11.749
25	0	0	0	0	14	2	4.5	84	2.479	3.785
26	0	0	0	0	14	2	4.5	84	2.116	3.785
27	0	0	0	0	14	2	4.5	84	2.479	3.785
28	0	0	0	0	14	2	4.5	84	2.766	3.785
29	0	0	0	0	14	2	4.5	84	2.240	3.785
30	0	0	0	0	14	2	4.5	84	2.521	3.785

X_1 , concentración de melaza (%); X_2 , concentración de extracto de levadura (%); X_3 , tamaño de inóculo (OD_{600}); X_4 , tiempo de cultivo (h). Para facilitar la comprensión de los resultados, X_1 , X_2 , X_3 , X_4 fueron nombrados como A, B, C, D, respectivamente. La respuesta, actividad α -galactosidasa extracelular (α -Gal), fue definida como la cantidad de enzima que libera un μ mol de *p*-nitrofenol por minuto en las condiciones de ensayo, pH 4 y 40 °C (ver Sección 2.8).

Tabla 6. Análisis de Varianza para el modelo cuadrático de superficie de respuesta respecto a la producción de ScAGal por *S. cerevisiae* BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1.

Efectos	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
A: Melaza	69.323	1	69.323	1052.18	0.0196
B: Extracto de levadura (%)	8.003	1	8.003	121.47	0.0576
C: Tamaño de inóculo (OD_{600})	177.872	1	177.872	2699.75	0.0123
D: Tiempo de cultivo (h)	380.480	1	380.480	5774.96	0.0084
AA	37.071	1	37.071	562.66	0.0268
CC	17.520	1	17.520	265.92	0.0390
CD	44.499	1	44.499	675.41	0.0245
Falta de	110.244	17	6.485	98.43	0.0780
Error total	0.065	1	0.065		
Total	835.492	25			

$R^2 = 86.80\%$, R^2 (ajustado para Gl) = 81.66 %, Error estándar de la estimación = 0.256, Error medio absoluto = 1.74. Gl, grados de libertad. Efectos cuadráticos de las variables Melaza (AA), Inóculo (CC) y la interacción entre Tamaño de inóculo/Tiempo (CD).

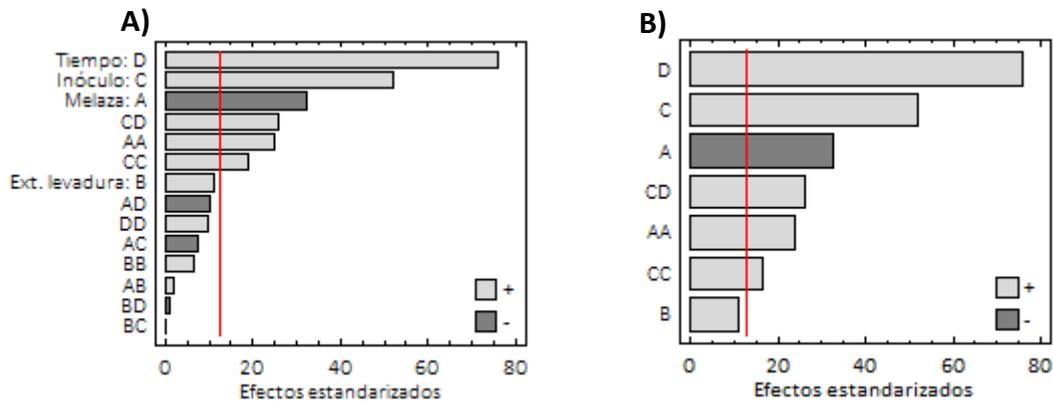


Figura 10. Diagrama de Pareto antes (A) y después (B) de eliminar efectos estadísticamente no significativos. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado que representa el efecto estimado dividido entre el error estándar. La línea vertical indica la significancia con un 95 % de nivel de confianza y +/- establece el efecto positivo y negativo sobre la respuesta (actividad α -galactosidasa extracelular). El gráfico representa las variables lineales (A, B, C y D), sus efectos cuadráticos (AA, BB, CC, DD) e interacciones (AB, AC, AD, BC, BD, CD).

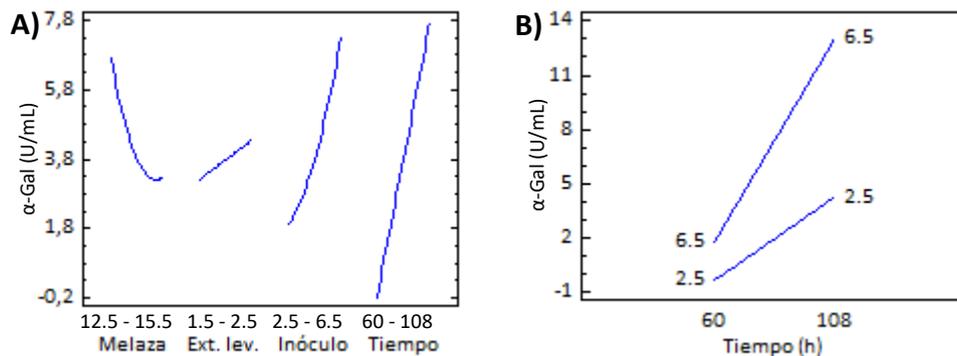


Figura 11. Gráfico de efectos lineales e interacciones principales sobre la producción de ScAGal. **A)** El factor elegido se varía del nivel -1 al +1, mientras que el resto se mantienen constantes en sus valores centrales. Cuanto mayor es la pendiente mayor será el efecto sobre la respuesta, actividad α -galactosidasa extracelular (α -Gal). **B)** El factor tiempo de cultivo se varía de su nivel -1 a su nivel +1 mientras que el tamaño de inóculo se mantiene constante en su nivel +1 (línea superior) o en su nivel -1 (línea inferior) y los demás factores en sus valores centrales.

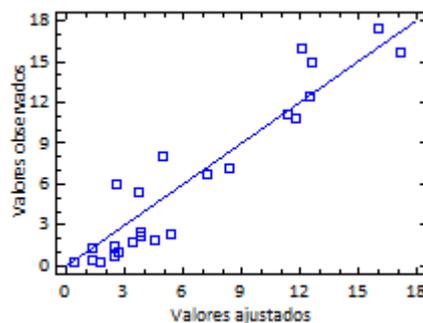


Figura 12. Valores observados versus valores ajustados por el modelo de regresión.

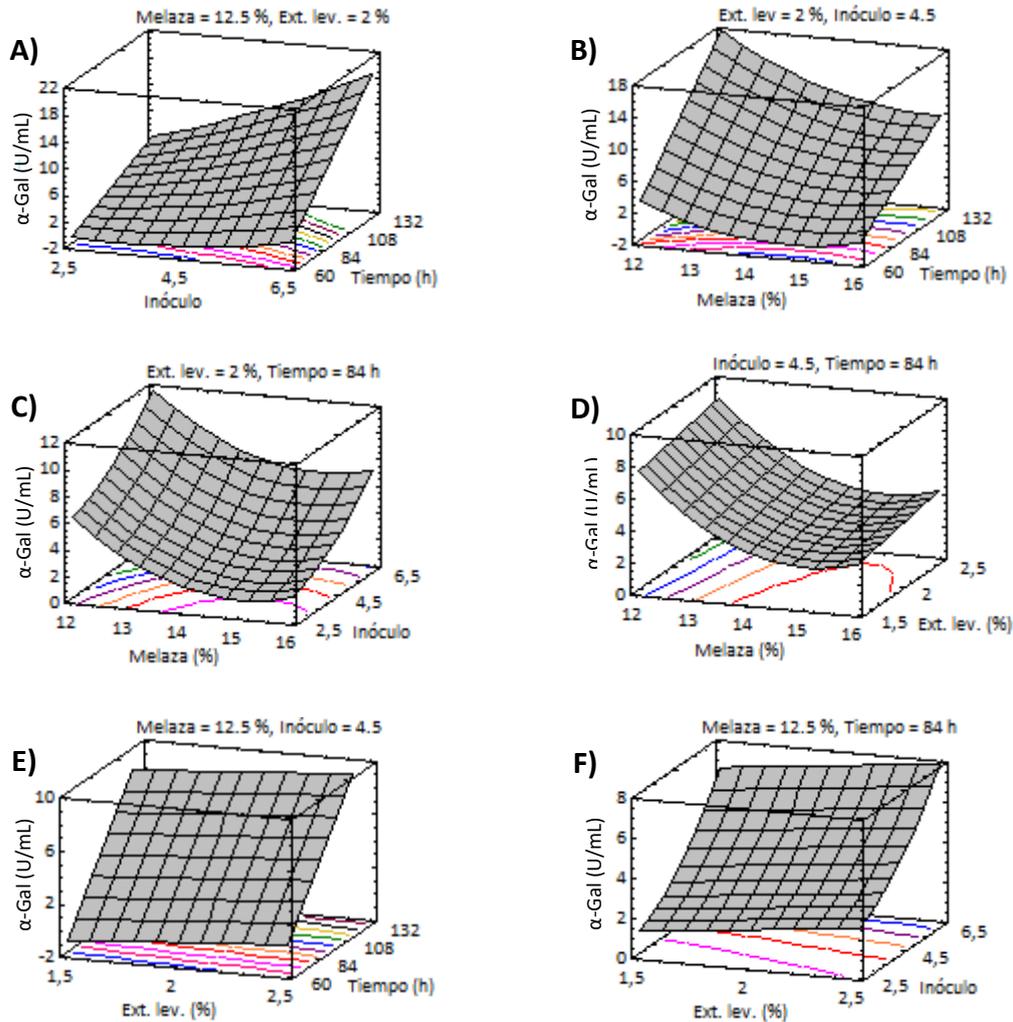


Figura 13. Gráfico de superficie y diagramas de contorno para la producción de ScAGal. Actividad α -galactosidasa extracelular máxima (α -Gal) estimada por la MSR en función de las interacciones de cualquier pareja de variables independientes, manteniendo el valor de la tercera y cuarta variable constante en el nivel 0.

El modelo alcanzó una respuesta óptima para maximizar la producción de ScAGal con las condiciones experimentales $A = -2$, $B = 0$, $C = +2$, $D = +2$ cuyos valores reales son 11 % de melaza, 2 % de extracto de levadura, tamaño de inóculo de 8.5 OD_{600} y 132 h de tiempo de cultivo, respectivamente. Aunque un aumento de la concentración de extracto de levadura comercial parece mejorar ligeramente el rendimiento de producción, se decidió mantener el 1 % dado que es un sustrato que encarece los procesos industriales (Johansson et al., 2001). Basándose en estos resultados, durante el transcurso de nuevos cultivos incluyendo 11 % melaza, 1 % extracto de levadura y tamaño de inóculo de 8.5 OD_{600} (Figura 14), la cepa recombinante BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 alcanzó una actividad α -galactosidasa extracelular máxima de 24 U/mL con una mejora del 72 % en la producción de ScAGal respecto a lo observado en los estudios preliminares (Figura 5B; Sección 3.1.). Por lo tanto, el uso de melaza de remolacha resultó ser un camino prometedor para la obtención de ScAGal mediante

un proceso productivo que permite además reducir los costos de producción a través de la reutilización de este subproducto de la industria azucarera. En la biotecnología actual está aumentando la aplicación de modelos estadísticos para mejorar el proceso productivo utilizando residuos agro-industriales (Almeida et al., 2017; Darvishi et al., 2016), en este trabajo se describe por primera vez la producción de proteína heteróloga con una cepa de *S. cerevisiae* deficiente en invertasa a partir de melazas de remolacha.

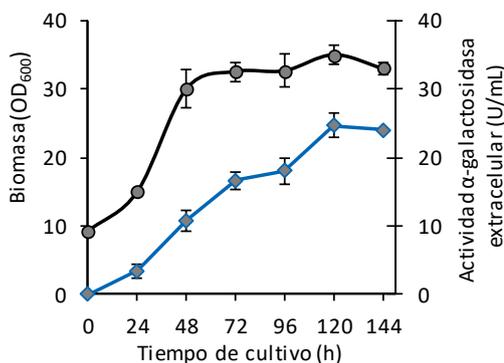


Figura 14. Optimización de la producción de ScAGal por la cepa BJ3505Δ*suc2*/YE*pMEL1* a partir de melazas de remolacha. Seguimiento en el tiempo de la biomasa celular (círculos) y actividad α-galactosidasa extracelular (rombos) empleando un medio de producción basado en 11 % de melaza y 1 % de extracto de levadura, un tamaño de inóculo de 8.5 OD₆₀₀ y manteniendo el resto de condiciones descritas (Sección 2.3.).

3.3. Biorreactores: aproximación al escalado del proceso productivo de ScAGal

En un intento por acercarse a la producción escalonada de ScAGal, la cepa BJ3505Δ*Suc2*/YE*pMEL1* se cultivó en biorreactores de 2-L con un volumen de trabajo de 1L empleando el medio optimizado YR bajo condiciones no ajustadas y ajustadas de pH 6 durante el crecimiento de los cultivos. En estas condiciones, el crecimiento celular se detiene prácticamente a las 72 h, sin embargo, cuando se mantiene el cultivo a pH 6 la cepa recombinante duplica su biomasa hasta alcanzar alrededor de 20 g/L al final del cultivo (Figura 15A y 15B). Por otro lado, en ambos biorreactores se produce no sólo la proteína recombinante ScAGal sino también otros metabolitos dependiendo de la fase de cultivo (Tabla 7). Durante las primeras 24 h de cultivo, la cepa consume toda la glucosa y asimila entre un 82 % y un 73 % de la fructosa disponible en el medio que dirige a la producción simultánea de ScAGal y los metabolitos secundarios etanol y glicerol. Al mismo tiempo, en el medio extracelular aparece galactosa liberada por la acción de la ScAGal que hidroliza un 5 % de rafinosa y hasta un 25 % sin o con control de pH, respectivamente. Además, en ambos casos la concentración de galactosa se mantiene constante durante el resto del tiempo de cultivo, lo que significa que la cepa tiene preferencia por la asimilación de otros azúcares simples (Marques et al., 2015). En el biorreactor sin ajuste de pH, durante el periodo que va de las 24 a 48 h, el metabolismo de la cepa es prácticamente fermentativo obteniendo alrededor de 8 g/L de etanol y liberando al medio 1.6 g/L de glicerol mientras que los valores de actividad enzimática se mantienen constantes.

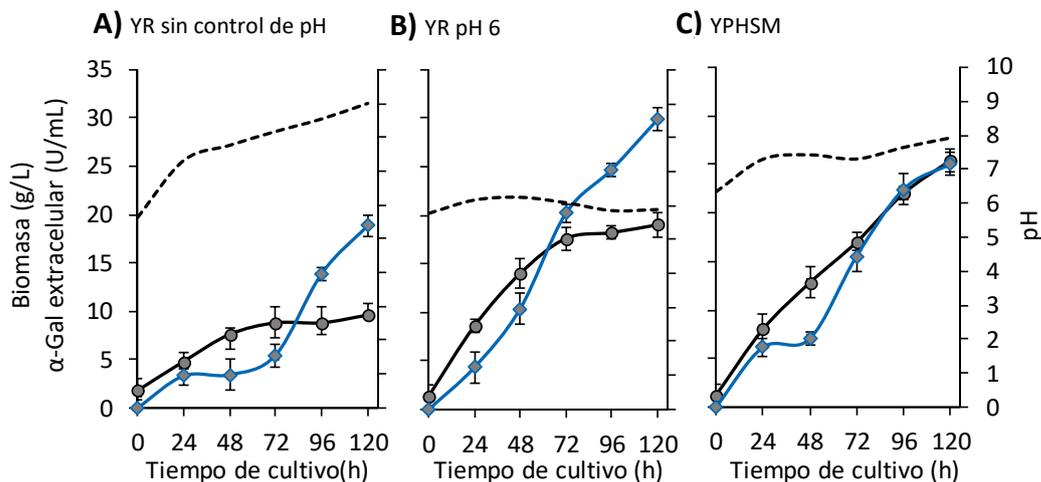


Figura 15. Producción de ScAGaL por la cepa BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 a partir de biorreactores de 1 L de volumen de medio de cultivo. Seguimiento en el tiempo de biomasa celular (círculos), actividad α -galactosidasa extracelular (α -Gal, rombos) y pH (línea discontinua) empleando el medio basado en melaza de remolacha optimizado, YR sin ajustar el pH (A), YR ajustado a pH 6 (B) y el medio convencional YPHSM con un 5 g/L de glucosa. YPHSM fue modificado con un 5 g/L de glucosa para comparar con el medio basado en melaza de remolacha (YR). N = 3 \pm DE.

Tabla 7. Análisis de HPLC de la composición del medio de producción YR y la concentración de sustratos y obtención de productos durante el cultivo de biorreactores con la cepa *S. cerevisiae* BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1.

Análitos (g/L)	Medio YP	Biorreactor sin control de pH					Biorreactor con control de pH				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Rafinosa	4.55	4.35	4.29	4.35	4.42	4.29	3.40	3.35	3.40	3.45	3.35
Sacarosa	92.65	91.12	106.28	106.56	113.69	100.55	93.75	87.90	87.30	84.90	61.30
Glucosa	1.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
Galactosa	0.50	0.82	0.91	0.86	0.89	0.82	1.30	1.30	1.35	1.30	1.25
Fructosa	3.55	0.64	0.82	0.56	0.65	2.06	0.95	0.55	0.40	0.60	0.85
Glicerol	0.45	0.98	1.62	0.80	0.27	1.00	1.30	1.05	0.40	0.70	2.65
Etanol	0.00	5.34	7.98	0.00	0.00	5.19	6.60	13.20	0.00	4.30	10.50
Sorbitol	–	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Se utilizó como patrón externo concentraciones comprendidas entre 4 – 0.06 mg/mL de una mezcla de rafinosa, sacarosa, galactosa, glucosa, fructosa, glicerol y etanol. Tanto a las muestras como al patrón externo se le añadió 1 mg/mL sorbitol empleado como patrón interno, (Xu et al., 2014). N = 3 \pm DE.

Por el contrario, durante el periodo de 48 a 96 h la cepa respira observándose un incremento abrupto en la expresión de ScAGaL gracias a la utilización eficiente de etanol seguido de glicerol como fuentes de carbono, para en las siguientes 24 h iniciar nuevamente la producción de etanol y glicerol y producir alrededor de 20 U/mL de ScAGaL al final de la fase de cultivo. Cuando el cultivo se mantiene a pH 6, ambos metabolismos coexisten hasta las 48 h, la cepa consume el etanol generado para producir 20 U/mL a las 72 h para finalmente recuperar los dos metabolismos y alcanzar una producción máxima de ScAGaL de 30 U/mL y 10.5 g/L de etanol al final del cultivo. Cabe resaltar que en ambos biorreactores la producción de ScAGaL podría incrementarse a expensas del consumo de etanol si se alargase la fase de cultivo. Estos resultados son superiores a los obtenidos en un biorreactor empleando el medio rico YPHSM conteniendo un 5 g/L de glucosa, valor comparable a la fuente de carbono

asimilable en el medio YR, donde la cepa alcanza 25 U/mL (Figura 14C) y no produce etanol (datos no mostrados). Por lo tanto, el uso de biorreactores permitió el control preciso de parámetros y el desarrollo del cultivo a pH 6 que incrementó en un 21 % el rendimiento de la producción de ScAGal en comparación con los mejores resultados alcanzados en matraz agitado (Figura 14, Sección 3.2). No obstante, hay que considerar que se desconoce a qué se debe el aumento del analito identificado como sacarosa cuando no sometemos el biorreactor a control de pH, y por el contrario el descenso de éste cuando lo mantenemos constante a pH 6. Es posible que el pH afecte a la síntesis e hidrólisis, respectivamente, de otro metabolito que coincida con el mismo tiempo de retención de la sacarosa. Además, los cromatogramas del biorreactor sin establecer un control de pH muestran la presencia de otros analitos, los cuales no ha sido posible su identificación (Figura 16). Se sabe que altas concentraciones de sacarosa ejercen estrés hiperosmótico sobre *S. cerevisiae* la cual para evitar lesiones letales necesita adquirir osmotolerancia y osmoadaptación mediante la síntesis de macromoléculas osmoprotectoras. Entre ellas se encuentran la trehalosa que confiere estabilidad a la membrana plasmática y asegura el plegamiento adecuado de proteínas, y el glicerol que permite equilibrar las osmolaridades externa e interna para evitar la pérdida de agua celular; además ambos pueden ser asimilados como fuente de carbono durante la inanición (Gibson et al., 2007). La trehalosa es un disacárido, por lo que en el análisis de HPLC tendría el mismo tiempo de retención que la sacarosa y podría ser la molécula que se estuviera acumulando en el biorreactor sin control de pH, mientras que el valor tan alto de pH alcanzado podría estar afectando a su asimilación. Esto explicaría en parte el descenso del pico en el tiempo de retención de la sacarosa observado en el análisis del biorreactor a pH 6 pero no el consumo de hasta un 34 % de dicho analito. Posiblemente se induzca la expresión de otros genes que codifiquen para otras hidrolasas (maltasas e isomaltasas) que participen en el metabolismo de la sacarosa (Marques et al., 2015), sin embargo serían necesarios análisis de expresión transcripcional que confirmasen estos resultados. Por otro lado, a pesar de que en el cultivo final del biorreactor sin control de pH se alcanza un valor de pH de hasta 9, el estudio de la estabilidad plasmídica resultó ser de alrededor del 98 % en ambos biorreactores independientemente del valor de pH y después de un periodo de más de 120 h de cultivo. Además, sorprendentemente, cuando las células procedentes de cultivos finales de ambos biorreactores a pH 9 y a pH 6 se sembraron en el medio mínimo CM-Trp, se visualizaron diferencias macroscópicas en la morfología de las colonias; las primeras adquirieron un color rosa mientras que las segundas mantuvieron el fenotipo normal (Figura 17A y 17B). Asimismo, esta morfología fue conservada durante siembras sucesivas a lo largo del tiempo observándose que las colonias rosas crecían de forma peculiar y, considerablemente, más rápido respecto a las de fenotipo normal (Figuras 17C-F). Así, la resiembra en CM-Trp de las cepas

confirmó el aumento del crecimiento en el siguiente orden: BJ3505 Δ Suc2/YEpMEL1 en YR pH 9 > BJ3505 Δ Suc2/YEpMEL1 en YR pH 6 > BJ3505 Δ Suc2/YEpMEL1 en YPHSM = BJ3505/YEpMEL1 en YPHSM (Figura 18E y 18F). Por lo tanto, es evidente que el pH influye en el color de la cepa y se ha reportado que la síntesis de carotenoides por la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* parece estar regulada por el pH y la producción de pigmentos por cianobacterias alcanza valores de pH de 9 y 10 (Querijero-Palacpac et al., 1990; Schmidt et al., 2011). Además, dado que *S. cerevisiae* puede producir precursores de la biosíntesis de carotenoides, se han obtenido cepas productoras de carotenoides mediante ingeniería metabólica introduciendo genes carotenogénicos de *X. dendrorhous* (Verwaal et al., 2007). También se sabe que, muchos carotenoides como la astaxantina y sus intermedios confieren tolerancia al estrés oxidativo en levaduras que están expuestas a condiciones adversas durante los procesos de fermentación (Ukibe et al., 2009). Por todo ello, es de interés llevar a cabo análisis de identificación y cuantificación de pigmentos mediante HPLC de fase reversa y análisis de tolerancia al estrés oxidativo para aclarar estos resultados que no han sido posible abarcar durante este trabajo.

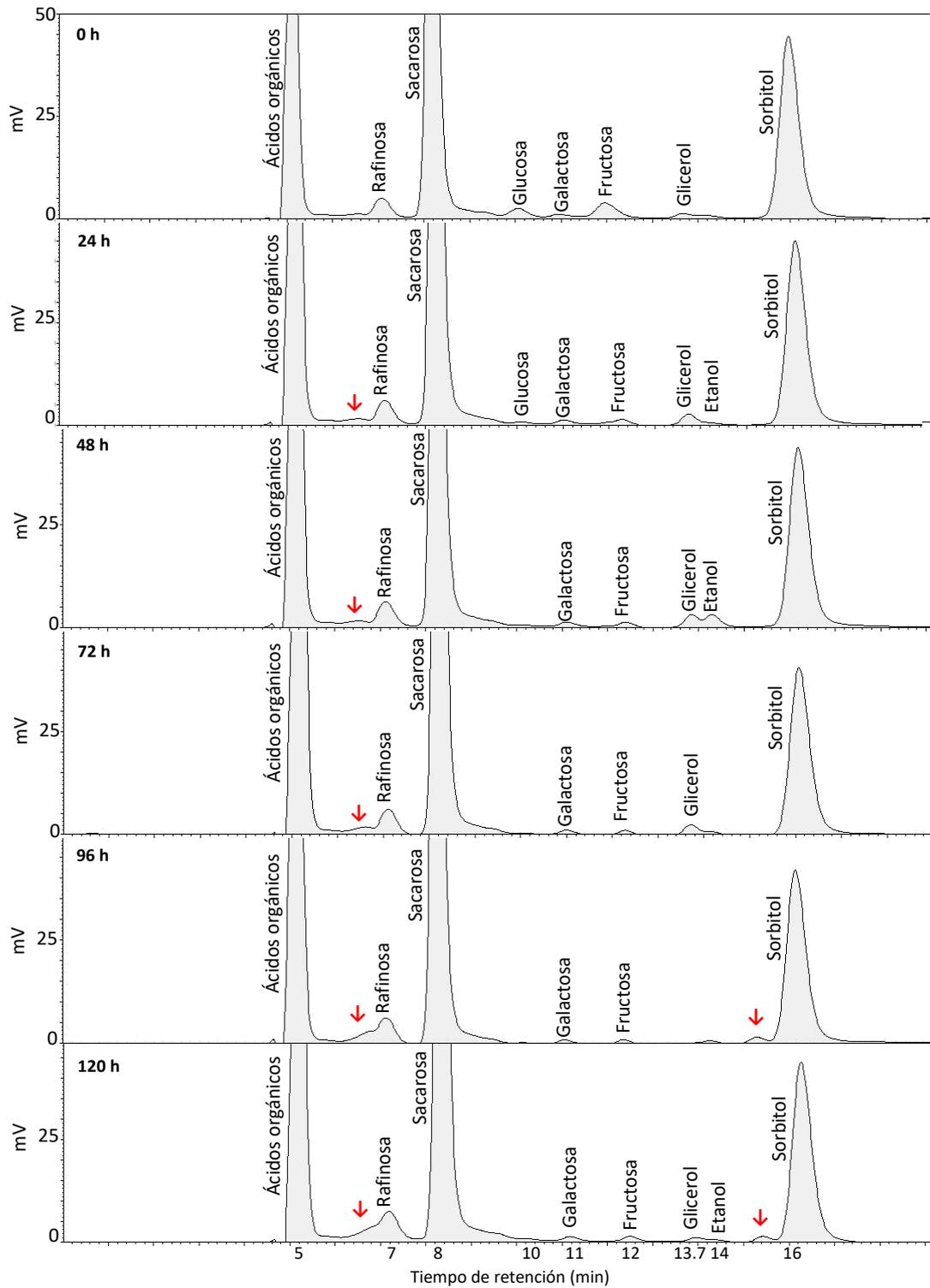


Figura 16. Caracterización mediante HPLC de la conversión de sustratos a productos durante el cultivo de la cepa BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 en un biorreactor con el medio YR optimizado sin establecer un control de pH. Cada muestra fue diluída 50 veces antes de añadir 1 mg/mL sorbitol (patrón interno). \rightarrow Metabolitos desconocidos.

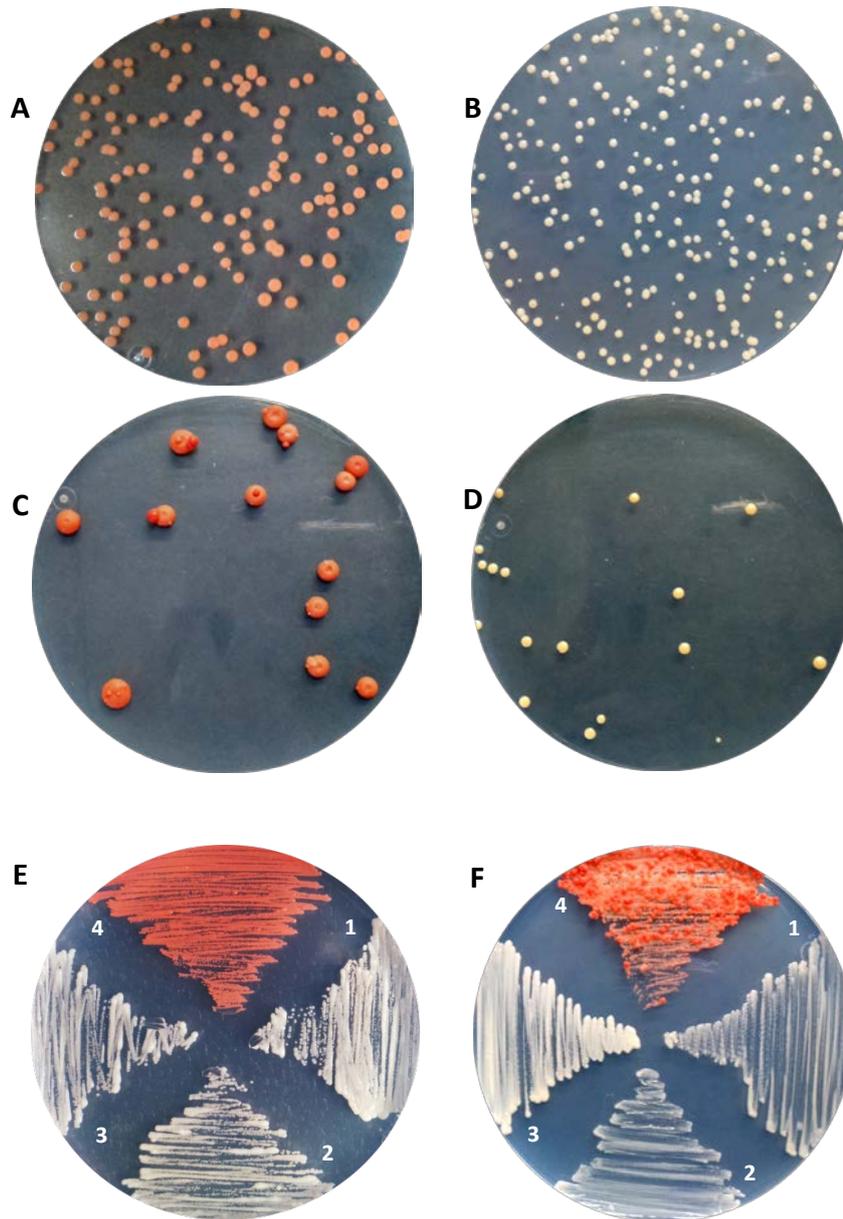


Figura 17. Crecimiento en placa sobre medio selectivo CM-Trp de BJ3505 Δ Suc2/YEpMEL1 procedente de los cultivos en biorreactor. Visualización macroscópica de colonias procedentes del biorreactor a pH 9 (A y C) y a pH 6 (B y D), y resiembra en estría mensual durante 10 meses (E). Las imágenes C, D y F corresponden a placas conservadas a 4 °C durante 5 meses. BJ3505/YEpMEL1 en YPHSM (1); BJ3505 Δ Suc2/YEpMEL1 en YPHSM (2); BJ3505 Δ Suc2/YEpMEL1 en YR pH 6 (3); BJ3505 Δ Suc2/YEpMEL1 en YR pH 9 (4).

3.3. Diseño de un bioproceso para la producción acoplada de ScAGal y etanol a partir de melazas de remolacha.

En la figura 18 se propone un posible proceso productivo industrial de la proteína recombinante ScAGal acoplada a la obtención de etanol mediante la reutilización de melazas de remolacha según las condiciones optimizadas durante este trabajo. El bioproceso se desarrollaría en dos etapas consecutivas mediante el cual obtenemos ScAGal a partir del cultivo en melazas de la cepa BJ3505 Δ Suc2/YEpMEL1 (Etapa 1), seguido de la obtención de etanol a través de la fermentación de la sacarosa recuperada del medio extracelular empleando una cepa de *S. cerevisiae* silvestre (Etapa 2). Hay que considerar que la producción de etanol es susceptible de ser mejorada ya que la estimación fue obtenida de las condiciones descritas en la sección 2.4., no siendo las más adecuadas para favorecer un metabolismo fermentativo. Aun así, el etanol generado en el medio extracelular durante la etapa 2 podría ser una buena fuente de carbono para la etapa 1 de un nuevo bioproceso. Además, el proceso podría realizarse en modo continuo utilizando reciclado de la biomasa generada. En ambas etapas, después del final de la fermentación, las células de levadura son recogidas por centrifugación y una parte sería reutilizada en un siguiente ciclo mientras que el resto de biomasa alimentaría cada reactor como suplemento de extracto de levadura tras el tratamiento de autólisis.

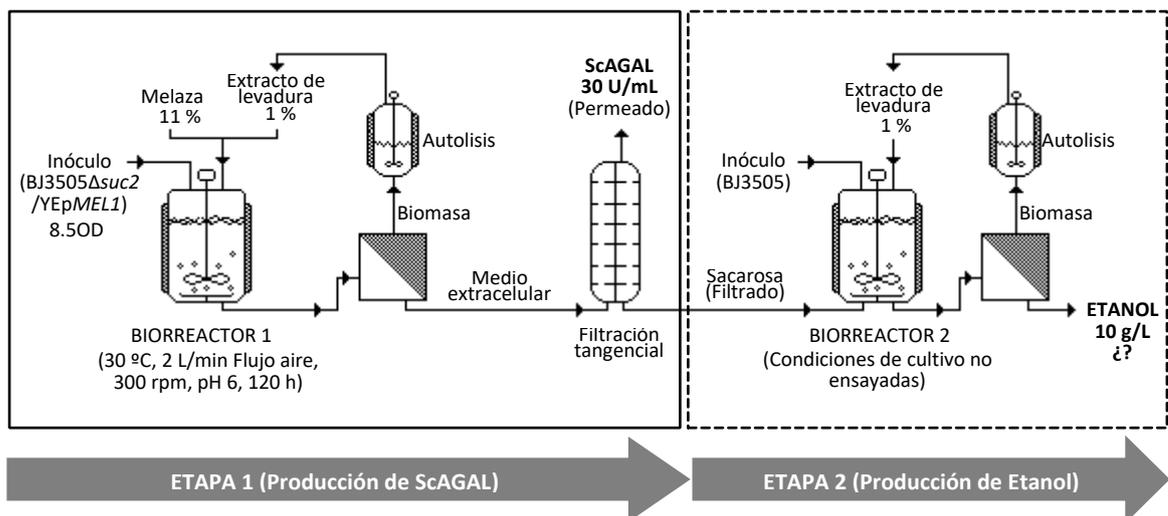


Figura 18. Simulación de un bioproceso en dos etapas para la obtención de ScAGal y etanol a partir de un medio de producción basado en melazas de remolacha. El cultivo final del biorreactor 1 llevado a cabo por la cepa deficiente en invertasa BJ3505 Δ Suc2/YEpMEL1 es centrifugado, y el medio extracelular filtrado tangencialmente para obtener un permeado con la proteína recombinante, ScAGAL (Etapa 1). La sacarosa recuperada en el filtrado es aprovechada en el biorreactor 2 para producir etanol mediante una cepa de *S. cerevisiae* con actividad invertasa (Etapa 2). La biomasa recuperada de ambos biorreactores puede ser utilizada como suplemento de extracto de levadura tras ser sometida a un tratamiento de autólisis (ver Sección 2.4.).

CAPÍTULO 3

Valorización del lactosuero y la melaza de remolacha mediante la producción de α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* por *Kluyveromyces lactis*

Resumen

El gen *MEL1* que codifica para la enzima α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ScAGal) fusionado a una secuencia Poli-His en su extremo carboxilo terminal (*MEL1His*) se integró con éxito dentro del locus *LAC4* de la cepa industrial de *Kluyveromyces lactis* GG799. La cepa así construida, KGM21, fue capaz de expresar bajo el control del promotor *LAC4* tanto la proteína recombinante como la proteína nativa β -galactosidasa. El análisis de la expresión relativa del gen mediante PCR cuantitativa y el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ indicó que el número de copias del gen integrado era 4, correlacionándose positivamente con los ensayos de actividad α -galactosidasa y *Southern blot*. La metodología de superficie de respuesta permitió la optimización estadística de un medio de producción de ScAGal basado en los subproductos industriales, suero de leche y melaza de remolacha azucarera, que alcanzó seis veces más actividad que con un medio primario con lactosa después de 120 h de cultivo. Un biorreactor con el medio optimizado permitió obtener hasta 19 U/mL y la productividad (0.158 U/h) fue mayor que en cultivos en matraz agitado (0.051 U/mL). El presente estudio proporciona información sobre la producción de ScAGal por *K. lactis* a partir de residuos agroindustriales, permitiendo la valorización y disminución del poder contaminante de los mismos.

1. Introducción

El lactosuero o suero de leche, el efluente en la fabricación de queso, representa el 85-90 % en volumen de leche y retiene más del 55% de sus nutrientes, principalmente lactosa seguido de proteínas. La proteína es recuperada durante la fabricación de concentrados de suero de leche (WPC), donde se forma un permeado con un 4-5% de lactosa como subproducto con diferentes usos alimentarios (Gonzalez Siso, 1996). Sin embargo, a pesar de las numerosas aplicaciones tecnológicas, esto no resuelve el problema medioambiental de la elevada carga orgánica generada por la presencia de lactosa y su tratamiento biológico es un paso exigente para la industria láctea. Una alternativa es la utilización de levaduras del género *Kluyveromyces sp.* que pueden convertir la lactosa en metabolitos secundarios para la obtención de productos con valor industrial añadido. En los últimos años, se han descrito Investigaciones dirigidas a la obtención de etanol, donde el suero de leche es suplementado con otros subproductos, tales como bagazo de caña y melazas, alcanzando una producción rentable desde el punto de vista económico (Akbas et al., 2014; Ferreira et al., 2015). Como se ha comentado en el capítulo anterior, la melaza es un subproducto de la industria azucarera que, constituido principalmente por sacarosa, supone también un residuo importante de difícil reciclaje y su aprovechamiento ha sido aplicado en la presente Tesis Doctoral para la producción heteróloga de la α -galactosidasa de

Saccharomyces cerevisiae (ScAGal). Es por ello que, el uso una mezcla de permeado de suero de leche y melaza de remolacha azucarera como medio de producción de proteínas recombinantes puede resultar una elección atractiva como sustratos sostenibles alternativos que se propone en este trabajo.

Kluyveromyces lactis ha sido utilizada en la producción de proteínas heterólogas tanto a escala laboratorio como industrial durante décadas (Van Ooyen et al., 2006). Su éxito en biotecnología se debe a la fácil manipulación genética, integración genómica estable, maquinaria de glicosilación para el plegamiento correcto y secreción de proteínas eucariotas y alta densidad celular con altos rendimientos de producto (Spohner et al., 2016). Además, *K. lactis* es catalogada por la US FDA como organismo GRAS, que la define como hospedador ideal para utilizar como sistema de expresión de proteínas dirigidas a aplicaciones alimentarias, como es el caso de la enzima funcional ScAGal, objeto de este estudio. Por otro lado, *K. lactis* expresa las proteínas nativas β -galactosidasa e invertasa, que permiten la hidrólisis de la lactosa y sacarosa, respectivamente. Sin embargo, se ha descrito que las células de levadura pueden exhibir cierta represión catabólica en la mezcla de lactosa y sacarosa, tras la hidrólisis de ésta última en glucosa y fructosa (Verstrepen et al., 2004). También, ha sido reportado que, en condiciones totalmente aeróbicas, *K. lactis* presenta un metabolismo preferentemente respiratorio (*Crabtree* negativo) y apenas muestra represión catabólica por glucosa, generando un mayor rendimiento en biomasa y proteína, a diferencia de *S. cerevisiae* que es fermentativo (*Crabtree* positivo) con importante represión catabólica de la respiración (González-Siso et al., 1996). El tipo de metabolismo energético está determinado por el destino del piruvato, un intermediario glicolítico, el cual puede ser oxidado por la vía de los ácidos tricarbónicos (respiración) o reducido a etanol (fermentación). Ambos destinos pueden coexistir simultáneamente dando lugar a un metabolismo respiro-fermentativo que estará presente en ambas levaduras dependiendo de las condiciones de cultivo (González-Siso et al., 2000). La cepa de *K. lactis* GG799 desarrollada por *New England Biolabs* en colaboración con *DSM Food Specialties* (Delft, Países Bajos) logró la síntesis y secreción eficiente de proteínas bajo el promotor *LAC4* inducible por la presencia de galactosa/lactosa en el medio de cultivo (Colussi and Taron, 2005). Además, el promotor no es totalmente reprimido en ausencia del inductor y presenta poca represión en medios de crecimiento estándar con glucosa como fuente de carbono (Van Ooyen et al., 2006). Por lo tanto, uno de los objetivos de este trabajo es evaluar si, finalmente, la cepa de *K. lactis* es capaz de convertir tanto la lactosa como la sacarosa en proteína recombinante durante el aprovechamiento del lactosuero y melazas como sustratos del medio de producción.

En la producción de enzimas a partir de residuos agroindustriales, la optimización y el escalado es fundamental para reducir costos y obtener un producto final rentable,

como hemos visto en el capítulo anterior. De nuevo el estudio estadístico mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) permite la elección de la condición más favorable del proceso productivo para después aplicar a un biorreactor de escala laboratorio. En el presente trabajo se propone la construcción de una cepa de *K. lactis* recombinante productora de la proteína heteróloga ScAGal, con el fin de valorar el potencial de producción de esta proteína a partir de subproductos del procesamiento de alimentos, en este caso, suero de leche y melaza de remolacha azucarera.

2. Metodología

2.1. Cepas, materiales y condiciones de mantenimiento

GG799 {Mata [pGKl1+]} (*New England, Biolabs*) y NRRL-Y1140 {Mata} (Jong y Edwards, 1990) fueron las cepas silvestres de *K. lactis* elegidas para llevar a cabo la integración y expresión del gen que codifica para la proteína de fusión de interés. *Escherichia coli* XL1-Blue [*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]*] (*Stratagene Cloning Systems*) fue el hospedador utilizado en las manipulaciones de ADN estándar mediante técnicas habituales de biología molecular (Sambrook and Russell, 2001). El plásmido YEpmEL1His [*amp^r ori 2μ MEL1His TRP1*] descrito previamente (Fernández-Leiro, 2011) fue el molde empleado en la amplificación de los genes de interés. Se utilizaron la *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (en la amplificación de genes), *DreamTaq polimerase* (en el análisis de PCR de colonias recombinantes) y los kits de purificación, *GenJET Gel Extraction Kit* y *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*, siguiendo los protocolos especificados por el fabricante (*Fisher Scientific*). Los subproductos industriales, suero de leche permeado y concentrado, y melaza de remolacha azucarera fueron suministrados por QUEIZUAR, SL (Bama, A Coruña) y AB Azucarera Iberia (antigua Azucarera Ebro), respectivamente. LB (1% bactotripton, 0.5 % extracto levadura, 0.5 % NaCl) y YPD (1% extracto levadura, 2 % bactopectona, 2 % glucosa), fueron los medios de cultivo para el crecimiento y mantenimiento de bacterias y levaduras, respectivamente. El medio LB fue suplementado con 100 mg/L ampicilina (*Sigma Aldrich*) para la propagación de plásmidos en bacterias. Cuando fue necesario el cultivo sólido en placa, los medios se suplementaron con un 2 % de agar. Todos los componentes de los medios descritos en este trabajo fueron esterilizados por autoclavado a 121 °C durante 20 min, excepto la ampicilina que fue filtrada con filtros de 0.22 micras de tamaño de poro (*Sartorius AG*).

2.2. Construcción de cepas de *K. lactis* recombinantes

Dos variantes del gen *MEL1His* (*MEL1, GeneBank X03102*) que codifica para la ScAGal (*Uniprot P04824*), fusionada a una secuencia Poli-His en su extremo carboxilo

terminal, se clonaron en el vector de expresión integrativa de *K. lactis*, pKLAC-1 (*New England Biolabs*). La ORF completa del gen y el gen sin la región que codifica para la secuencia señal N-terminal nativa (18 aminoácidos de longitud) se amplificaron con los pares de cebadores MAC1-MAC2 y MAC20-MAC2, respectivamente. MAC1 se diseñó para codificar el sitio de escisión de la endoproteasa Kex y asegurar el procesamiento correcto de la proteína de fusión unida al péptido señal codificado por la secuencia α -MF de *K. lactis*. MAC20 contiene el sitio *HindIII* directamente en pauta con el marco de lectura abierto para expresar la proteína de fusión completa (excluyendo el dominio α -MF). Los productos de PCR fueron purificados y clonados entre los sitios *XhoI*-*BglII* y *HindIII*-*BglII* de pKLAC-1, para generar pKLACMEL1His-1 y pKLACMEL1His-2, respectivamente. Las construcciones plasmídicas fueron purificadas de cultivos de *E. coli* y los insertos verificados por secuenciación (Servicios de Apoyo a Investigación, Universidade da Coruña). Ambos plásmidos se linealizaron con *SacII*, para liberar el casete de expresión que, tras ser purificado, fue integrado por recombinación homóloga en células de *K. lactis* GG799 e Y1140 competentes transformadas mediante el método de acetato de litio (Ito et al., 1983). Los transformantes fueron seleccionados en el medio YCB (Tampón fosfato 30 mM, pH 7, 1.17 % de base de carbono de levadura) suplementado con 5 mM de acetamida (*Sigma Aldrich*) incubado a 30 °C durante 4 días. Después del replaqueo en las mismas condiciones, se realizó el análisis de PCR de colonias recombinantes (Löoke et al., 2011) con cebadores que anillan dentro y fuera del casete de expresión, para confirmar la integración correcta de copia simple y múltiple del gen de interés. La tabla 1 muestra los oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de amplificación y secuenciación.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en la construcción de las cepas de *K. lactis* recombinantes.

Cebador	Secuencia (5'→3')	Dirección	Estrategia
MAC1	CCGCTCGAGAAAAGAGTGTCTCCGGTTACAATGGCCTTGG	Directo	Sitio de corte <i>XhoI</i>
MAC2	GGAGATCTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAGAAGAGG	Inverso	Sitio de corte <i>BglII</i>
MAC20	CCCAAGCTTATGTTTGCTTTCTACTTTCTCAC	Directo	Sitio de corte <i>HindIII</i>
MAC25	TTCAAGTAGTCAACGCGGTTA	Inverso	Integración, secuenciación
MAC26	GTGGTTGCTTTATTGAATGGAG	Directo	Secuenciación
P1	ACACACGTAAACGCGCTCGGT	Directo	Integración simple
P2	CAGTGATTACATGCATATTGT	Directo	Integración múltiple

Los sitios de restricción están subrayados, la etiqueta de purificación Poli-His se indica en negrita y el sitio de escisión de la endoproteasa Kex en cursiva. MAC25 anilla en el gen de interés y se empleó para la comprobación de ambas integraciones (copia única y múltiple). P1 y P2 se utilizaron en la comprobación de la integración de copia única (Read et al., 2007) y copia múltiple (*K. lactis Protein Expression Kit, Biolabs*), respectivamente. El diseño de cebadores se realizó mediante el programa *NetPrimer Analyse (Premier Biosoft)*.

2.3. Medios y condiciones de cultivo

Los medios de cultivo para inducir la expresión de la proteína heteróloga ScAGal en las cepas *K. lactis* recombinantes fueron YPG (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de galactosa), YPL (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de

lactosa) y YPW (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de suero de leche). En este estudio, también se utilizó un medio de cultivo basado en suero de leche y melaza de remolacha para la optimización de la producción de la proteína recombinante que se describe más adelante. La melaza fue diluida en agua destilada en una ratio 1:1 (v/v) para facilitar su manipulación, y antes del autoclavado, tanto ésta como el suero de leche se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 min para eliminar impurezas sólidas. Los azúcares presentes en melazas y suero fueron identificados y cuantificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los patrones externos utilizados consistieron en mezclas conocidas de rafinosa, sacarosa, glucosa, galactosa y fructosa en el caso de la melaza; y lactosa, glucosa y galactosa en el caso del suero de leche. Ambos patrones se prepararon a partir de cinco puntos con concentraciones comprendidas entre 4 – 0,06 mg/mL de cada analito. La preparación del inóculo de todos los cultivos realizados fue a partir de una colonia de *K. lactis* crecida en YPD a 30 °C hasta alcanzar aproximadamente una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 10. Este precultivo se utilizó para inocular matraces de 100 ml que contenían 20 mL de YPG, YPL o YPW a una OD_{600} inicial de 0.5, que se incubaron a 30 °C y 250 rpm. Cuando los cultivos se realizaron con el medio optimizado se utilizó un tamaño de inóculo inicial de 10 OD_{600} manteniendo el resto de condiciones anteriores.

2.4. Expresión heteróloga de ScAGal en cepas de *K. lactis* recombinantes

En primer lugar, se realizaron cultivos en placa de 96 pocillos (*TC Plate 96 Well, Sarstedt*) incubados a 30 °C y 300 rpm de agitación en 200 µl de YPD a partir de cada colonia seleccionada y aislada en YCB con acetamida. Después de 24 h de crecimiento, 20 µL de cada pocillo fue utilizado como inóculo de una segunda placa con 200 µL de YPG para inducir la expresión bajo las mismas condiciones de incubación. Tras un periodo de 72 h de cultivo, las placas se conservaron a 4 °C para favorecer la sedimentación celular y se analizó la actividad α -galactosidasa extracelular a partir del sobrenadante libre de células. En cada caso, las placas contenían tres cultivos de una cepa recombinante identificada con integración simple como se describe anteriormente (Sección 2.2). A continuación, un candidato con integración simple y aquellos multicopia que presentaron mayor actividad, fueron elegidos para llevar a cabo el cultivo en matraz agitado con YPG. En cada caso, se recogieron muestras a diferentes tiempos de cultivo para realizar ensayos de biomasa y/o actividades enzimáticas. La biomasa se determinó midiendo la densidad celular como OD_{600} con un espectrofotómetro UV-Visible (*Biospectrometer Kinetic eppendorf*). Tras la centrifugación (5000 rpm, 5min) de muestras de cultivo, el sobrenadante fue utilizado en los ensayos de las enzimas secretadas, α -galactosidasa heteróloga e invertasa nativa, y el sedimento celular, previamente permeabilizado con cloroformo 15 % y SDS 0.01 %, en el ensayo de la enzima β -galactosidasa nativa.

2.5. Determinación del número de copias del casete integrativo

En la tabla 2 se detallan los cebadores empleados para generar las sondas utilizadas en los análisis de PCR cuantitativa (qPCR) y *Southern blot* del ADN genómico extraído de cepas de *K. lactis* recombinantes.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en los análisis de qPCR y *Southern blot*.

Cebador	Secuencia (5'→3')	Dirección	Estrategia
MAC27	TCAAGCCTCTGTCATCGCAAT	Directo	Sonda <i>MEL1</i> (qPCR)
MAC28	TCTCTCCAAGGTCGTGTTTCATT	Inverso	Sonda <i>MEL1</i> (qPCR)
AVV83q	AAATGGAAGACAACCCGCC	Directo	Sonda <i>TAP10</i> (qPCR)
AVV84q	TTACGAATTTCTGTGTAGCAAGAGC	Inverso	Sonda <i>TAP10</i> (qPCR)
MAC29	ACACCTGTGCTGGATATCCTG	Directo	Sonda <i>MEL1</i> (<i>Southern</i>)
MAC30	GATCATTCCAACCAACAC	Inverso	Sonda <i>MEL1</i> (<i>Southern</i>)

El diseño de cebadores se realizó mediante el programa *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA)

Aislamiento de ADN genómico. El procedimiento se realizó mediante el protocolo de extracción rápida de ADN cromosómico de levaduras (Ausubel et al., 2003). La calidad y cantidad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % y espectrofotométricamente (*Biospectrometer Kinetic eppendorf*) lo que permitió elegir muestras con una ratio 260 nm/280 nm superior a 1.8.

PCR cuantitativa. La amplificación y análisis de datos se realizó utilizando el instrumento *Eco Real-Time PCR System* con el *software* versión 4.0.7.0 (Illumina, Inc., San Diego, California, USA). El *software* aplicó el método de los puntos de ajuste para determinar el valor Ct (*Threshold Cycle*) de cada una de las muestras. Los cebadores fueron diseñados con temperaturas de fusión (T_m) de 60.59 – 60.49 °C para generar amplicones de 203 pares de bases. La mezcla de reacción se preparó con *KAPA SYBR FAST Kit* (*Kapa Biosystems*) que utiliza *SYBR Green* como fluoróforo, el cual, independientemente de la secuencia, se une al ADN bicatenario. Se amplificaron diluciones seriadas del ADN molde, normalizado espectrofotométricamente a 10 ng/μL, usando cebadores específicos de cada gen a partir de tres extracciones de ADN genómico por cada cepa seleccionada. La reacción se realizó en placas ópticas de 48 pocillos *Ecoplate* (*Bibby Scientific LTd*) selladas con cubiertas de adhesivo óptico *Box Seals Adhesive* (*Illumina*). El perfil térmico se inició con un paso de 5 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de 3 s a 95 °C y 3 s a 60 °C y los datos de fluorescencia se recogieron al final del paso de elongación. El periodo de amplificación fue seguido por un análisis de la curva de fusión con un gradiente de temperatura de 0.1 °C/s de 55 °C a 95 °C para excluir la amplificación de productos inespecíficos. La cuantificación relativa del número de copias se realizó de acuerdo con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, según la siguiente ecuación (Livak and Schmittgen, 2001): cantidad relativa del gen de interés = $(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$ donde, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ del gen de interés – ΔCt del gen calibrador; $\Delta Ct = Ct$ del gen de interés o calibrador – Ct del gen de referencia; E = eficiencia de la PCR. Los

resultados se presentan como la relación de la cantidad de *MEL1His* utilizando como calibrador una cepa identificada con una copia simple como se describe anteriormente (Sección 2.2.), y el gen de referencia endógeno *TAF10* por ser constitutivo y no estar afectado por *MEL1His*. La eficiencia de la PCR se calculó a partir de la pendiente de las curvas estándar generadas por regresión lineal de los valores medios de Ct frente al \log_{10} de la concentración del ADN molde de la cepa de calibrado (Lee et al., 2006). Se aplicó el test *t* para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedio (*p*-valor < 0.05) mediante el programa *StatGraphics Plus*, versión 5.1.

Southern blot. En los ensayos de *Southern blot* se utilizó el kit *DIG DNA Labelling and detection Kit (Roche)*. La sonda se preparó utilizando los pares de cebadores MAC27 y MAC28 para obtener un amplicón de 423 pb que, tras ser purificado, fue marcado con digoxigenina. El ADN genómico (3 ng/ μ L) fue incubado con *SpeI* y *Apal* a 37 °C durante toda la noche. Después, tanto las muestras digeridas como el *GeneRuler High Range DNA Ladder (Thermo Scientific)* se cargaron, en tampón suministrado por el fabricante del marcador conteniendo *GelGreen Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)*, directamente en un gel de agarosa al 0.4 %. Tras la electroforesis, el gel fue fotografiado en un transiluminador con filtro de luz UV de 280 nm. Los fragmentos separados se transfirieron a una membrana de nylon cargada positivamente *Hybond-N⁺ (GE Healthcare)* utilizando un protocolo estándar de análisis *Southern* (Maniatis et al., 1989) y la hibridación se realizó a 52 °C durante 12 h con la sonda marcada previamente desnaturalizada (80°C/3min). Después de la hibridación, la transferencia se lavó durante 10 min a 52 °C con 2X SSC (0.6 M NaCl, citrato sódico 60 mM, pH 7) conteniendo 0.1% SDS seguido de un segundo lavado de 10 min a temperatura ambiente. A continuación, la transferencia se sometió a detección inmunológica seguida de la reacción colorimétrica descrita por el fabricante del kit. Finalmente, la membrana fue fotografiada sin aplicar filtro y los fragmentos visualizados analizados con el programa *Molecular Imager Gel Doc XR+ (BioRad)* utilizando el marcador de referencia de tamaño del gel fotografiado anteriormente.

2.6. Optimización de la producción de ScAGal por *K. lactis* recombinante

Como paso previo a la optimización, la cepa *K. lactis* recombinante elegida se cultivó en los medios YPL y YPW. Se aplicó la metodología de superficie de respuesta (MSR) para maximizar la producción de ScAGal utilizando un medio compuesto principalmente por suero de leche y melaza de remolacha. Un diseño factorial 3² permitió estudiar la influencia individual y combinada de los factores experimentales (variables independientes), suero de leche y melaza de remolacha, sobre la respuesta (variable dependiente) medida mediante el análisis de la actividad α -galactosidasa extracelular de los cultivos ensayados. Cada factor fue añadido a la concentración

descrita por el diseño experimental como porcentaje de azúcar total y todos los cultivos fueron suplementados con 1 % de extracto de levadura para aportar la fuente de nitrógeno necesaria. Los valores reales y codificados para las variables investigadas a tres niveles diferentes, -1, 0, +1, donde 0 corresponde al punto central del dominio experimental, se muestran en la Tabla 3. Un modelo cuadrático de segundo orden fue utilizado para correlacionar la variable respuesta con las variables independientes, y los valores óptimos del diseño experimental se obtuvieron resolviendo la ecuación de regresión y analizando el gráfico de contorno de superficie de respuesta. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con intervalos de confianza del 95% para determinar la significancia estadística de los efectos. El tratamiento de datos estadísticos y la construcción de gráficos se llevó a cabo con el programa *StatGraphics Plus v. 5.1*.

Tabla 3. Factores estudiados en el diseño factorial 3^2 y su correspondencia entre los valores reales y codificados.

Factores experimentales Valores reales	Valores codificados		
	-1	0	1
Melaza (%)	6	7.5	9
Suero de leche (%)	2	3	4

$x_i = (X_i - X_0)/\Delta X_i$; donde x_i es el valor codificado de la variable independiente, X_i es el valor real de la variable independiente, X_0 es el valor real de la variable independiente en el punto central del dominio experimental y ΔX_i el incremento de X_i correspondiente a una unidad del valor adimensional x_i .

2.7. Biorreactor a escala laboratorio

La cepa de *K. lactis* recombinante se cultivó en un biorreactor *Biostat-MD 2 L* (*Braun-Biotech*) con un volumen de trabajo de 1 L del medio de producción optimizado obtenido del resultado descrito anteriormente (Sección 2.6.). Tras la esterilización del biorreactor a 121°C durante 30 min, éste fue inoculado con una OD_{600} de 10 y suplementado asépticamente con 300 mg/L de ampicilina manteniendo condiciones controladas de 30 °C, 2 L/min de flujo de aire y 300 rpm de agitación mecánica, durante 120 h de cultivo. La biomasa celular fue determinada por el método de peso seco a partir de muestras de 5 mL de cultivo tras ser centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min, lavadas con agua destilada, recentrifugadas y secadas en un horno a 105 °C hasta alcanzar un peso constante. Con el sobrenadante recuperado se midió la actividad α -galactosidasa extracelular y la conversión de sustratos en metabolitos secundarios. El consumo de azúcar y producción de metabolitos secundarios se analizó mediante HPLC utilizando un patrón externo compuesto por concentraciones de rafinosa, sacarosa, glucosa, galactosa, fructosa, glicerol y etanol comprendidas entre 4 – 0,06 mg/mL.

2.8. Ensayos de actividad enzimática

La determinación de la actividad α -galactosidasa y β -galactosidasa se realizó a 40 °C incubando las muestras con PNPG 10 mM en tampón McIlvaine pH 4 (Ryan et al., 1998) y ONPG 13 mM en tampón Z (Guarente, 1983), respectivamente, ambos

sustratos suministrados por *Sigma Aldrich*. A dos intervalos de tiempo consecutivos, la reacción se paró con Na_2CO_3 0.5 M y se cuantificó el *p*-nitrofenol o el *o*-nitrofenol liberado a 400 nm ($\epsilon = 18.2 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) o 420 nm ($\epsilon = 4.5 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), respectivamente. La determinación de la actividad invertasa se llevó a cabo incubando las muestras con sacarosa 100 mM en tampón acetato 50 mM pH 5 durante 10 min a 40 °C, la reacción se detuvo por ebullición (95 °C/5 min) y se determinó el azúcar reductor generado mediante el método del DNS (Miller, 1959). La unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera un μmol de producto por min en las condiciones de ensayo. En todos los casos se tomaron muestras por triplicado y las lecturas espectrofotométricas se realizaron en placas de microvaloración de fondo plano con *Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader* (BioTEK).

2.9. Análisis de HPLC

Los análisis de HPLC se realizaron con la columna *Sugar Pack Waters* (6.5 mm x 300 mm) equipada con un *Refractive Index Detector* (Cienytech). Todas las muestras fueron previamente clarificadas mediante extracción en fase sólida con los cartuchos *HyperSep Silica SPE Column* (Fisher Scientific) para eliminar interferencias por pigmentos y otras impurezas de las melazas y el suero de leche. Las condiciones de trabajo fueron, temperatura de la columna 80 °C, temperatura del detector 37 °C y sensibilidad 32 empleando como fase móvil EDTA-Calcio 100 μM (*Sigma Aldrich*) a un flujo de 0.5 mL/min. Los compuestos eluidos fueron identificados y cuantificados utilizando el patrón externo correspondiente. A cada muestra y patrón externo se añadió 1 mg/mL de sorbitol utilizado como patrón interno, el cual no interfiere con los tiempos de retención de los compuestos de estudio y permitió eliminar errores relativos a la inyección de muestras, variaciones en la composición de la fase móvil u otros cambios derivados del envejecimiento de la columna (Xu et al., 2014).

3. Resultados

3.1. Construcción de cepas de *K. lactis* recombinantes

El casete de expresión lineal fue integrado con éxito en el genoma de las cepas de *K. lactis* GG799 y Y1140 a partir de las construcciones plasmídicas, pKLACMEL1His-1 y pKLACMEL1His-2 (Figura 1). Ambos plásmidos contienen los extremos 5' y 3' del promotor *LAC4-PIB* que permitieron la integración de *MEL1His* en la región promotora del locus *LAC4* de *K. lactis* utilizando el gen *amdS* como marcador de selección (Colussi and Taron, 2005). El gen *amdS* que codifica para la enzima acetamidasa, permitió la selección de recombinantes transformados en medio mínimo con acetamida, tras la hidrólisis de ésta última en amoniaco utilizado como fuente de nitrógeno asimilable durante el crecimiento (Read et al., 2007). Para asegurar la obtención de colonias

aisladas, fue necesario realizar varias diluciones de la mezcla de células transformantes sin sobrepasar los 5 días de incubación. *K. lactis* de tipo silvestre contiene el gen nativo de la acetamidasa que se expresa a nivel basal (Klimecki, 2010), de modo que, varios días después del plaqueo, se empezó a visualizar un crecimiento en forma de césped bajo los transformantes verdaderos que crecen mucho más rápido porque pueden metabolizar más rápido la acetamida (Figura 2A). Este fondo de células en forma de césped fue confirmado en controles negativos de la cepa sin transformar (Figura 2B). Finalmente, la integración conduce a una o varias copias en tándem del gen de interés que se expresa bajo el promotor *LAC4* y reconstituye el locus *LAC4* que dirige la expresión de la enzima β -galactosidasa nativa (Figura 3A). El par de cebadores P1/MAC25 determinó la integración de copia única en el lugar correcto dentro del genoma de la cepa, mientras que con el par de cebadores P3/MAC25 se verificaron integrantes de copia múltiple. Los análisis de PCR de colonias transformantes permitieron identificar clones con dos o más copias en tándem del gen de interés que fueron elegidos para realizar ensayos posteriores (Figura 3B).

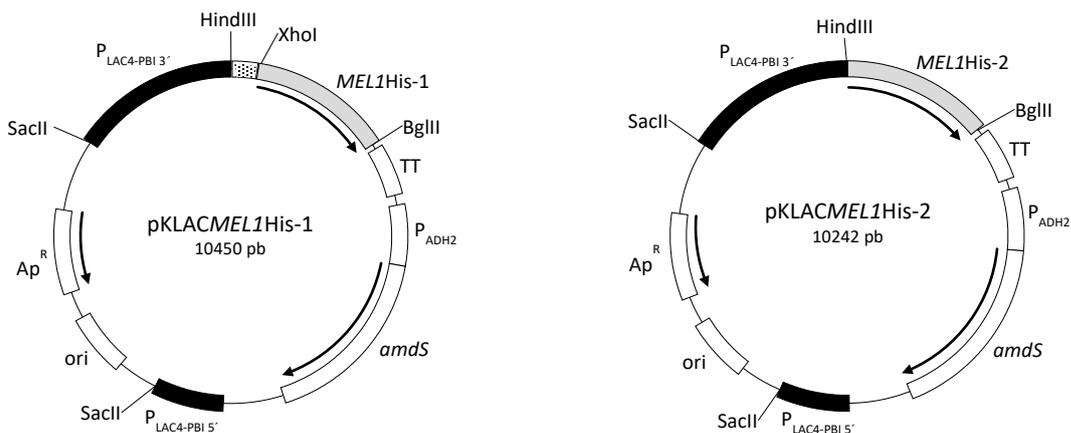


Figura 1. Mapas físicos de los plásmidos construidos para generar las cepas de *K. lactis* recombinantes. pKLACMEL1His-1 y pKLACMEL1His-2 se crearon mediante el clonaje entre los sitios de restricción *XhoI*-*BglII* y *HindIII*-*BglII* del vector de expresión integrativo pKLAC-1, respectivamente. *MEL1His-1* es clonado, sin la señal de secreción endógena, en pauta con la secuencia α -MF de *K. lactis* (caja punteada) que codifica para un péptido señal. *MEL1His-2* contiene la señal de secreción endógena en pauta con el sitio *HindIII* para permitir el clonaje inmediatamente aguas abajo del promotor *LAC4*-*PBI*. Ambos genes codifican la proteína de fusión de interés que es secretada al medio extracelular.

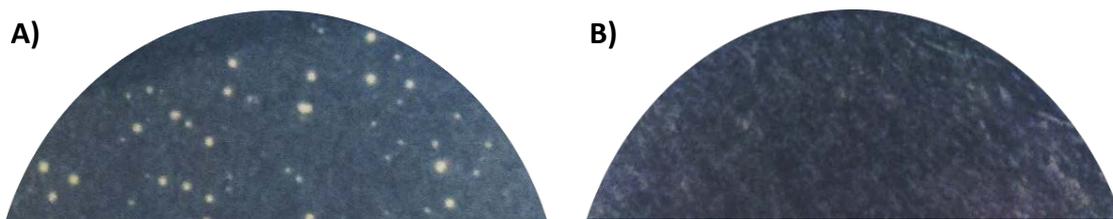


Figura 2. Selección de colonias transformantes en placa YCB suplementada con 5 mM de acetamida. Las células fueron transformadas según el método de acetato de litio y seleccionadas en placas YCB-acetamida incubadas a 30°C durante 4 días. Se realizó la siembra de varias diluciones del volumen total de células transformantes para obtener colonias aisladas (A) junto con un control negativo de transformación sin ADN (B).

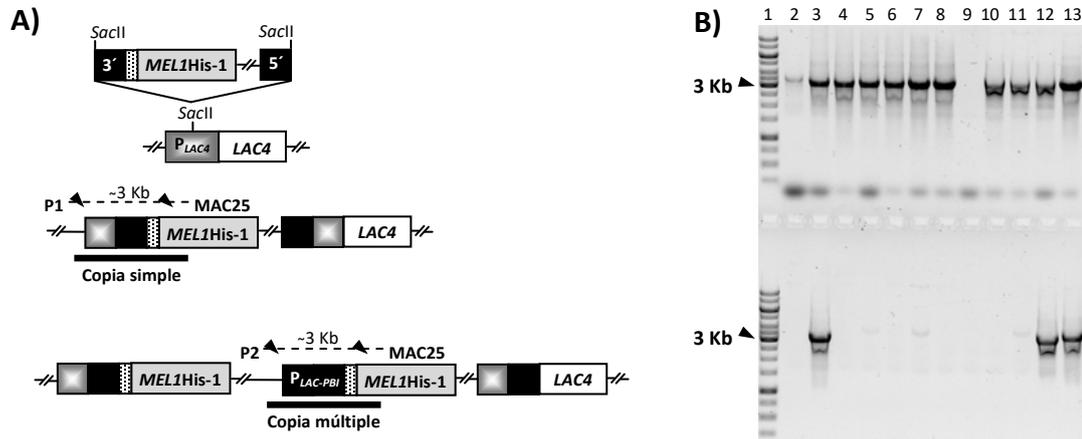


Figura 3. Integración dirigida del gen *MEL1His* en el locus cromosómico *LAC4* de *K. lactis*. A) El casete de expresión linealizado con *SacII*, es dirigido a través de los extremos 3' y 5' del $P_{LAC4-PBI}$ (cajas negras) dentro de la región promotora de *LAC4* permitiendo su reconstitución tras la integración. El cebador P1 anilla "aguas arriba" del P_{LAC4} de la cepa de origen y el cebador P2 anilla "aguas arriba" del $P_{LAC4-PBI}$ dentro del casete de expresión. Los pares de cebadores P1 y MAC25, P2 y MAC25 permitieron comprobar integraciones de copia simple o múltiple, respectivamente. B) Comprobación de candidatos *K. lactis* recombinantes mediante análisis de PCR de transformantes. Calle 1, *GeneRuler 1Kb DNA Ladder* (*Thermo Scientific*); Calles 2-13, muestra de algunos clones con copia simple (primer peine) y copia múltiple (segundo peine) del gen de interés. *MEL1His-1* no contiene la señal de secreción endógena y está en pauta con la secuencia α -MF de *K. lactis* (caja punteada) en pKLAC*MEL1His-1*. La integración de *MEL1His-2* se llevó a cabo por el mismo procedimiento a partir de pKLAC*MEL1His-2*. En ambos casos se obtienen fragmentos de alrededor de 3 Kb de longitud.

3.2. Expresión heteróloga de ScAGal en cepas *K. lactis* recombinantes

La frecuencia de integración multicopia utilizando las cepas *K. lactis* GG799 y Y1140 fue similar en todos los casos (50 - 60 %) y el ensayo funcional de actividad α -galactosidasa extracelular permitió agrupar los candidatos en dos grupos diferenciados que podrían contener dos o más copias del gen de interés (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia de integración y ensayo funcional de candidatos multicopia de células *K. lactis* transformadas.

Cepas recombinantes	Frecuencia de integración			Ensayo funcional	
	Tipo	Nº de candidatos	%	U/mL	Nº de candidatos
GG799 <i>MEL1His-1</i>	1 copia	24	51	0.039 ± 0.014	3 ^a
	Multicopia	23	49	0.108 ± 0.001	18
					0.193 ± 0.078
GG799 <i>MEL1His-2</i>	1 copia	14	42	0.167 ± 0.066	3 ^a
	Multicopia	19	58	0.362 ± 0.104	11
					0.741 ± 0.200
Y1140 <i>MEL1His-1</i>	1 copia	15	42	0.005 ± 0.001	3 ^a
	Multicopia	21	58	0.010 ± 0.001	17
					0.020 ± 0.001
Y1140 <i>MEL1His-2</i>	1 copia	13	43	0.112 ± 0.030	3 ^a
	Multicopia	17	57	0.210 ± 0.029	13
					0.372 ± 0.042

^a Cada placa incluía tres candidatos con integración simple que expresan sólo una copia del gen de la ScAGal (ver sección 2.4.). La frecuencia de integración indica el porcentaje de colonias transformantes que dieron positivo para la integración de copia simple y multicopia mediante PCR de células enteras. El ensayo funcional se realizó a partir de muestras de cultivo en placa de 96 pocillos empleando YPG como medio de expresión.

El nivel de actividad de GG799MEL1His-2 es casi 4 veces superior (4 ± 0.465) que GG799MEL1His-1, mientras que el nivel de Y1140MEL1His-2 fue 20 veces mayor (20 ± 2.178) que Y1140MEL1His-1. Por lo tanto, la integración del gen con la secuencia que codifica para el péptido señal endógeno, mejoró considerablemente el sistema de expresión de ScAGal. Estos resultados demuestran la importancia de estudiar la capacidad de expresión de una proteína de interés que contiene un péptido señal nativo, frente a la recomendación de su sustitución por el dominio α -MF de *K. lactis* para dirigir su secreción al medio extracelular (*K. lactis Protein Expression Kit, New England Biolabs*).

Los candidatos multicopia del gen MEL1His-2 con mayor actividad fueron elegidos para evaluar la expresión de ScAGal de cultivos en matraz agitado (Figura 4). También se determinó la producción de las enzimas nativas β -galactosidasa e invertasa a partir de cepas con una integración simple de dicho gen (Figura 5). En este caso, a las 72 horas de cultivo GG799MEL1His-2 expresó una media de β -galactosidasa de 23 U/mL que se mantuvo hasta las 144 h, mientras que Y1140MEL1His-2 obtuvo 15 U/mL disminuyendo abruptamente en el mismo intervalo de tiempo. Asimismo, la primera alcanzó la fase estacionaria a las 48 h con una biomasa celular mayor y ambas secretaron alrededor de 30-35 U/mL de invertasa. Además, la producción más alta de β -galactosidasa por ambas cepas silvestres, sugiere que copias adicionales del promotor *LAC4*, usadas para impulsar la expresión de ScAGal, podrían afectar negativamente a la regulación del gen *LAC4*. Por otro lado, es necesario indicar que el gen MEL1His-2 codifica para una proteína fusionada a una etiqueta poli-His que permite la purificación de ScAGal por cromatografía de afinidad si se requiere obtener preparaciones enzimáticas libres de actividad invertasa.

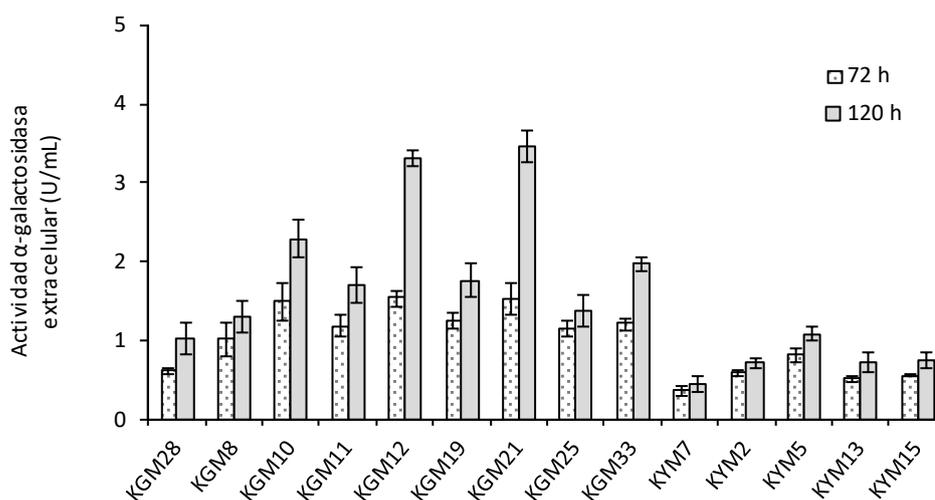


Figura 4. Actividad α -galactosidasa extracelular de candidatos multicopia seleccionados de cepas de *K. lactis* GG799MEL1His-2 (KGM) y Y1140MEL1His-2 (KYM) cultivados en YPG en matraz agitado. KGM28 y KYM7 corresponden a cepas con integración simple del gen MEL1His-2. Los datos presentados son el promedio de tres determinaciones del ensayo de actividad (Media \pm DS).

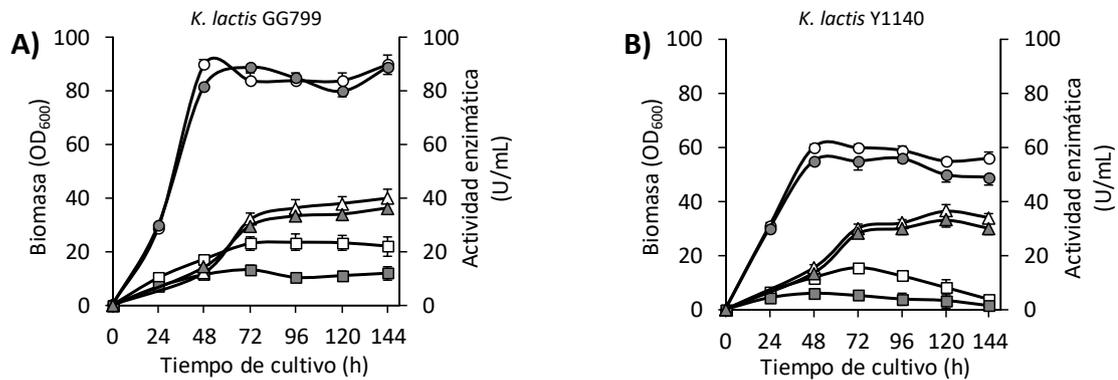


Figura 5. Perfil típico de crecimiento celular (círculos) y producción de actividad β -galactosidasa (cuadrados) e invertasa (triángulos) nativas de cultivos de cepas de *K. lactis* GG799 (A) y Y1140 (B) en YPG. Los símbolos vacíos y llenos corresponden a la cepa silvestre y recombinante con integración de copia simple del gen *MEL1His-2*, respectivamente. (Media \pm DS, N = 3).

Por todo lo expuesto anteriormente, *K. lactis* GG799*MEL1His-2*, en adelante nombrado como KGM, fue seleccionado como mejor sistema de expresión de ScAGAL. Los candidatos KGM multicopia fueron utilizados para determinar el número exacto de integraciones cromosómicas en experimentos subsiguientes.

3.3. Distribución del número de copias en cepas KGM multicopia

El análisis de PCR cuantitativa utilizando el fluoróforo *SYBR Green* como sistema de detección, permitió la cuantificación relativa mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ del número de copias del casete de expresión integrado en el genoma de *K. lactis*. El valor *Ct* (*Cycle Threshold*) representa el ciclo de amplificación donde la fluorescencia alcanza el valor umbral y es inversamente proporcional a la concentración de ADN molde inicial. En total, se seleccionaron 10 cepas KGM, entre las cuales, 8 contenían integración multicopia y 2 eran portadoras de una integración simple. Las cepas portadoras de copia única KGM28 y KGM2 fueron utilizadas como calibrador para la generación de las curvas estándar requeridas en los experimentos de qPCR y como control del calibrador, respectivamente. Las curvas estándar para el gen *MEL1* y el gen de referencia *TAP10* fueron lineales ($R^2 > 0.994$) y mostraron una eficacia de amplificación (E) alta (Figura 6A). El análisis de la regresión lineal de la variación ΔCt entre ambos genes frente a la concentración de ADN molde obtuvo una pendiente cercana a cero (0.0755) confirmando que las eficacias de amplificación son lo suficientemente similares para validar el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Figura 6B). Dado que KGM28 contiene una copia de la secuencia específica de cada gen, la relación de copias *MEL1/TAP10* en el calibrador es 1 y por lo tanto, la ΔCt (1.98 ± 0.38) del calibrador pudo ser empleada para normalizar la relación de cantidad de copias *MEL1/TAP10* de las cepas analizadas. En la tabla 5 se muestran los resultados de la cuantificación

relativa y el caculo del número de copias, estimado por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y utilizando el valor E de 1.1 obtenido experimentalmente (Figura 6A).

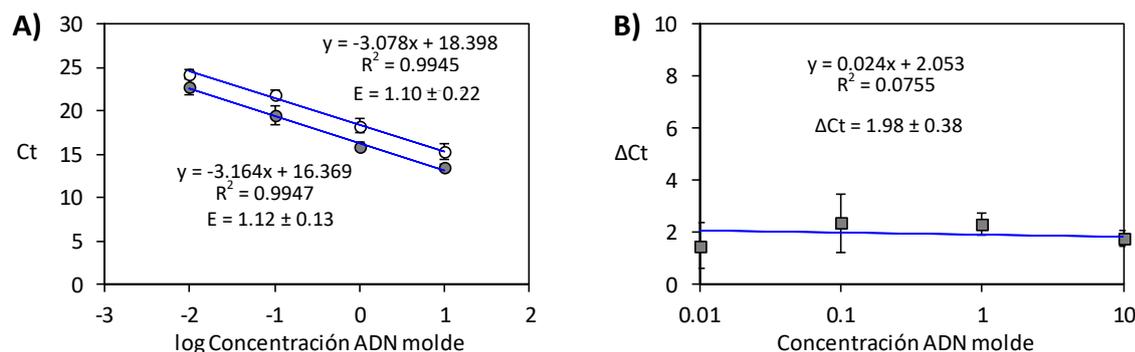


Figura 6. Construcción de curvas estándar (A) y validación del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (B) mediante qPCR y detección SYBR Green. Se amplificaron diluciones decimales en serie del ADN molde normalizado a 10 ng/ μ L, usando cebadores específicos de cada gen, a partir de tres extracciones de ADN genómico de la cepa KGM28 (calibrador). Las curvas estándar para los genes, *MEL1* (círculos llenos) y *TAF10* (círculos vacíos) se emplearon para determinar la eficacia de amplificación (E) según la ecuación, $E = (10^{-1/\text{pendiente}})^{-1}$ (A). Para comprobar la eficacia de las amplificaciones se calculó ΔCt_c ($Ct_{MEL1,c} - Ct_{TAF10,c}$) para cada dilución de la concentración conocida de molde inicial (B).

Tabla 5. Estimación del número de copias de *MEL1*His-2 integradas en cepas KGM.

Cepa	$Ct_{MEL1; n}$	$Ct_{TAF10; n}$	ΔCt_n ($Ct_{MEL1; n} - Ct_{TAF10; n}$)	$\Delta\Delta Ct$ ($\Delta Ct_n - \Delta Ct_c$)	Nº Copias	
					$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$(1-E)^{-\Delta\Delta Ct}$
KGM2 ^a	22.24 \pm 0.43	24.24 \pm 0.52	-1.99 \pm 0.41	-0.01	1.01	1.01
KGM8	16.56 \pm 0.29	19.51 \pm 0.31	-3.19 \pm 0.24	-1.20	2.31	2.45
KGM10	19.37 \pm 0.32	22.91 \pm 0.22	-3.53 \pm 0.34	-1.55	2.94	3.17
KGM11	16.58 \pm 0.45	19.27 \pm 0.39	-2.68 \pm 0.43	-0.70	1.62	1.68
KGM12	17.26 \pm 0.12	21.14 \pm 0.23	-3.88 \pm 0.23	-1.89	3.71	3.97
KGM19	19.61 \pm 0.20	22.52 \pm 0.54	-2.91 \pm 0.21	-0.92	1.90	1.99
KGM21	17.55 \pm 0.62	21.42 \pm 0.22	-3.86 \pm 0.47	-1.88	3.68	4.08
KGM25	19.01 \pm 0.16	22.05 \pm 0.41	-3.03 \pm 0.44	-1.05	2.07	2.18
KGM33	18.33 \pm 0.32	21.65 \pm 0.66	-3.31 \pm 0.12	-1.28	2.43	2.59

^aKGM2 fue la cepa de copia simple utilizada como control del calibrador. ΔCt_c y E son la ΔCt del calibrador y la eficacia de la qPCR, respectivamente, cuyos valores fueron obtenidos experimentalmente de las curvas estándar ($\Delta Ct_c = 1.98 \pm 0.38$; $E = 1.1$). Los datos corresponden a la media de muestras procedentes de tres extracciones de ADN genómico, $N = 3 \pm DE$. La diferencia en el número de copias promedio se confirmó con una prueba *t-Student* (p -valor < 0.05).

Las cepas KGM también fueron analizadas por *Southern blot* utilizando una sonda específica del gen *MEL1* marcada con digoxigenina, que confirmó el número exacto de copias integradas indicado por el tamaño de los fragmentos de ADN hibridado (Figura 7). Este ensayo demuestra que los resultados de qPCR fueron consistentes con el análisis de transferencia de *Southern*, proporcionando una alternativa más rápida y sencilla cuando es necesario analizar un número importante de candidatos seleccionados de cepas transformantes, que puede ser aplicado de forma rutinaria en laboratorio. Además, la cuantificación relativa permite obtener datos de los niveles del gen integrado para el estudio de sistemas de expresión que empleen diferentes promotores, genes rediseñados o secuencias señal alternativas (Abad et al., 2010). En

este trabajo, se identificaron cepas KGM que contenían hasta cuatro copias del gen integrado y se obtuvieron resultados fiables con dos métodos de detección diferentes.

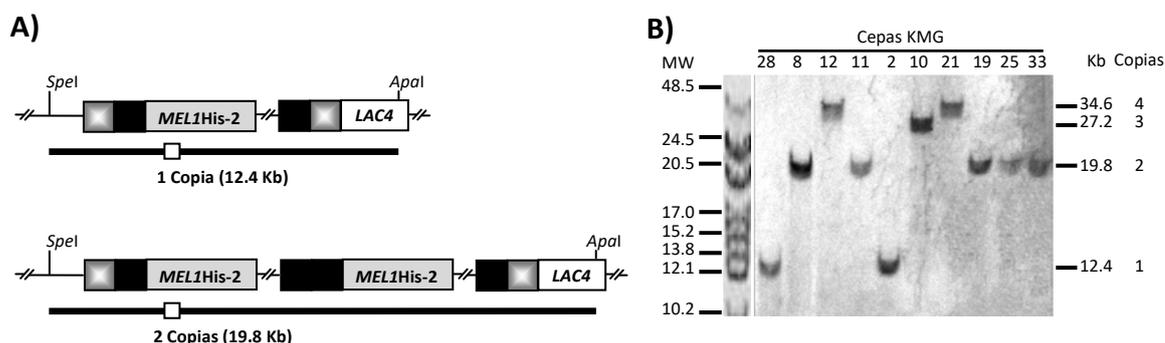


Figura 7. Determinación del número de copias del casete de expresión integrado en cepas KGM mediante análisis de Southern blot. A) El ADN genómico fue digerido con *SpeI* y *ApaI* por reconocer sitios de restricción que flanquean la zona de inserción dentro del locus cromosómico *LAC4* de *K. lactis* y los fragmentos obtenidos, tras ser separados mediante electroforesis, fueron sometidos a transferencia Southern. La sonda de hibridación (caja blanca) unida a integrantes de una sola copia da lugar a un fragmento de 12.4 Kb, el cual aumenta de tamaño en 7.4 Kb por cada casete de expresión adicional insertado en cepas multicopia. B) La transferencia Southern se sometió a detección inmunológica y la sonda específica marcada con digoxigenina permitió confirmar el número exacto de copias integradas (*DIG DNA Labeling and Kit de detección, Roche*). MW, marcador de peso molecular (Kb) *GeneRuler High Range DNA Ladder (Thermo Scientific)*.

3.4. Optimización de la producción de ScAGal por la cepa KGM21 a partir de suero de leche y melaza de remolacha

KGM21 fue la cepa elegida para llevar a cabo la optimización de un medio de producción a partir de suero de leche y melaza de remolacha. Esta cepa, que contiene hasta 4 copias del gen que codifica para la ScAGal, permite la expresión de la proteína recombinante bajo el promotor *LAC4* inducible por lactosa. Dado que la lactosa es el azúcar mayoritario del suero de leche (98.7 %), se valoró previamente la utilización de este sustrato como inductor realizando cultivos en paralelo con los medios YPL y YPW (Figura 8). En este caso, el uso de suero de leche permitió obtener más del doble de actividad α -galactosidasa extracelular durante todo el periodo de cultivo ensayado.

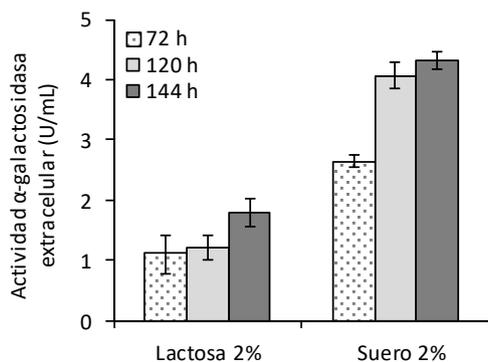


Figura 8. Valoración del cultivo de la cepa KGM21 empleando lactosa o suero de leche como inductor de la producción de ScAGal. La cepa fue inoculada a una OD_{600} inicial de 0.5 en los medios YPL (1% extracto de levadura, 2 % bactopectona, 2 % lactosa) y YPW (1% extracto de levadura, 2 % bactopectona, 2 % suero de leche) y se determinó la actividad α -galactosidasa extracelular de muestras recogidas a las 72, 120 y 144 h de cultivo. Los resultados corresponden a la media de tres réplicas biológicas (Media \pm DE).

Con el objetivo de obtener un medio de producción sostenible y más barato se utilizó la melaza de remolacha, que contiene 59.7 % de sacarosa, 2.9 % rafinosa, 1.2 % glucosa y 2.4 % fructosa, como fuente de carbono extra fácilmente asimilable *por K. lactis* gracias a la enzima invertasa nativa. La melaza aporta una fracción nitrogenada de tan sólo 0.3 %, por lo que el medio fue suplementado con extracto de levadura que, además, como se ha estudiado en el capítulo 2, puede ser sustituida por un autolisado de la biomasa celular generada. También se evitó el uso de peptona para rentabilizar el proceso productivo final. Por último, en este caso se decidió trabajar con un tamaño de inóculo de OD₆₀₀ de 10 para favorecer el crecimiento inicial de los cultivos ensayados en vista de la mejora alcanzada descrita en el capítulo 2. En base a lo expuesto, se seleccionó un 3 % de suero de leche y 7.5 % de melaza como punto central de un diseño factorial 2² que dio lugar a un conjunto de 12 series de experimentos con tres puntos centrales cuyos resultados se muestran en la Tabla 6. El análisis de regresión de los datos observados se ajustó a un modelo cuadrático mediante la MSR y la significancia y aceptabilidad del modelo se validó mediante un ANOVA que se presenta en la tabla 7.

Tabla 6. Matriz experimental y resultados del diseño factorial 2² observados y predichos por la MSR.

No. Exp.	Valores codificados		Valores reales		Actividad α -galactosidasa extracelular	
	x_1	x_2	X_1	X_2	Observado	Ajustado
1	-1	-1	6	2	3.813	3.84963
2	0	-1	7.5	2	5.286	5.20958
3	1	-1	9	2	1.945	1.98479
4	-1	0	6	3	4.571	4.88225
5	0	0	7.5	3	5.945	5.70596
6	1	0	9	3	1.64	1.94492
7	-1	1	6	4	5.165	4.81712
8	0	1	7.5	4	4.412	5.10458
9	1	1	9	4	1.152	0.807292
10	0	0	7.5	3	6.363	5.70596
11	0	0	7.5	3	5.324	5.70596
12	0	0	7.5	3	5.808	5.70596

X_1 , concentración de melaza (%); X_2 , concentración de suero de leche (%). La respuesta, actividad α -galactosidasa extracelular, fue definida como la cantidad de enzima que libera un μmol de *p*-nitrofenol por minuto en las condiciones de ensayo, pH 4 y 40 °C.

Tabla 7. Análisis de Varianza para el modelo cuadrático de superficie de respuesta.

Efectos	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
X_1 : Melaza	12.942	1	12.942	70.56	0.0035 *
X_2 : Suero de leche	0.016	1	0.016	0.09	0.7836
X_1X_1	14.013	1	14.013	76.4	0.0032 *
X_1X_2	1.150	1	1.150	6.27	0.0874
X_2X_2	0.803	1	0.803	4.38	0.1274
Falta de ajuste	1.013	3	0.338	1.84	0.3143
Error total	0.550	3	0.183		
Total (corregido)	34.857	11			

$R^2 = 95.51$ %; R^2 (ajustado para Gl) = 91.77 % (representa un valor más adecuado para comparar modelos multivariados); Error estándar de la estimación = 0.428; Error medio absoluto = 0.294. Gl, grados de libertad. En la tabla se indican los efectos lineales (X_1 y X_2), los cuadráticos de las variables melaza (X_1X_1) y suero de leche (X_2X_2) y la interacción melaza-suero (X_1X_2). *Denota una diferencia estadísticamente significativa valor-P < 0.05).

El resultado de la ecuación del modelo ajustado fue $Y = -57.09 + 15.37X_1 + 5.92X_2 - 1.019X_1X_1 - 0.357X_1X_2 - 0.549X_2X_2$, donde Y es la respuesta medida como actividad α -galactosidasa extracelular (U/mL) del sobrenadante de los cultivos ensayados, y X_1 y X_2 son los valores codificados para las concentraciones de melaza de remolacha y suero de leche, respectivamente.

El análisis gráfico muestra que la variable experimental con mayor predominio sobre la respuesta fue la melaza de remolacha con un nivel de confianza del 95 % (Figura 9A). Dado el alto grado de correlación entre los valores observados y predichos (Figura 9B), los efectos que no alcanzaron la línea de significancia estadística también fueron incluidos para mejorar el ajuste del modelo. Además, ambos efectos lineales presentaron una influencia negativa sobre la respuesta (Figura 10A) y el efecto de la interacción entre ellos mostró un punto de inflexión de máximo rendimiento a partir del cual la producción de ScAGal podría estar afectada negativamente por la concentración de melaza independientemente de la concentración de suero (Figura 10B). El estadístico R^2 determinó que el modelo ajustado explica el 95.51 % de la variabilidad de los datos (Y) y el resto de la varianza total es atribuida a otras desviaciones y no a los factores experimentales ($R^2 =$ variabilidad explicada por el modelo/variabilidad total). Asimismo, la prueba de falta de ajuste fue estadísticamente insignificante (valor $P = 0.338$), lo que confirma que el modelo es adecuado para predecir la producción de ScAGal dentro del rango experimental. Por otro lado, el gráfico de superficie de respuesta (Figura 11) proporcionó una interpretación visual de la interacción entre la concentración de melaza y suero, donde el diagrama de contorno definió una región cercana al óptimo, punto teórico que representa la mejor condición de operación del proceso. Así, los valores óptimos de las condiciones experimentales fueron 7 % de melaza de remolacha (X_1) y 3 % de suero de leche (X_2) para los que el modelo predijo una actividad α -galactosidasa extracelular máxima de 5.95 U/mL (Y).

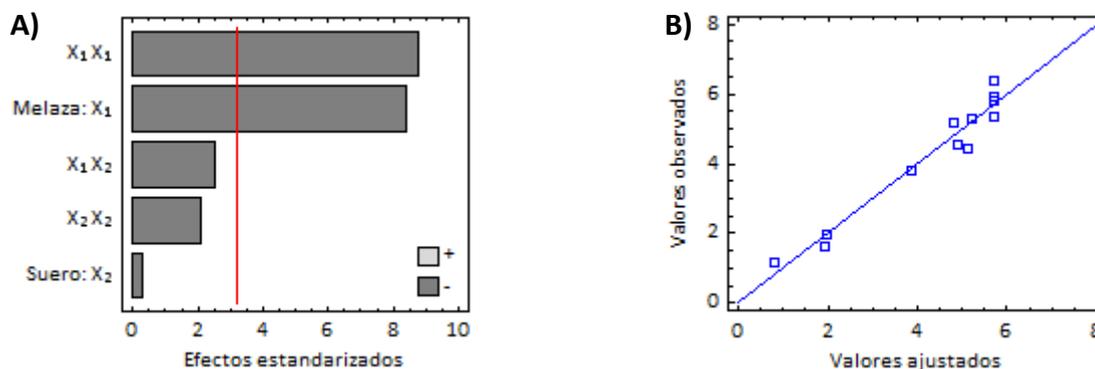


Figura 9. Diagrama de Pareto (A) y valores observados versus valores ajustados (B) por el modelo de regresión. A) La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado (efecto estimado dividido entre el error estándar), la línea vertical indica la significancia con un 95 % de nivel de confianza y +/- establece el efecto positivo y negativo sobre la respuesta (actividad α -galactosidasa extracelular). B) Los puntos cercanos alrededor de la diagonal indican el óptimo del modelo y determinan que la desviación entre dichos valores fue mínima.

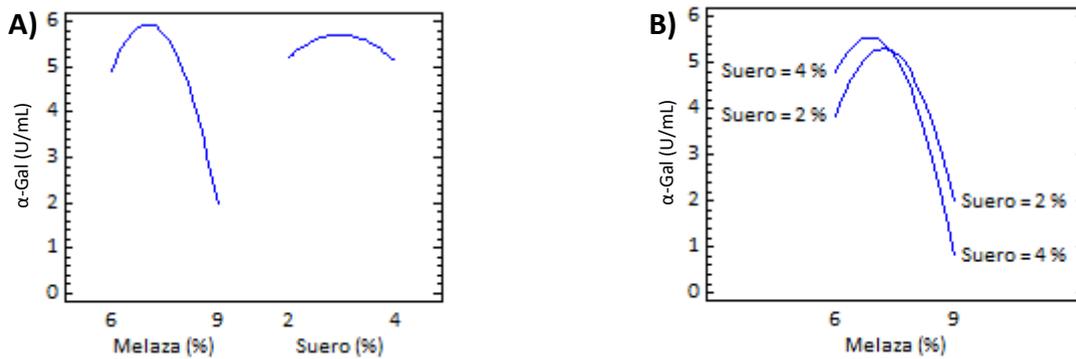


Figura 10. Gráficos del efecto lineal (A) y de la interacción melaza-suero (B) sobre la producción de ScAGal. A) El factor elegido se varía del nivel -1 al +1, mientras que el otro se mantiene constante en su valor central. Cuanto mayor es la pendiente, mayor será el efecto sobre la respuesta, actividad α -galactosidasa extracelular (α -Gal). B) El factor melaza se varía de su nivel -1 a su nivel +1 mientras que el factor suero se mantiene constante en su nivel +1 (línea superior) o en su nivel -1 (línea inferior).

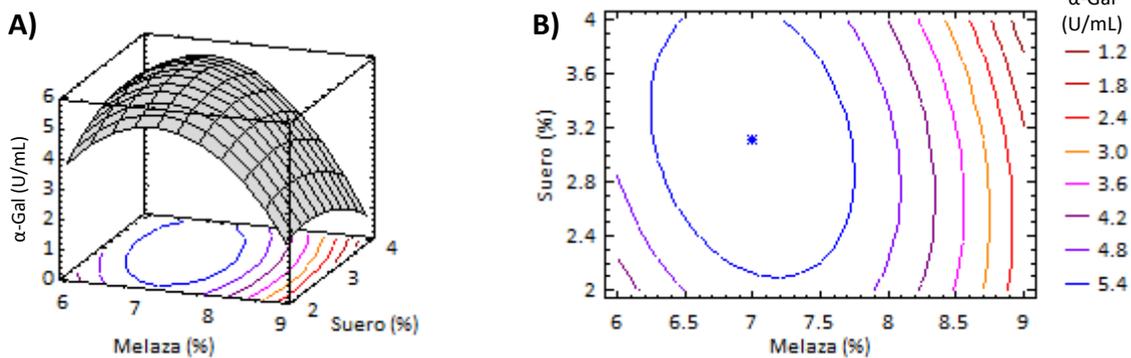


Figura 11. Gráfico de superficie (A) y diagrama de contorno (B) para la producción de ScAGal. Actividad α -galactosidasa extracelular máxima (α -Gal) estimada por la MSR en función de la interacción melaza-suero.

3.5. Escalado a nivel laboratorio de la producción de ScAGal por la cepa KGM21

El medio de producción optimizado fue utilizado para llevar a cabo experimentos en matraz agitado y en un biorreactor de 2-L con 1 L de volumen de trabajo, a partir de las concentraciones predichas por la MSR. En el cultivo en matraz, la producción de ScAGal aumentó durante el crecimiento celular hasta las 72 h alcanzando una media de 5.83 U/mL que se mantuvo cuando la cepa entró en fase estacionaria (Figura 12A). Este resultado confirma la estimación estadística realizada por el modelo de SR descrito anteriormente, que permitió obtener hasta un 49 % más de actividad α -galactosidasa extracelular que el medio con lactosa inicialmente probado (4 U/mL). Sin embargo, en el biorreactor, la cepa llegó antes a la fase estacionaria (48 h) con una actividad de 10 U/mL que aumentó progresivamente hasta un máximo de 19 U/mL en el cultivo final (Figura 12B).

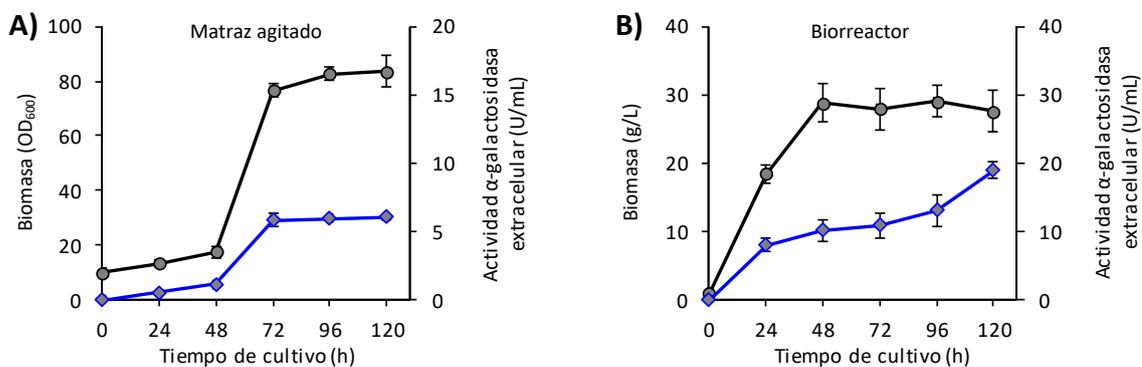


Figura 12. Cultivo de KGM21 en matraz agitado (A) y biorreactor (B) a partir del medio de producción optimizado. Seguimiento en el tiempo de la biomasa celular (círculos) y actividad α -galactosidasa extracelular (rombos) empleando un medio de producción con 7 % de melaza de remolacha, 3 % de suero de leche y 1 % de extracto de levadura. El medio fue inoculado con $100D_{600}$ y se mantuvo el resto de condiciones de cultivo descritas anteriormente (Sección 2.3.). Los datos presentados en el cultivo en matraz y en biorreactor son el promedio de tres réplicas biológicas y técnicas, respectivamente (Media \pm DS).

En la tabla 8 se presentan los análisis de conversión de sustratos en productos en el biorreactor que concuerda con el metabolismo respiro-fermentativo característico de *K. lactis*. Estos resultados muestran que la cepa es capaz de consumir prácticamente todo el sustrato disponible en el medio (melaza y suero de leche) a las 24 h de cultivo. Esto se debe a que, al inicio del cultivo, se induce la expresión de la ScAGal recombinante y las enzimas nativas, β -galactosidasa e invertasa, que permiten la hidrólisis de rafinosa, lactosa y sacarosa, respectivamente. Al mismo tiempo, tiene lugar la producción de etanol como metabolito secundario que rápidamente es utilizado como fuente de carbono para la producción de biomasa y ScAGal. En levaduras, la glucosa y la fructosa siempre se consumen primero, y después, tras la hidrólisis de sacarosa, la glucosa y fructosa suelen reprimir el metabolismo de otros azúcares menos preferidos (Verstrepen et al., 2004). Sin embargo, en este caso se detectó sólo un 1.7 % de azúcar identificado en los análisis de HPLC a un tiempo de retención (t_R) de 8.32 que posiblemente corresponda a lactosa residual. Por lo tanto, la cepa convirtió eficientemente la mezcla melaza y suero de leche en la obtención de ScAGal. Además, el transporte molecular es un factor determinante del metabolismo, la glucosa y la fructosa utilizan el mismo sistema de difusión facilitado pero la glucosa tiene una afinidad predominante, inhibiendo competitivamente el transporte de fructosa lo que explica la prevalencia residual de fructosa al final de la fermentación (Rodrigues et al., 2015).

Se ha visto que un mutante *K. lactis* en el gen *GAL1*, que codifica una proteína bifuncional implicada en la actividad galactoquinasa y en la inducción del regulón lac/gal que controla el promotor *LAC4*, puede reducir el consumo de galactosa como fuente de carbono conservando su capacidad para inducir la expresión de *LAC4* en presencia de galactosa o lactosa (Van Ooyen et al., 2006). Creando este fenotipo en la

cepa KGM21, se podría mejorar la expresión de ScAGal en respuesta a la galactosa proporcionada tras la hidrólisis de lactosa del suero y la rafinosa de la melaza. De esta manera, la cepa sólo utilizaría como fuente de carbono, la glucosa y fructosa liberada durante el crecimiento de los cultivos.

Tabla 8. Análisis de HPLC de la conversión de sustratos a productos durante el cultivo en biorreactor.

Analitos	Unidades	tR	Tiempo de cultivo					
			0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Rafinosa	g/L	7.17 ± 0.02	5.94	1.22	2.50	2.98	2.80	2.88
(Sac+Lac) ^a	g/L	8.32 ± 0.02	84.18	1.42	1.42	1.46	1.50	1.52
Glucosa	g/L	10.12 ± 0.11	12.48	2.04	0.00	0.00	0.00	0.00
Galactosa	g/L	11.13 ± 0.03	1.02	0.40	0.50	0.52	0.52	0.54
Fructosa	g/L	12.31 ± 0.19	12.72	6.08	0.76	0.66	0.84	0.76
Glicerol	g/L	13.60 ± 0.09	0.26	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00
Etanol	g/L	14.34 ± 0.13	0.00	22.70	5.04	4.26	4.30	4.48
Sorbitol	g/L	15.95 ± 0.01	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

^a(Sac+Lac), la concentración de sacarosa y lactosa se determinó como un único analito dado el solapamiento de los tiempos de retención (tR), 8.21 y 8.62, respectivamente. Se utilizó como patrón externo concentraciones comprendidas entre 4 – 0.06 mg/mL de una mezcla de rafinosa, sacarosa, glucosa, galactosa, fructosa, glicerol y etanol. Tanto a las muestras como al patrón externo se le añadió 1 mg/mL sorbitol empleado como patrón interno. Los datos presentados son el promedio de tres réplicas técnicas (Media ± DS).

Por otro lado, se han calculado los parámetros de productividad (Q_p) y rendimiento de ScAGal sobre sustratos (Y_p) en los cultivos llevados cabo en YPL, YPW y medio optimizado (Tabla 9). En el biorreactor, la Q_p fue de 0.158 U/h, valor muy superior al resto de cultivos, y alcanzó un Y_p similar al obtenido en YPW con matraz agitado. La mejora observada en biorreactores se debe, probablemente, a su sistema cerrado que permite el control de la aireación, agitación y temperatura, favoreciendo el crecimiento celular y el rendimiento del producto final. Además, el cultivo en matraz utiliza agitación orbital mientras que en el biorreactor la agitación es mecánica, permitiendo un suministro continuo de oxígeno que da lugar a un rendimiento final superior (Luna et al., 2015). Por lo tanto, el medio optimizado compuesto principalmente por melazas de remolacha y suero de leche, resultó ser un medio barato y sostenible muy recomendado para la producción heteróloga de ScAGal a partir de la cepa de *K. lactis* KGM21.

Tabla 9. Parámetros de producción de ScAGal durante el cultivo de la cepa KGM21

Medio/Cultivo	U/mL	$Y_{p/s}$	Q_p
YPL/matraz	1.22 ± 0.20	0.061	0.010
YPW/matraz	4.07 ± 0.22	0.203	0.034
Medio optimizado/matraz	6.08 ± 0.18	0.061	0.051
Medio optimizado/Biorreactor	18.93 ± 1.26	0.190	0.158

El rendimiento sobre sustratos se define como la actividad generada (U/mL) por gramo de sustrato disponible en el medio de producción ($Y_{p/s}$ = Actividad/g) y la productividad volumétrica como la actividad por litro y tiempo total de horas de cultivo (Q_p = Actividad/L.h). El periodo de tiempo elegido para realizar los cálculos de los parámetros fue de 120 h de cultivo. YPL (1 % extracto de levadura, 2 % bactopectona, 2 % lactosa); YPW (1 % extracto de levadura, 2 % bactopectona, 2 % suero de leche); medio optimizado (1 % extracto de levadura, 7 % melaza de remolacha, 3 % suero de leche).

CAPÍTULO 4

Inmovilización de la enzima α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* obtenida de medios de cultivo basados en residuos agroindustriales

Resumen

La naturaleza glicoproteica de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ScAGal) permitió la purificación-inmovilización en soportes activados con grupos reactivos a través de un mecanismo de oxidación de las glicosilaciones superficiales de la enzima con periodato de sodio. Se aplicaron diferentes estrategias de inmovilización sobre preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas, ScAGAL y ScAGALHis (fusionada a una etiqueta Poli-His), combinando condiciones de oxidación alcalinas con 4 mM de periodato y la unión a diferentes soportes monobifuncionalizados con grupos amino y/o grupos IDA unidos al metal quelato cobalto. Aunque, los derivados inmovilizados presentaron actividades expresadas cercanas al 80 % con rendimientos de inmovilización altos (normalmente más del 80 %), todas las preparaciones mantuvieron la estabilidad de la enzima soluble. En este trabajo se han obtenido diferentes derivatizados de la enzima que destacan por la importancia de la purificación selectiva, reutilización y recuperación industrial en función de las necesidades de la aplicación biotecnológica dirigida.

1. Introducción

En la biotecnología industrial de enzimas, además de la importancia de la actividad específica de la reacción que se lleve a cabo, la recuperación, reutilización y estabilidad operativa del preparado enzimático, requieren ser consideradas para que el proceso catalítico sea económicamente viable (Mateo et al., 2007). La unión de la enzima (biocatalizador) a un soporte preexistente mediante técnicas de inmovilización enzimática, permite obtener un biocatalizador insoluble, fácilmente recuperable del medio de reacción, alargando su vida útil en siguientes ciclos. Además, la posibilidad de eliminar el biocatalizador, mejora el control de las condiciones de reacción en el reactor, obteniendo un producto final de mayor calidad, libre de proteína contaminante, imprescindible en aplicaciones dirigidas al procesamiento de alimentos. Sin embargo, para permitir esta reutilización, la enzima soluble necesita ser muy estable o estabilizarse durante el proceso de inmovilización, y esto puede lograrse fijándola dentro de un soporte sólido poroso. Una gran variedad de materiales han sido utilizados como soporte adecuado para la inmovilización de enzimas que además, debe evitar la agregación enzimática o desnaturalización y mantener la conformación nativa de la enzima (Brena and Vieira-Batista, 2006).

La mayoría de las estrategias de inmovilización implican enlaces fuertes, entre los grupos reactivos de un soporte activado y los residuos situados en la superficie de la enzima, que ofrecen un alto grado de rigidez estructural (Mateo et al., 2007). De esta manera, se forma una unión covalente multipunto que se traduce, normalmente, en una mayor estabilización enzimática, ya que el biocatalizador inmovilizado será más

resistente a cualquier tipo de distorsión (calor, pH extremos, disolventes orgánicos). Sin embargo, el contacto entre grupos unidos a estructuras rígidas, puede provocar impedimentos estéricos durante el acceso del sustrato al centro activo de la enzima, modificando las propiedades catalíticas de la misma. También, dado que la unión enzima-soporte es irreversible, no permite la recuperación del soporte después de la inactivación de la enzima y esto obliga a tener en cuenta el costo del procedimiento de inmovilización. Uno de los soportes más utilizados es el de glioxil agarosa, el cual, contiene grupos aldehído estables que dirigen la inmovilización a través de la zona/s de la superficie de la proteína más rica en grupos amino (aportados por residuos Lys), lo que permite una intensa reacción multipunto enzima-soporte (Mateo et al., 2006).

Por otro lado, la disponibilidad de la enzima pura es esencial para la preparación de un biocatalizador inmovilizado muy activo, ya que incrementa la superficie del soporte ocupada por la misma, y evita reacciones secundarias catalizadas por otras enzimas contaminantes. La cromatografía de afinidad de metal quelado inmovilizado (IMAC) es muy utilizada en la purificación de proteínas de fusión con etiquetas Poli-His, y cuando la adsorción de la proteína Poli-His sobre el soporte quelado es suficientemente fuerte, puede permitir purificar e inmovilizar en un solo paso (Beitle and Ataa, 1997). También, como puede ser un proceso reversible y provocar la liberación no deseada de metales a los medios de reacción, existe la posibilidad de acoplarlo a una inmovilización covalente mediante soportes bifuncionales (Pessela et al., 2003). Además, el diseño de un proceso de inmovilización altamente selectivo, reduciría los problemas de tiempo, coste, inactivación enzimática, residuos, etc., derivados del paso previo de la purificación de la enzima. Uno de los métodos más adecuados para la inmovilización industrial de proteínas se basa en soportes epoxi, los cuales pueden ser utilizados para vincular la inmovilización a la purificación. Dependiendo de las condiciones de preparación, estos soportes admiten diversas modificaciones con diferentes grupos reactivos que permiten, primero, adsorber físicamente proteínas para después establecer con éstas, enlaces covalentes muy estables (Mateo et al., 2000).

Como se ha comentado en capítulos anteriores, la enzima α -galactosidasa de *S. cerevisiae* (ScAGal) permite la eliminación de RFOs, y también, muestra una posible actividad de síntesis de α -GOS (condiciones óptimas no abordadas durante esta Tesis Doctoral), ambas aplicaciones muy utilizadas en la industria de alimentos y fármacos. Sin embargo, aunque la capacidad catalítica sea satisfactoria, el uso de la enzima inmovilizada, frente a la soluble, puede suponer una gran ventaja añadida para dirigir su uso a nivel industrial, por todas las posibilidades mencionadas que ofrece. También, la mejora genética de cepa de *S. cerevisiae* y el uso de un sistema de expresión *en K. lactis* permitió conseguir la mayor producción de ScAGal extracelular descrita hasta el momento, empleando residuos de difícil reciclaje (melazas de remolacha, lactosuero).

A partir de dichas cepas recombinantes, se obtuvo la proteína heteróloga ScAGal, sin y con la presencia de una etiqueta Poli-His, parcialmente purificada del medio de producción. Por todo ello, en este trabajo se pretende valorar diferentes estrategias de inmovilización de esta enzima, utilizando soportes mono y bifuncionales, como propuesta de mejora de la estabilidad operacional, reutilización y recuperación industrial.

Este trabajo de investigación fue financiado por el programa de ayudas para estancias predoctorales INDITEX-UDC 2016 y realizado en el Laboratorio de Biocatálisis de la Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (Chile).

2. Metodología

2.1. Materiales

La agarosa con un grado de entrecruzamiento del 6 % (*Sepharose 6B-CL*) fue proporcionada por *GE Healthcare*. El monohidrato de sal disódica de ácido iminodiacético fue de *Fluka* y el sulfato de cobre fue de *Panreac*. Los reactivos borohidruro de sodio, glicidol e imidazol y el sustrato PNPg, procedían de *Sigma-Aldrich* y el reactivo metaperiodato sódico de *Merck*. Las membranas de diálisis fueron proporcionadas por *SpectraPor*. Todos los demás productos químicos utilizados fueron de grado analítico suministrados por diferentes proveedores comerciales.

2.2. Obtención del preparado enzimático

La enzima α -galactosidasa de *S. cerevisiae* (ScAGal) sin modificar y fusionada a una etiqueta de 6 His, fue obtenida de cultivos basados en melazas de remolacha y/o suero de leche con las cepas recombinantes BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 y KGM21, respectivamente, según se describe en capítulos anteriores. El cultivo fue centrifugado (7000 r.p.m, 10 min, 4 °C) y el sobrenadante recuperado, conteniendo la enzima extracelular, fue dializado y concentrado por filtración tangencial (*TFF, Millipore*) en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4 y NaCl 150 mM. La enzima parcialmente purificada, así obtenida, se congeló en nitrógeno líquido y fue liofilizada (Congelación: - 40 °C, 0.010 mBar; Sublimación: 25 °C, 0.010 mBar, 24 h; *LypoQuest de Telstar*) para facilitar el transporte y el manejo durante los ensayos de inmovilización del preparado enzimático. De esta manera se obtuvieron dos preparados de la enzima, nombrados de ahora en adelante como ScAGAL y ScAGALHis, que fueron utilizados en los experimentos de inmovilización enzimática.

2.3. Preparación de matrices de agarosa con diferentes grupos reactivos

La agarosa utilizada en la preparación de los soportes fue previamente lavada, al menos tres veces, con agua destilada. Todos los pasos de lavado se realizaron con abundante agua destilada utilizando un crisol filtrante conectado a una bomba de vacío mediante un matraz kitasato, y las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Una vez obtenido el soporte funcionalizado, después del lavado mediante filtrado a vacío, fue conservado seco a 4 °C hasta su uso en el ensayo de inmovilización.

Glioxil-agarosa. La preparación del soporte se llevó a cabo según el protocolo descrito previamente (López-Gallego et al., 2013), utilizando la cantidad correspondiente de periodato de sodio después de la activación completa con glicidol. Se resuspendieron 10 g de agarosa en 80 ml de una solución acuosa con 1 N NaOH y 471 mM NaBH₄ a 4°C, y manteniendo la suspensión en frío, se añadieron mediante goteo 36 mL de glicidol (2,3-Epoxy-1-propanol). Esta mezcla se incubó durante 16 h y después, se lavó y se suspendió en 150 mL de NaIO₄ 10 mM incubando 2 h, ambas reacciones se mantuvieron con agitación en palas. La presencia de aldehídos se determinó cualitativamente mezclando un poco de soporte (1 ó 2 mg) con el reactivo de *Schiff*, cuya reacción positiva permite visualizar el soporte de color violeta. La determinación cuantitativa de grupos aldehídos se realizó a través de la concentración de periodato añadido, ya que cada mol de este reactivo genera un mol de grupos aldehído (Mateo et al., 2005).

Agarosa-epoxi. La activación del soporte de agarosa con grupos epoxi se realizó según el protocolo descrito previamente (Mateo et al., 2013). 10 g de agarosa fueron suspendidos en 60 mL de una solución acuosa que contenía 54.7 g/L de NaOH, acetona al 26.6 % (v/v) y 3.8 g/L de NaBH₄ a 4°C. Después, se añadió epiclorohidrina (EPI) para alcanzar una concentración final de 185 g/L y la mezcla se incubó durante 16 h con agitación en palas. Este soporte agarosa-epoxi fue modificado con diferentes grupos reactivos durante la preparación de los soportes que se detallan a continuación, utilizando una relación 1:10 (p/v) entre el soporte y la solución reactiva.

Agarosa-amino. El soporte agarosa-epoxi se incubó en presencia de etilendiamina (EDA) 2 M a pH 10.05 durante 16 h con agitación en rodillo. La densidad superficial de grupos aldehído o amino introducidos en un soporte es proporcional a la cantidad de periodato consumido por el mismo, por lo tanto, se estimó que el grado de modificación de este soporte era igual que la concentración de grupos aldehído en el soporte glioxil-agarosa.

Agarosa-Co y Agarosa-NH₂-Co. El soporte agarosa-epoxi se incubó con la solución reactiva IDA que contiene borato de sodio 0.1 M/ácido iminodiacético 2 M a pH 8.5, durante 5 h con agitación en rodillo. El soporte así obtenido, agarosa-epoxi-IDA, fue modificado mediante la incubación con H₂SO₄ 0.1 M o EDA 2 M a pH 10.05 durante 16 h con agitación en rodillo, para hidrolizar los grupos epoxi sobrantes o bien incorporar grupos amino al soporte, respectivamente. Después, en ambos casos, se incubó con una solución acuosa de 20 mg/mL de CoSO₄ durante 30 min para obtener, finalmente, los soportes agarosa-Co y agarosa-NH₂-Co. El grado de modificación con grupos IDA y amino, se cuantificó mediante titulación de los grupos epoxi presentes en los soportes agarosa-epoxi y agarosa-epoxi-IDA. Para ello, cada soporte fue previamente hidrolizado con H₂SO₄ 100 mM, seguido de la oxidación con NaIO₄ 10 mM, tras un paso de lavado. Ambas reacciones se incubaron durante 2 h en agitación con rodillo. La concentración de grupos epoxi se cuantificó mediante el consumo de periodato de los soportes hidrolizados tras la oxidación. La concentración de grupos IDA y amino se determinó por la diferencia de epóxidos entre ambos soportes hidrolizados y la diferencia entre epóxidos iniciales y grupos IDA, respectivamente.

2.4. Microscopía

Se utilizó un microscopio óptico (*Nikon Eclipse 50*) para llevar a cabo la visualización de las matrices de agarosa que conforman el soporte de inmovilización. El análisis microscópico del tamaño de la partícula se realizó empleando el *software NIS-Elements D (Nikon)*.

2.5. Métodos

Todos los experimentos se realizaron por duplicado y los resultados se presentan como su valor medio con un error experimental que no superó el 5 %.

2.6. Inmovilización de α -galactosidasa en matrices de agarosa

La preparación enzimática fue dializada, previamente, en tampón fosfato de sodio 5 mM pH 7 y después, la enzima soluble fue ajustada en la solución tampón correspondiente a un volumen final de 10 mL (conteniendo de 15 - 20 U). En agarosa-Co, la solución de enzima se preparó en tampón de afinidad (tampón 100 mM fosfato de sodio pH 7, 500 mM NaCl, 25 mM imidazol). Cuando se usó agarosa-amino, la enzima soluble fue incubada con 4 mM NaIO₄ durante 2 h a 4 °C y agitación suave, dializada y después esta solución de enzima oxidada se ajustó con tampón bicarbonato 20 mM pH 9. La inmovilización en soporte agarosa-NH₂-Co se llevó a cabo mediante dos estrategias diferentes utilizando una combinación de las condiciones descritas anteriormente. Por un lado, la enzima se incubó en tampón de afinidad, y después de filtrar y lavar el derivado sólido, éste se oxidó con periodato de sodio y se

ajustó a pH 9. Por otro lado, se preparó primero la solución de enzima oxidada en tampón de afinidad y tras ser fijada al soporte, fue ajustada a pH 9. Por último, en el soporte glioxil-agarosa, la solución de enzima se preparó en tampón bicarbonato 100 mM pH 10.

Todos los soportes fueron lavados, previamente, en el tampón de inmovilización correspondiente mediante filtrado a vacío. La suspensión de inmovilización se preparó mezclando 9 mL de la solución de enzima con 1 g de los diferentes soportes, y el resto (1 mL) se utilizó como referencia (blanco) para ensayar la estabilidad de la enzima soluble en condiciones de inmovilización. En todos los casos, la mezcla de inmovilización se agitó en palas a 4 °C y periódicamente, se retiraron muestras homogéneas de la suspensión (utilizando puntas de pipeta recortadas) y el sobrenadante, y se analizó la actividad α -galactosidasa residual. Para detener el proceso de inmovilización, las suspensiones con los soportes glioxil-agarosa, agarosa-amino y agarosa-NH₂-Co, se redujeron añadiendo NaBH₄ hasta alcanzar una concentración final de 1 mg/mL. Finalmente, el derivado sólido se separó del sobrenadante y se lavó por filtrado a vacío, y una vez seco, se conservó a 4 °C hasta su uso en experimentos adicionales. El derivado inmovilizado fue suspendido en agua destilada (1/10, p/v) y se midió la actividad α -galactosidasa.

El rendimiento de inmovilización (R_i), porcentaje de enzima inmovilizada, se definió como la diferencia entre la actividad inicial y la actividad del sobrenadante al final del proceso en relación con la actividad inicial. El rendimiento en actividad retenida (R_{AR}), se definió como la diferencia entre la actividad de la suspensión y el sobrenadante en relación con la actividad inicial del proceso. El rendimiento en actividad expresada (R_{AE}), se definió como la relación de la actividad derivada del catalizador inmovilizado respecto a la actividad ofrecida por el catalizador.

2.7. Ensayos de actividad enzimática y concentración de proteína

La actividad α -galactosidasa se determinó según una modificación del método descrito previamente (Ryan et al., 1998). La reacción se realizó añadiendo 50 μ L de muestra a 500 μ L de una solución de PNPg 5 mM en tampón citrato-fosfato 0.1 M pH 4, a 40 °C y con agitación. A dos intervalos de tiempo consecutivos, se retiraron 50 μ L de la mezcla de reacción que se detuvo añadiendo 1 mL de Na₂CO₃ 0.1 M y se midió el *p*-nitrofenol liberado a 400 nm (coeficiente de extinción molar, 18.20 mmol⁻¹.cm⁻¹) con un espectrofotómetro con agitación magnética. El análisis de actividad invertasa se realizó incubando la muestra con sacarosa 100 mM en tampón acetato 50 mM pH 5 durante 10 min, a 40 °C y con agitación. La reacción se paró por ebullición y se determinó el azúcar reductor generado mediante el método del DNS (Miller, 1959). La unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera un μ mol de

producto por minuto en las condiciones de ensayo. La concentración de proteína se determinó por el método de *Bradford* (Bradford, 1976) y se utilizó albúmina de suero bovino como proteína de referencia.

2.8. Caracterización de grupos aldehídos formados

La concentración de grupos aldehído por gramo de soporte se determinó mediante una valoración por retroceso de la cantidad de iones periodato remanentes tras la oxidación, que fue cuantificado espectrofotométricamente utilizando una solución de 10 % KI saturada con NaHCO₃ (Mateo et al., 2013). Para ello, se mezcló 1 mL de KI al 10% con 1 mL de NaHCO₃ saturado y después de añadir 100 µL de la muestra a medir, se registró la absorbancia a 450 nm y se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{mol aldehído/g soporte} = \frac{V_{[\text{NaOI}_4]} \times (C_{[\text{NaOI}_4]} - C_{[\text{NaOI}_4]} \times A_{450,\text{muestra}} / A_{450,\text{blanco}})}{\text{masa agarosa funcionalizada}_{(g)}}$$

donde; V y C son, respectivamente, el volumen y la concentración de la solución de oxidación inicial y $A_{450,\text{muestra}} / A_{450,\text{blanco}}$ es la relación de absorbancias entre el sobrenadante recogido al final de la oxidación y la solución de oxidación inicial (blanco de reacción).

2.9. Desorción de α-galactosidasa de los diferentes biocatalizadores inmovilizados

La estabilidad de los enlaces enzima-soporte fue determinada mediante el estudio de las condiciones de desorción de la enzima a partir de los diferentes derivados inmovilizados obtenidos. Los derivados en agarosa-Co y agarosa-NH₂-Co se suspendieron en tampón 100 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 7; mientras que en glioxil-agarosa y agarosa-amino se realizó en tampón 100 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, pH 7. La mezcla de reacción consistió en una relación 1/10 (p/v) y después de 1 h de incubación a temperatura ambiente con agitación en rodillo, se analizó la actividad α-galactosidasa en la suspensión y el sobrenadante.

2.10. Estabilidad térmica de los biocatalizadores inmovilizados

El estudio de la estabilidad térmica de los diferentes derivados inmovilizados obtenidos, se realizó a 60 °C con 0.5 U/mL de enzima soluble o el derivado suspendido en agua destilada (1/10, p/v). A diferentes tiempos de incubación, se retiraron muestras de la enzima soluble y de la suspensión y se determinó la actividad α-galactosidasa residual de las mismas.

3. Resultados

3.1. Estrategias de obtención de los derivados inmovilizados ScAGAL y ScAGALHis

Las matrices de agarosa presentan grandes áreas con grupos hidroxilo que son modificados con diferentes grupos reactivos para preparar los soportes mono y bifuncionales que se muestran en la figura 1.

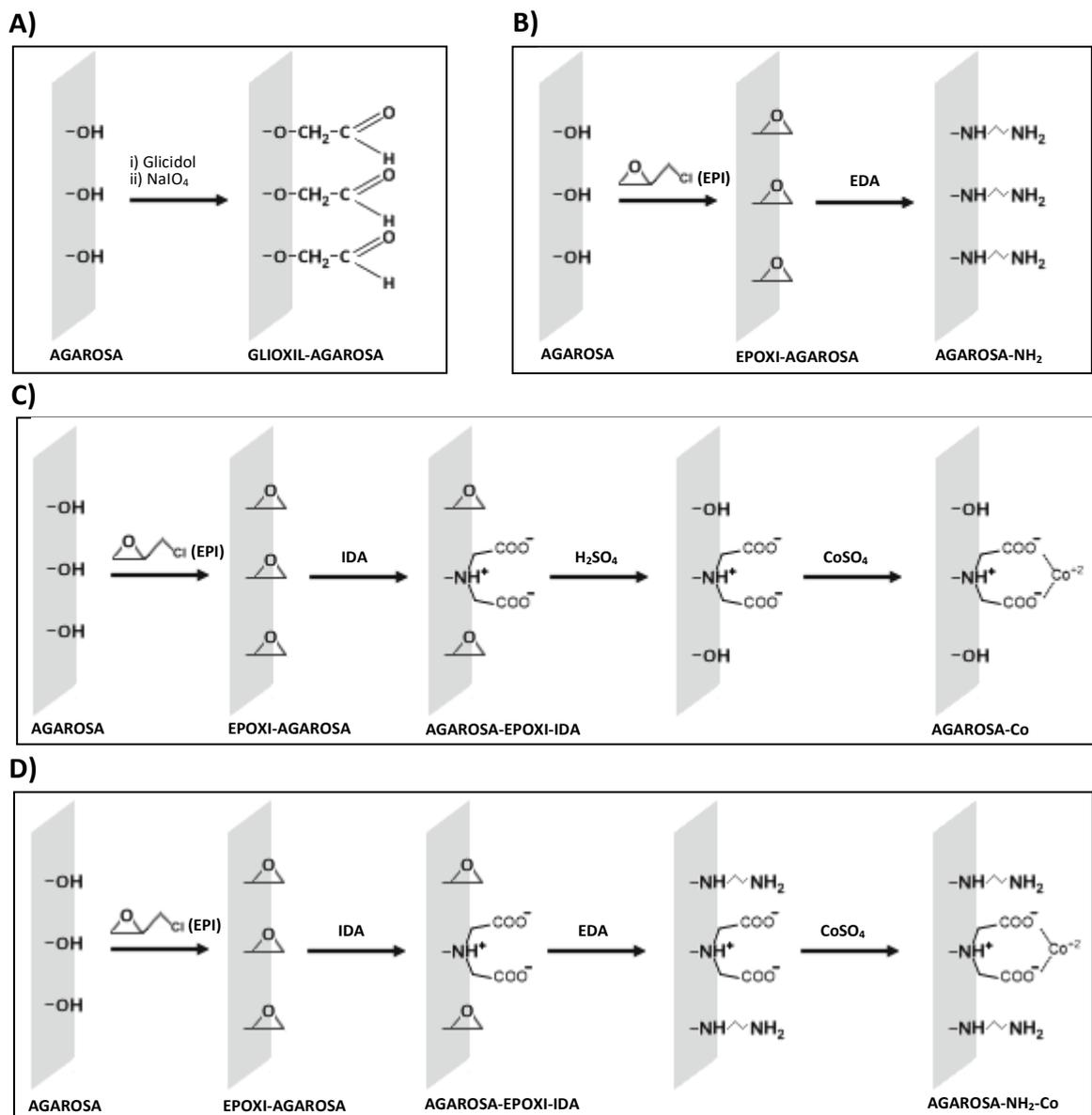


Figura 1. Activación de soportes de agarosa monofuncional (A-B-C) y bifuncional (D). Los grupos hidroxilo de la matriz de agarosa son activados con glicidol seguido de la oxidación con NaIO₄ o con EPI para obtener grupos glioxilo o epóxido, respectivamente. El soporte glioxil-agarosa contiene grupos aldehídos reactivos (A). Todos los grupos epóxido son modificados con EDA para obtener el soporte agarosa-NH₂ (B). La modificación parcial de grupos epóxido con IDA y posterior reacción con H₂SO₄ o EDA, para hidrolizar epóxidos sobrantes o incorporar grupos amino, seguido de la incubación con CoSO₄ permite obtener los soportes agarosa-Co (C) y agarosa-NH₂-Co (D), respectivamente. Las condiciones de las reacciones se describen en la metodología.

Los grupos amino de las Lys son los residuos más utilizados para llevar a cabo la inmovilización de una enzima en soportes glioxilo, los cuales mejoran la estabilidad de proteínas mediante unión covalente multipunto en comparación con otros soportes (López-Gallego et al., 2013). Estos soportes activados con grupos glioxilo contienen grupos aldehído aislados de la superficie del mismo a través de brazos espaciadores muy cortos (soporte-O-CH₂-CHO) que permiten fijar las posiciones relativas de los grupos implicados en la inmovilización, aumentando la rigidez de la proteína (Figura 1A). En la figura 2 se muestra una distribución adecuada de los residuos de Lys sobre la superficie de la enzima ScAGal durante la visualización de la estructura cuaternaria. Es por ello, que la primera estrategia que se decidió utilizar fue la inmovilización de la ScAGal mediante soportes glioxil-agarosa que dirigen la unión covalente a través de la región enzimática con mayor presencia de Lys.

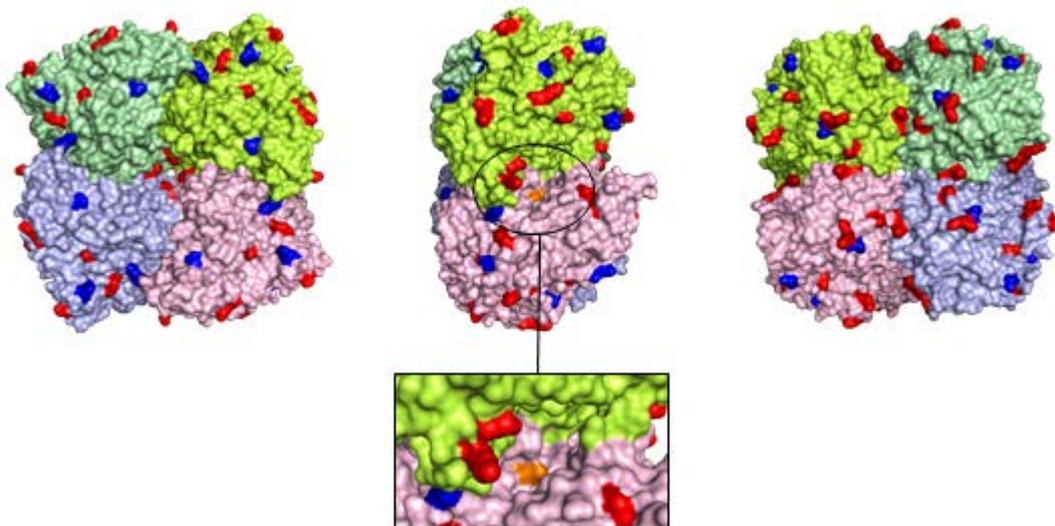


Figura 2. Distribución de Lys y puntos de glicosilación en la superficie de la estructura cuaternaria de la ScAGal. La representación esquemática desde tres vistas diferentes de la superficie del tetrámero muestra las posiciones de los residuos de Lys (rojo) y de los puntos de glicosilación (azul). El cuadro resalta el centro catalítico con los residuos implicados en el reconocimiento del sustrato (naranja). La distribución electroestática de los residuos fue calculada con PyMOL.

Por otro lado, la ScAGal es una enzima tetramérica altamente glicosilada cuyo contenido en polisacáridos representa el 35 % de la masa molecular total (Fernandez-Leiro et al., 2010), donde los puntos de glicosilación están distribuidos por toda la superficie de la proteína (Figura 2). Los residuos de azúcar de glicoproteínas pueden ser modificados con periodato, el cual rompe el anillo del azúcar entre los enlaces carbono-carbono con hidroxilos adyacentes que son oxidados a aldehídos reactivos (Hermanson, 2008). De esta manera, las glicoproteínas pueden ser conjugadas a través de los grupos aminos de otras proteínas, tales como anticuerpos, descrito con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) (Nakane and Kawaoi, 1974). Varias investigaciones de la HPR han establecido un óptimo de la reacción de oxidación con

4-8 mM periodato durante un máximo de 30 min, a pH alcalino (7.2 - 9.5) y en presencia de un agente reductor para estabilizar los enlaces. En este trabajo, se utilizó esta metodología para oxidar la ScAGal con 4 mM de periodato bajo condiciones alcalinas (Figura 3) y así, poder inmovilizarla a un soporte funcionalizado con grupos amino (Figura 1B), como segunda estrategia alternativa. En la figura 4 se muestra el mecanismo para llevar a cabo la inmovilización de la ScAGAL en soportes glioxil-agarosa y agarosa-amino.

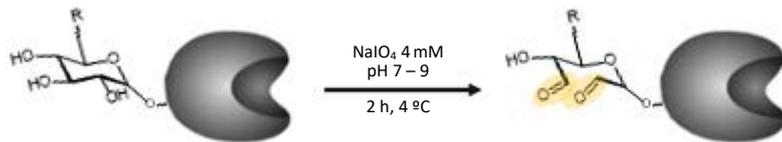


Figura 3. Mecanismo de oxidación de la ScAGal con periodato. Los polisacáridos de la glicoproteína son oxidados con periodato para producir aldehídos reactivos con aminos. El anillo representa un residuo de glucosa que en presencia de periodato se abre por la rotura del enlace carbono-carbono con hidroxilos adyacentes generando dos grupos aldehídos (amarillo).

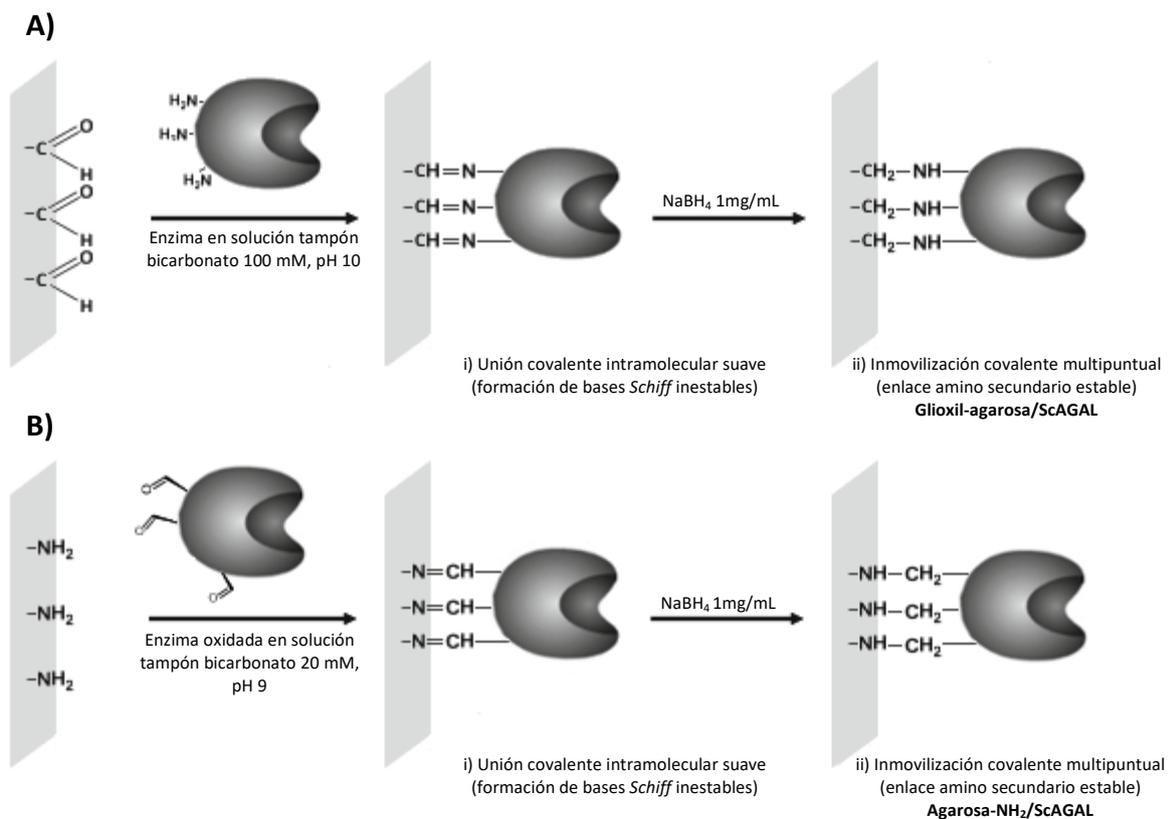


Figura 4. Mecanismo de inmovilización de la ScAGAL en glioxil-agarosa (A) y agarosa-NH₂ (B). La unión de la enzima al soporte activado permite la formación de bases Schiff inestables entre grupos aldehído y amino que se convierten en enlaces amino secundario estables mediante la reducción con NaBH₄. Los grupos glioxilo del soporte glioxil-agarosa se unen a grupos amino de las Lys superficiales de la enzima (A), mientras que la unión a los grupos amino del soporte agarosa-NH₂ es a través de los grupos aldehído proporcionados por la oxidación previa de los carbohidratos de la enzima (B), ambos promueven una inmovilización covalente multipuntual irreversible. ScAGAL, preparación enzimática obtenida de cultivos en melaza de remolacha a partir de la cepa *S. cerevisiae* deficiente en invertasa (BJ3505Δ*suc2*/YEp*MEL1*).

En presencia de condiciones alcalinas, estos soportes altamente activados (145 μmol de grupos aldehídos ó aminos por gramo de soporte) deberían promover una inmovilización rápida e irreversible a través de enlaces covalentes multipunto. El contacto entre grupos aldehído y amino favorece la formación de bases de *Schiff* inestables que, posteriormente, se convierten en enlaces amino secundario muy estables a través de una reducción con borohidruro.

Asimismo, un procedimiento de oxidación similar fue realizado con la preparación enzimática ScAGALHis (fusionada a una etiqueta poli-His), para permitir la purificación e inmovilización simultánea utilizando un soporte funcionalizado con grupos IDA quelados con Co^{2+} (IDA-Co). Esta técnica de un solo paso, muy ventajosa, puede ser crítica si no se consigue una adsorción fuerte de la enzima al quelante ya que es un proceso reversible, y para superar este problema, se utilizó también un soporte bifuncional con grupos IDA-Co y grupos amino. La preparación de ambos soportes, permitió la introducción de 18 μmol de grupos IDA-Co y/o 78 μmol de grupos amino por gramo de soporte, en los casos indicados (Figura 1C-D). El mecanismo de purificación-inmovilización de la ScAGALHis empleando soportes de agarosa-Co y agarosa-NH₂-Co se describe en la figura 5. La inmovilización en agarosa-Co sigue un procedimiento similar a la técnica cromatográfica IMAC, donde la unión de la enzima al soporte se establece únicamente mediante adsorción física por afinidad al metal quelado (Figura 5A). Sin embargo, cuando se utilizó agarosa-NH₂-Co, una vez adsorbida la enzima al quelato, una incubación a pH alcalino permite que los aldehídos de la enzima oxidada reaccionen con los aminos del soporte formando bases de *Schiff*, y posteriormente, enlaces covalentes, tras la aminación reductiva con borohidruro (Figura 5B-C). Además, en este caso, el derivado inmovilizado fue obtenido mediante dos mecanismos diferentes dependiendo de si la etapa de oxidación con periodato se realizaba sobre un derivado intermediario adsorbido por afinidad (Figura 5B) o sobre la enzima en solución (Figura 5C).

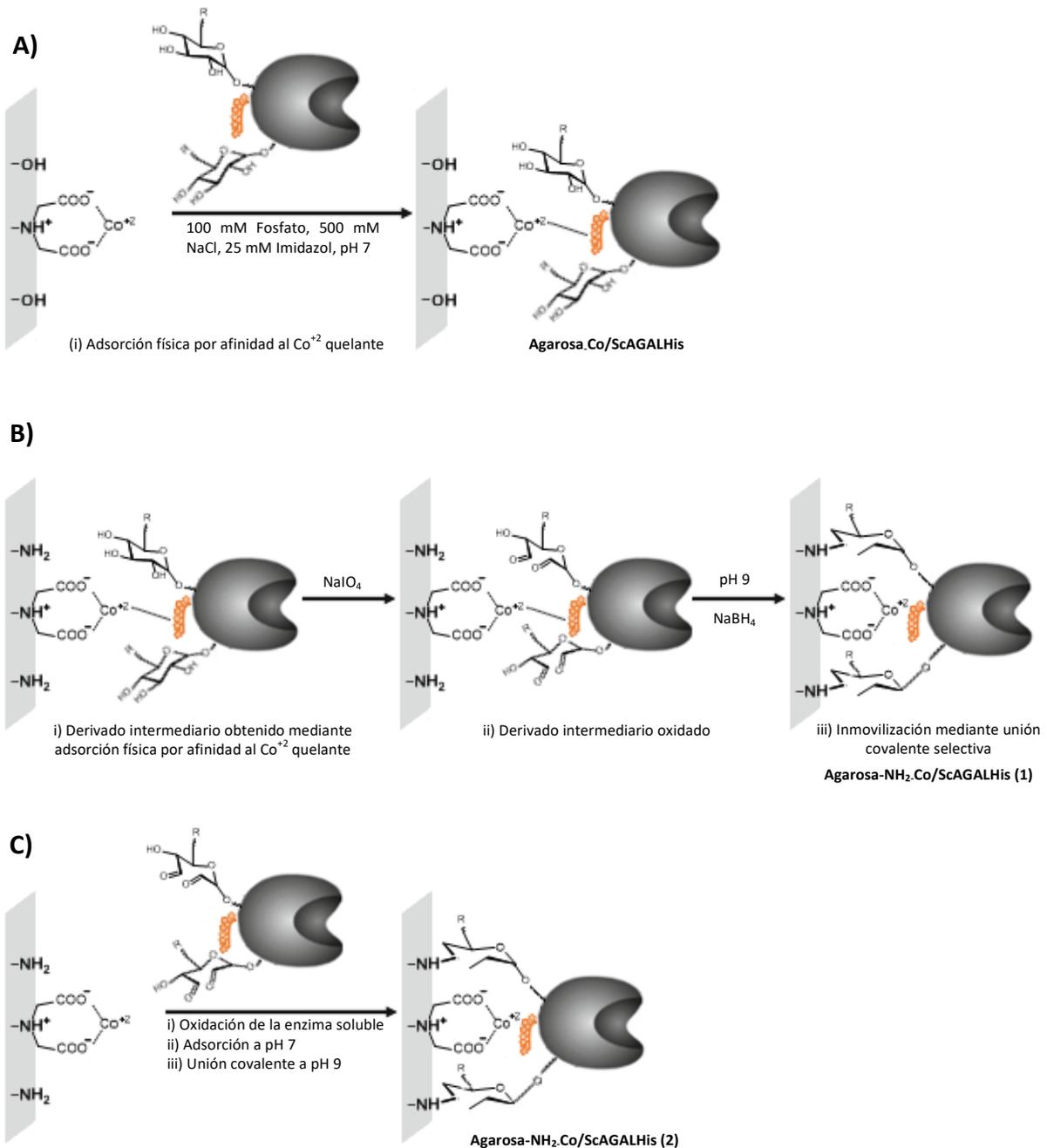


Figura 5. Estrategia de purificación-inmovilización de la ScAGALHis en agarosa-Co (A) y agarosa-NH₂-Co (B-C). La adsorción selectiva de proteínas marcadas con etiquetas poli-His (naranja) sobre el quelato metálico permite la purificación e inmovilización por afinidad (A). Sólo las proteínas adsorbidas reaccionan con los grupos amino para alcanzar una unión covalente multipunto estable mediante la oxidación previa del derivado adsorbido (B) o de la enzima soluble (C), permitiendo la purificación e inmovilización irreversible en un solo paso. Las condiciones de las reacciones se describen en la metodología. ScAGALHis, preparación enzimática obtenida de cultivos en melaza de remolacha y lactosuero a partir de la cepa *K. lactis* KGM21.

3.2. Inmovilización de las preparaciones enzimáticas ScAGAL y ScAGALHis

En la figura 6 se muestra la tasa de inmovilización de la ScAGAL en soportes glioxil-agarosa y agarosa-amino. En ambos casos, la enzima soluble es estable en condiciones alcalinas (pH 10), ya que permaneció completamente activa durante todo el proceso, sin embargo, la inmovilización covalente fue despreciable en glioxil-agarosa incluso después de 20 h de incubación. Esto sugiere que las Lys de la superficie de la proteína no pudieron reaccionar con los grupos glioxilos del soporte, posiblemente, debido a impedimentos estéricos provocados por la alta glicosilación de la proteína. Por el contrario, cuando la enzima es oxidada con periodato e incubada con el soporte agarosa-NH₂, la inmovilización se produjo completamente en apenas 1 h. Además, aunque la enzima posea puntos de glicosilación cercanos al sitio catalítico, los polímeros de carbohidrato actúan como brazos espaciadores largos que suelen presentar pocos problemas durante el acceso del sustrato al mismo (Hermanson, 2008). Por lo tanto, la oxidación de los residuos de los polisacáridos de esta glicoproteína resultó ser una estrategia exitosa para llevar a cabo una inmovilización de la enzima mediante unión covalente multipuntual.

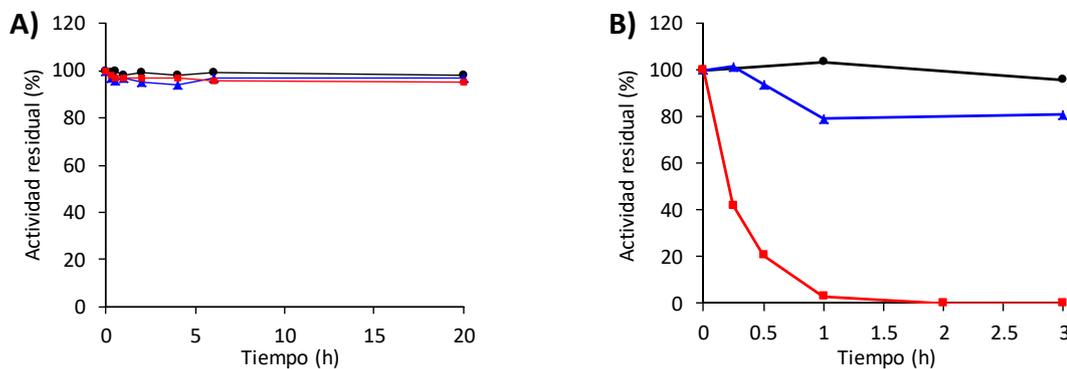


Figura 6. Inmovilización de la ScAGAL en soportes glioxil-agarosa (A) y agarosa-NH₂ (B). La enzima en tampón bicarbonato 100 mM, pH 10, y la enzima oxidada en tampón bicarbonato 20 mM, pH 9, se suspendieron en soportes activados con grupos glioxilo o amino, respectivamente, y se midió la actividad residual de muestras de la suspensión (azul) y sobrenadante (rojo) a diferentes tiempos de incubación. La disminución de la actividad en el sobrenadante corresponde a la enzima soluble que ha sido inmovilizada sobre el soporte. La enzima soluble sin soporte se empleó como control de referencia (negro). ScAGAL, preparación enzimática obtenida de cultivos en melaza de remolacha a partir de la cepa *S. cerevisiae* deficiente en invertasa (BJ3505Δ*suc2*/YE*pMEL1*).

La inmovilización de ScAGALHis fue diseñada en soportes funcionalizados con quelatos metálicos con el fin de valorar la capacidad de purificación-inmovilización en un solo paso del preparado enzimático parcialmente purificado. Se prepararon soportes con alta densidad de grupos IDA unidos a cobalto como metal quelante (18 μmol de grupos IDA-Co por gramo de soporte) por mostrar rendimientos de inmovilización por adsorción más altos en comparación con otros metales (Ardao et al., 2006). Además, a uno de estos soportes se le incorporaron grupos amino para facilitar una unión estable mediante enlaces covalentes con los grupos aldehídos

generados tras la oxidación de la enzima con periodato, dados los resultados de inmovilización alcanzados anteriormente con la enzima sin etiqueta Poli-His. Por otro lado, la inmovilización de la enzima en un soporte agarosa-NH₂ permitió valorar el proceso de purificación. En la figura 7 se describe el seguimiento de inmovilización de la enzima que resultó ser, en todos los casos, satisfactorio con algunas diferencias dependiendo del tipo de soporte mono-bifuncional y del momento de realización de la etapa de oxidación. Durante la etapa de adsorción al metal quelato, la enzima soluble es completamente estable, como cabría esperar utilizando las condiciones de purificación de la proteína mediante IMAC, descrita anteriormente en el capítulo 1. Mientras que se observó una pérdida del 15 % de la actividad residual que coincide con la etapa de formación de enlaces covalentes bajo condiciones alcalinas, como se confirma durante la inmovilización en agarosa-NH₂ (Figura 7D). También, se observó un descenso de alrededor del 20 % de actividad que no es retenida en el derivado inmovilizado (Figura 7A-B) debido, posiblemente, a limitaciones difusionales provocadas por las diferencias en la carga enzimática ofrecida (21 U/mL en agarosa-Co y 25.5 U/mL en agarosa-NH₂-Co). Sin embargo, el aumento de la carga ofrecida no parece mostrar limitaciones durante la inmovilización en agarosa-NH₂, ni tampoco con

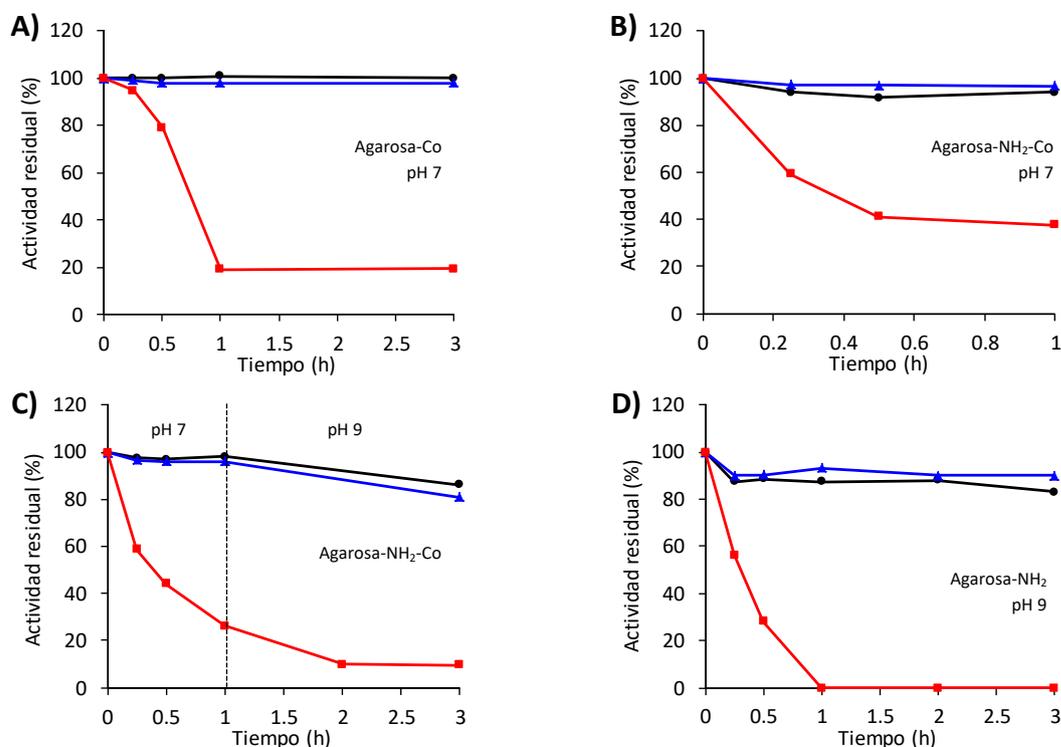


Figura 7. Inmovilización de la ScAGALHis en soportes de agarosa funcionalizada con grupos IDA-Co y/o grupos NH₂. Seguimiento de inmovilización mediante: adsorción por afinidad a pH 7 de la enzima suspendida en Agarosa-Co (A) y en agarosa-NH₂-Co (B), adsorción por afinidad seguido de unión covalente a pH 9 en agarosa-NH₂-Co (C) y unión covalente multipunto en agarosa-NH₂ (D). En los casos C-D, la enzima fue previamente oxidada con periodato. Se recogieron muestras de la suspensión (azul) y sobrenadante (rojo) a diferentes tiempos de incubación, y se midió la actividad residual. La disminución de la actividad en el sobrenadante corresponde a la enzima soluble que ha sido inmovilizada sobre el soporte. La enzima soluble sin soporte se empleó como control de referencia (negro). ScAGALHis, preparación enzimática obtenida de cultivos en melaza de remolacha y lactosuero a partir de la cepa *K. lactis* KGM21.

el soporte agarosa-NH₂-Co ofreciendo hasta 30 U/mL, cuando la etapa de oxidación fue realizada sobre la enzima soluble. Además, durante la oxidación de la enzima con periodato se recuperó alrededor de un 98 % de la actividad, independientemente del momento de aplicación de dicha etapa (dato no mostrado). Por lo tanto, la pérdida de actividad residual observada puede ser debida a una cierta inestabilidad de la enzima oxidada cuando se establecen condiciones alcalinas (Figuras 6B, 7C-D). En la tabla 1 se muestran los resultados de rendimiento de los derivados inmovilizados, ScAGAL y ScAGALHis, obtenidos con los diferentes soportes mono-bifuncionales. El rendimiento de inmovilización, así como la actividad retenida por el derivado, fue mayor con el soporte monofuncionalizado con grupos amino que utilizando soportes bifuncionales. Además, en los derivados inmovilizados DER-1 y DER-5, la enzima no fue desorbida después de la incubación durante 1 h en presencia de altas concentraciones de sal (500 mM). Esto sucedió de manera similar cuando el DER-4 se incubó en presencia de imidazol (500 mM), mientras que con los derivados DER-2 y DER-3, la enzima se desorbió sobre un 60 % y un 39 % de la actividad residual, respectivamente. Esto último demuestra que la reacción intramolecular soporte-proteína tiene lugar si, previamente, la enzima ha sido adsorbida de manera adecuada. En este caso, por lo tanto, un protocolo de inmovilización de la suspensión en dos pasos consecutivos (adsorción a pH 7 más unión covalente intramolecular a pH 9) parece ser más apropiado que la separación previa del derivado inmovilizado por afinidad.

Tabla 1. Rendimiento de derivados de la ScAGAL y ScAGALHis inmovilizados en soportes mono-bifuncionales.

Derivado inmovilizado	Act. ofrecida (U/g soporte)	Act. específica (U/g derivado)	R _i (%)	R _{AR} (%)	R _{AE} (%)	R _{AD} (%)
DER-1: ScAGAL/Agarosa-NH ₂	13 ± 0.42	10 ± 0.97	100	81	77	0
DER-2: ScAGALHis/Agarosa-Co	21 ± 0.15	14 ± 0.45	81	78	66.5	60
DER-3: ScAGALHis/Agarosa- NH ₂ Co	25.5 ± 0.15	20 ± 0.47	62	60	80	39
DER-4: ScAGALHis/Agarosa- NH ₂ Co	30 ± 0.32	25 ± 0.87	90	77	79.5	0
DER-5: ScAGALHis/Agarosa- NH ₂	24.6 ± 0.24	19 ± 0.65	100	95	76	0

R_i, rendimiento de inmovilización (diferencia entre la actividad inicial y la actividad del sobrenadante al final del proceso en relación con la actividad inicial); R_{AR}, actividad retenida (diferencia entre la actividad de la suspensión y el sobrenadante en relación con la actividad inicial del proceso); R_{AE}, actividad expresada (actividad derivada del catalizador inmovilizado respecto a la actividad ofrecida por el catalizador). La actividad específica representa la actividad derivada del catalizador inmovilizado. La enzima desorbida (R_{AD}) es el porcentaje de actividad inicial ofrecido al soporte recuperado después de su desorción. La etapa de oxidación en el DER-3 fue realizada sobre el derivado adsorbido por afinidad, mientras que en DER-4 fue realizada sobre la enzima soluble. ScAGAL y ScAGALHis corresponden a las preparaciones enzimáticas obtenidas a partir de las cepas, *S. cerevisiae* deficiente en invertasa y KGM21, respectivamente.

3.3. Caracterización de los biocatalizadores derivatizados

La visualización microscópica de los biocatalizadores derivatizados muestra que las partículas de agarosa presentan una superficie esférica uniforme y lisa (Figura 8). En todos los casos, se observan 4 tamaños de partícula homogéneos 133 ± 5.59, 114 ± 4.14, 88 ± 5.19 y 56 ± 3.88, siendo los tres primeros los más abundantes.

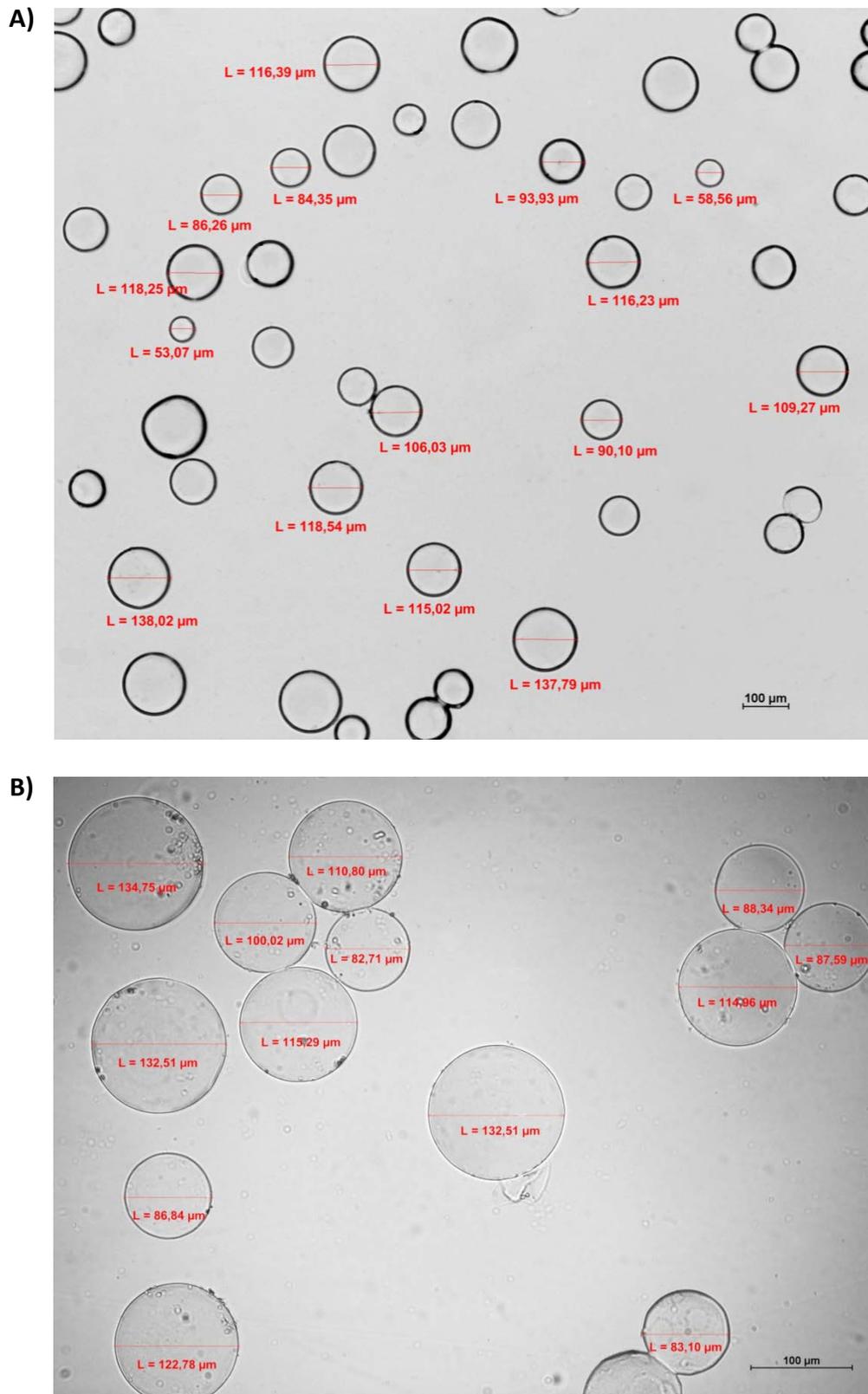


Figura 8. Visualización mediante microscopía óptica del derivatizado en el soporte de agarosa. La imagen general (A) y detallada (B) de una muestra del derivatizado muestra 3 tipos de tamaño de partícula predominantes (escalado realizado con el software *NIS-Elements D*, Nikon).

Por otro lado, se valoró el grado de pureza del biocatalizador inmovilizado dado que las preparaciones enzimáticas utilizadas en este trabajo proceden de cultivos parcialmente purificados de medios de producción constituidos, principalmente, por residuos agroindustriales (melazas de remolacha y suero de leche). Además, durante la producción heteróloga de la proteína recombinante, la ScAGAL se obtuvo a partir de una cepa de *S. cerevisiae* deficiente en actividad invertasa nativa, mientras que la ScAGALHis procede de un sistema de expresión en *K. lactis* que conserva dicha actividad, como se ha expuesto en los capítulos 2 y 3, respectivamente. Se observó, que sólo los derivados inmovilizados en soporte agarosa-NH₂ (DER-1 y DER-4) presentaron carga colorante aportada por los pigmentos del medio de producción de origen, como se muestra en la figura 9. Además, el ensayo de actividad invertasa mostró un grado de pureza en los derivados inmovilizados de ScAGALHis en el siguiente orden ascendente, DER-5 < DER-4 < DER-3 = DER-2 (Tabla 2). Estos resultados confirman que la estrategia de purificación-inmovilización en un solo paso puede ser una alternativa adecuada para la obtención de un derivatizado selectivo libre de actividad invertasa contaminante procedente del medio de producción.



Figura 9. Muestras de la enzima inmovilizada en soportes agarosa-NH₂ y agarosa-Co. 1, agarosa-NH₂; 2, derivado inmovilizado en agarosa-NH₂; 3, agarosa-Co; 4, derivado inmovilizado en agarosa-Co.

Tabla 2. Purificación de los derivados inmovilizados de la ScAGALHis en soportes mono-bifuncionales.

Derivado inmovilizado	Actividad invertasa (U/g derivado)	Pureza (%) ^a
DER-2: ScAGALHis/Agarosa-Co	0	100
DER-3: ScAGALHis/Agarosa- NH ₂ Co	0	100
DER-4: ScAGALHis/Agarosa- NH ₂ Co	2.94	80
DER-5: ScAGALHis/Agarosa- NH ₂	5.62	61

^a La actividad invertasa contaminante del preparado enzimático inicial por gramo de soporte utilizado fue tomada como referencia (14.43 U/g). La etapa de oxidación en el DER-3 fue realizada sobre el derivado adsorbido por afinidad, mientras que en el DER-4 fue realizada sobre la enzima soluble. ScAGALHis corresponde a la preparación enzimática obtenida a partir de la cepa KGM21.

3.4. Estudio de la estabilidad térmica de los biocatalizadores derivatizados

También se valoró el mecanismo de inmovilización estudiando la estabilidad térmica de los diferentes derivados inmovilizados frente al preparado enzimático soluble (Figura 10). Durante el seguimiento de la termoestabilidad a 60 °C, se observó que, en todos los casos, los derivados mantuvieron una estabilidad similar a la enzima soluble. Esto puede deberse a que, en este caso, la unión de la enzima al soporte se establece mediante brazos espaciadores demasiado largos (proporcionados por la oxidación de las glicosilaciones de la proteína) que podrían generar bucles inestables dificultando la rigidez y, como consecuencia, el derivado inmovilizado continúa siendo

sensible a la distorsión frente a la temperatura. Muchas son las enzimas inmovilizadas en soportes glioxilo mono y heterofuncionales resultando en un aumento de la estabilidad respecto a la soluble, gracias a la rigidez aportada por brazos espaciadores cortos que dirigen la unión covalente hacia la superficie enzimática más rica en Lys (López-Gallego et al., 2013). Es posible que la eliminación previa de las glicosilaciones de esta enzima, mejore considerablemente la estabilidad de las preparaciones derivatizadas a partir de este tipo de soportes, para ello, sería necesario realizar un estudio de valoración de la preparación enzimática desglucosilada para poder utilizar este mecanismo de inmovilización.

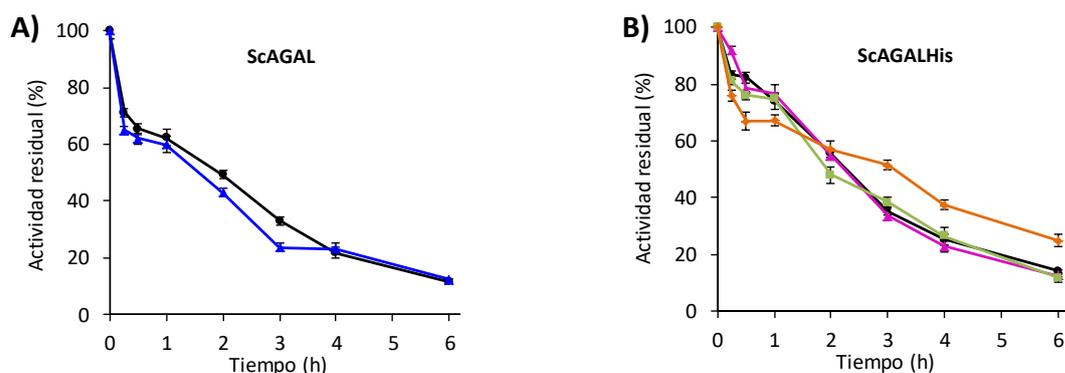


Figura 10. Estabilidad térmica de los derivados inmovilizados ScAGAL (A) y ScAGALHis (B) a 60°C. El ensayo se realizó empleando 0.5 U/mL de la enzima soluble o el derivado suspendido (1/10, p/v) y se determinó la actividad α -galactosidasa residual de muestras retiradas a diferentes tiempos de incubación. Las representaciones gráficas muestran la enzima soluble (negro) y los biocatalizadores derivatizados ScAGAL/agarosa-NH₂ (azul), ScAGALHis/agarosa-Co (morado), ScAGALHis/agarosa-NH₂-Co (verde) y ScAGALHis/agarosa-NH₂ (naranja). ScAGAL y ScAGALHis corresponden a las preparaciones enzimáticas obtenidas a partir de las cepas, *S. cerevisiae* deficiente en invertasa y KGM21, respectivamente.

3.5. Implementación industrial de los biocatalizadores derivatizados

Los biocatalizadores inmovilizados obtenidos durante este trabajo presentan diferentes actividades específicas y grados de pureza que pueden ser interesantes en aplicaciones biotecnológicas; la selección del derivatizado adecuado dependerá de las necesidades del uso industrial final. La purificación-inmovilización enzimática en soportes de metal quelado es un procedimiento sencillo basado en la técnica cromatográfica IMAC, actualmente, optimizada para la purificación industrial de proteínas marcadas con etiquetas Poli-His. En este caso, la principal dificultad es alcanzar un control adecuado de las condiciones de desorción de la enzima unida al soporte, para evitar la liberación de la misma durante la operación de inmovilización. Se ha descrito un soporte altamente activado con grupos IDA unidos a metal quelado (115 μ mol/g soporte) que establece una adsorción muy fuerte a través de multi-interacciones entre el quelante y los residuos de histidina colocados sobre la superficie de la proteína (Pessela et al., 2007). Este mecanismo de inmovilización

reversible puede ser una ventaja deseable porque permite la recuperación del soporte después de la inactivación enzimática reduciendo el coste de operación. Por otro lado, la combinación de la técnica IMAC con una unión covalente adicional mejora la estabilización de los derivados y evita la liberación indeseada de enzima del soporte. En este caso, la aplicación a gran escala del mecanismo de inmovilización puede resultar complejo para empresas dedicadas a la biotecnología sin experiencia en química debido, principalmente, al uso de ciertos reactivos y al control riguroso de pH durante el proceso (Mateo et al., 2006). Tanto el periodato de sodio como el borohidruro de sodio son compuestos que exigen una regulación de seguridad adecuada, y un error en el valor de pH implica un riesgo de inactivación enzimática o que no se produzca la inmovilización. Esto podría solventarse si una empresa especializada fuera la encargada de la preparación del soporte y los biocatalizadores inmovilizados. Además, las matrices de agarosa se comportan como geles flexibles sin mostrar rotura incluso a velocidades muy altas de agitación mecánica, e industrialmente, es posible generar partículas de gran tamaño que decantan fácilmente permitiendo la recuperación más rápida del biocatalizador. Por otro lado, la unión enzima-soporte a través de enlaces amina secundarios es tan fuerte que pueden soportar incluso la hidrólisis ácida de proteínas, mientras que esto puede ser un problema utilizando otros protocolos de inmovilización. Por último, como ya hemos indicado en anteriores ocasiones, una de las ventajas más deseadas de la inmovilización es el nivel de estabilización del preparado derivatizado conseguido. En este caso, esta mejora podría alcanzarse llevando a cabo la desglicosilación previa de la enzima como paso previo a la utilización de un mecanismo de inmovilización mediante soportes glioxilo.

CONCLUSIONES FINALES

Las principales conclusiones de los estudios aportados por la presente tesis son resumidas a continuación:

- I. Las construcciones plasmídicas con variantes del gen de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* bajo un sistema de expresión en *Saccharomyces cerevisiae* revelan que la presencia de la señal de secreción nativa de la proteína permite que la cepa recombinante secrete una media de actividad α -galactosidasa 10 veces superior que empleando el Factor α .
 - a. La mayor producción de proteína heteróloga fue obtenida con YEpMEL1Flag, YEpMEL1 y YEpMEL1His alcanzando una actividad extracelular a las 96 h de cultivo en YPHSM de 25 U/ml, 19 U/ml y 10 U/ml, respectivamente.
 - b. La α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* purificada presenta una fuerte resistencia al tratamiento con las proteasas tripsina, quimotripsina, proteinasa K, subtilisina y pepsina, exhibiendo un 122 %, 132 %, 142 %, 117 % y 164% de su actividad inicial, respectivamente.
- II. La caracterización mediante TLC y HPLC de la especificidad de sustrato de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* demuestra que la enzima pertenece al Grupo 1 de α -galactosidasas según la acción sobre galactomano-oligosacáridos sintéticos.
 - a. Los datos de actividad relativa confirman que la enzima es más específica por melibiosa (95 %), seguido de rafinosa (15 %) y estaquiosa (11 %), y no actúa sobre el galactomanano de algarrobo.
 - b. La enzima sólo puede actuar sobre Gal¹Man₃, Gal^{3,4}Man₅ y goma de algarrobo tras hidrólisis previa de los sustratos con la β -manosidasa de *Helix pomatia*.
 - c. Los análisis de los productos de hidrólisis mediante HPLC muestran que un 90% de la rafinosa y estaquiosa es hidrolizada por la enzima a las 4 horas de reacción resultando ser una buena candidata para la hidrólisis de RFOs.
- III. Se creó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* deficiente en invertasa nativa (BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1) dirigida a la producción heteróloga de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de melazas de remolacha.
 - a. La utilización de esta cepa como hospedador de proteína heteróloga, permitió obtener preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas no contaminadas con actividad invertasa.
 - b. En presencia de un 8 % de melaza la cepa parental presenta un metabolismo fermentativo incluso en condiciones aeróbicas (efecto

Crabtree), mientras que la cepa deficiente en invertasa posee un metabolismo preferentemente respiratorio y utiliza de manera más eficiente todo el azúcar disponible.

- IV. La integración genómica de varias copias en tándem del gen que codifica para la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* en un sistema de expresión de *Kluyveromyces lactis* permitió la producción heteróloga de la enzima en medios basados en lactosuero.
 - a. Se identificaron cepas recombinantes (KGM) que contenían hasta 4 copias del gen integrado y se obtuvieron resultados fiables con métodos de detección mediante *qPCR* y análisis de transferencia de *Southern*.

- V. La aplicación estadística de la MSR permitió la optimización de la producción de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* en todos los casos ensayados.
 - a. El cultivo de la cepa recombinante BJ3505/YEpMEL1His en YPHSM, alcanzó una media de 66 U/mL de actividad α -galactosidasa con una producción máxima a las 190 h a partir de las condiciones estimadas por el modelo ($R^2 = 86.16 \%$, 95 % nivel de confianza).
 - b. El cultivo de la cepa recombinante BJ3505 Δ suc2/YEpMEL1 en melazas de remolacha, alcanzó una actividad α -galactosidasa máxima de 24 U/mL a las 144 h de cultivo a partir de las condiciones estimadas por el modelo (melaza = 11 %, extracto de levadura = 1 %, tamaño de inóculo = 8.5OD₆₀₀; $R^2 = 86.80 \%$, 95 % nivel de confianza). Este resultado supuso un incremento de la productividad del 72 % respecto a cultivos preliminares con melazas cuyo rendimiento fue mejorado durante el monitoreo de biorreactores en un 21 %.
 - c. El cultivo de la cepa recombinante KMG21 en un medio de producción sostenible (melazas de remolacha y lactosuero) suplementado con extracto de levadura (1 %) y empleando un tamaño de inóculo alto (10OD₆₀₀), alcanzó una actividad α -galactosidasa máxima de 5.85 U/mL a las 72 h de cultivo a partir de las condiciones estimadas por el modelo (melaza = 7 %, lactosuero = 3 % de suero de leche; $R^2 = 95.5 \%$, 95 % nivel de confianza). Este resultado permitió un incremento de la productividad del 49 % respecto un medio con lactosa inicialmente probado cuyo rendimiento fue mejorado durante el monitoreo de biorreactores en un 69 % (19 U/mL).

- VI. Estudios preliminares de inmovilización enzimática permitieron la obtención de diferentes biocatalizadores derivatizados procedentes de preparaciones enzimáticas de la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de cultivos de las cepas recombinantes en melazas de remolacha y lactosuero.

- a. La oxidación con periodato de las glicosilaciones superficiales de la proteína resultó ser una estrategia exitosa para llevar a cabo la inmovilización enzimática mediante unión covalente multipuntual.
- b. El rendimiento de inmovilización, así como la actividad retenida por el derivado, fue mayor utilizando soportes monofuncionalizados con grupos amino que utilizando soportes bifuncionalizados con grupos amino y grupos IDA quelados con Co^{2+} .
- c. Los soportes bifuncionalizados permitieron la obtención de derivatizados puros muy activos mediante un mecanismo de purificación-inmovilización en un solo paso.
- d. Todos los derivados inmovilizados mantuvieron una termoestabilidad a 60 °C similar a la enzima soluble, que difieren en actividad específica y grado de pureza y la selección del derivatizado adecuado dependerá de las necesidades del uso industrial final.

REFERENCIAS

- Abad, S., Kitz, K., Hörmann, A., Schreiner, U., Hartner, F.S., Glieder, A., 2010. Real-time PCR-based determination of gene copy numbers in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Journal* 5, 413–420.
- Achstetter, T., Nguyen-Juilleret, M., Findeli, A., Merkamm, M., Lemoine, Y., 1992. A new signal peptide useful for secretion of heterologous proteins from yeast and its application for synthesis of hirudin. *Gene* 110, 25–31.
- Ademark, P., De Vries, R.P., Hägglund, P., Stålbrand, H., Visser, J., 2001. Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding an alpha-galactosidase and a beta-mannosidase involved in galactomannan degradation. *European Journal of Biochemistry* 268, 2982–2990.
- Akbas, M.Y., Sar, T., Ozcelik, B., 2014. Improved ethanol production from cheese whey , whey powder, and sugar beet molasses by “*Vitreoscilla hemoglobin* expressing” *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 78, 687–694.
- Akbas, M.Y., Stark, B.C., 2016. Recent trends in bioethanol production from food processing byproducts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 43, 1593–1609.
- Alford, J.S., 2006. Bioprocess control: Advances and challenges. *Computers & Chemical Engineering* 30, 1464–1475.
- Almeida, D.G., Soares da Silva, R. de C.F., Luna, J.M., Rufino, R.D., Santos, V.A., Sarubbo, L.A., 2017. Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. *Frontiers in Microbiology* 8, 157.
- Ardao, I., Benaiges, M.D., Caminal, G., Alvaro, G., 2006. One step purification-immobilization of fuculose-1-phosphate aldolase, a class II DHAP dependent aldolase, by using metal-chelate supports. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 22–27.

- Arends, M., Biegstraaten, M., Hughes, D.A., Mehta, A., Elliott, P.M., Oder, D., Watkinson, O.T., Vaz, F.M., van Kuilenburg, A.B.P., Wanner, C., Hollak, C.E.M., 2017. Retrospective study of long-term outcomes of enzyme replacement therapy in Fabry disease: Analysis of prognostic factors. *PLoS One* 12, 1–17.
- Arshad, M., Ahmed, S., Zia, M.A., Rajoka, M.I., 2014. Kinetics and thermodynamics of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* MLD10 using molasses. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172, 2455–2464.
- Arshad, M., Hussain, T., Iqbal, M., Abbas, M., 2017. Enhanced ethanol production at commercial scale from molasses using high gravity technology by mutant *S. cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology* 48, 403–409.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J. a, Struhl, K., Wiley, C.J., Allison, R.D., Bittner, M., Blackshaw, S., 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc; Ringbou Edition.
- Baquero Franco, J., 1987. *La industria del azúcar de remolacha*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Basso, L., Basso, T., Rocha, S., 2011. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. *Biofuel Production - Recent Developments and Prospects* 1530, 85–100.
- Bauer, C., Herzog, V., Bauer, M.F., 2001. Improved technique for electron microscope visualization of yeast membrane structure. *Microscopy and Microanalysis* 7, 530–534.
- Beitle, R.R., Atai, M.M., 1997. Use of divalent metal ions chelated to agarose derivatives for reversible immobilization of proteins. *Immobilization of enzymes and cells. Methods in biotechnology*. Bickerstaff G. F. (Ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 339–343.

- 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.
- Bobrov, K.S., Borisova, a S., Eneyskaya, E. V, Ivanen, D.R., Shabalin, K. a, Kulminskaya, a a, Rychkov, G.N., 2013. Improvement of the efficiency of transglycosylation catalyzed by α -galactosidase from *Thermotoga maritima* by protein engineering. *Biochemistry* 78, 1112–23.
- Box, G.E.P., Draper, N.R., 2007. Response surfaces, mixtures, and ridge analyses (Second Edition). Online ISBN: 9780470072769.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Brena, B.M., Vieira-Batista, F., 2006. A Literature Survey. Immobilization of enzymes and cells (Second Edition), Guisan, J.M. (Ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 15–30.
- Breunig, K., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M., Bourgarel, D., Falcone, C., Ferrero, I., Frontali, L., Goffrini, P., Krijger, J., Mazzoni, C., Milkowski, C., Steensma, H., Wésolowski-Louvel, M., Zeeman, A., 2000. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 771–780.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* 37, 233–238.
- Cárdenas-Fernández, M., López, C., Álvaro, G., López-Santín, J., 2012. L-Phenylalanine

- synthesis catalyzed by immobilized aspartate aminotransferase. *Biochemical Engineering Journal* 63, 15–21.
- Chen, D.-C., Yang, B.-C., Kuo, T.-T., 1992. One-step transformation of yeast in stationary phase. *Current Genetics* 21, 83–84.
- Clarke, J.H., Davidson, K., Rixon, J.E., Halstead, J.R., Fransen, M.P., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., 2000. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and α -galactosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, 661–667.
- Colussi, P.A., Taron, C.H., 2005. *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7092–7098.
- Dagbagli, S., Goksungur, Y., 2008. Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. *Electronic Journal of Biotechnology* 11, 1–12.
- Darvishi, F., Moradi, M., Madzak, C., Jolivalt, C., 2016. Production of laccase by recombinant *Yarrowia lipolytica* from molasses: bioprocess development using statistical modeling and increase productivity in shake-flask and bioreactor cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181, 1228–1239.
- Darvishi, F., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Momenbeik, F., 2009. Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009, 1–7.
- Davies, G., Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853–859.
- De Faria, J.T., Rocha, P.F., Converti, A., Passos, F.M.L., Minim, L. A, Sampaio, F.C., 2013. Statistical investigation of *Kluyveromyces lactis* cells permeabilization with ethanol by response surface methodology. *Brazilian Journal of Microbiology* 44,

1067–74.

- De Rezende, S.T., Guimarães, V.M., De Rodrigues, M.C., Felix, C.R., 2005. Purification and characterization of an α -galactosidase from *Aspergillus fumigatus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 195–202.
- De Vries, R.P., Van Den Broeck, H.C., Dekkers, E., Manzanares, P., De Graaff, L.H., Visser, J., 1999. Differential expression of three alpha-galactosidase genes and a single β -galactosidase gene from *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2453–60.
- Dey, P.M., Patel, S., Brownleader, M.D., 1993. Induction of alpha-galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar (*Cyamopsis tetragonobola*) gum. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 17, 361–371.
- Di Stefano, M., Miceli, E., Gotti, S., Missanelli, A., Mazzocchi, S., Corazza, G.R., 2007. The effect of oral α -galactosidase on intestinal gas production and gas-related symptoms. *Digestive Diseases and Science* 52, 78–83.
- Dilipkumar, M., Rajamohan, N., Rajasimman, M., 2013. Inulinase production in a packed bed reactor by solid state fermentation. *Carbohydrate Polymers* 96, 196–199.
- Dilipkumar, M., Rajasimman, M., Rajamohan, N., 2014. Optimization, kinetics, and modeling of inulinase production by *K. marxianus* var. *marxianus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 44, 291–309.
- Du, F., Liu, Q., Wang, H., Ng, T., 2013a. Purification an α -galactosidase from *Coriolus versicolor* with acid-resistant and good degradation ability on raffinose family oligosaccharides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30, 1261–1267.
- Du, F., Zhu, M., Wang, H., Ng, T., 2013b. Purification and characterization of an α -galactosidase from *Phaseolus coccineus* seeds showing degrading capability on

raffinose family oligosaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry* 69, 49–53.

Falkoski, D.L., Guimaraes, V.M., De Queiroz, M.V., De Araújo, E.F., De Almeida, M.N., De Barros, E.G., De Rezende, S.T., 2009. Covalent immobilization of α -galactosidase from *Penicillium griseoroseum* and its application in oligosaccharides hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 158, 540–551.

Fernández-Leiro, R., 2011. Structural Characterization and Directed Evolution of an α -galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Thesis Doctoral, Faculdade de Ciências, Universidade da Coruña.

Fernandez-Leiro, R., Pereira-Rodriguez, A., Cerdán, M.E., Becerra, M., 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, 28020–28033.

Fernández-Leiro, R., Pereira-Rodríguez, A., Cerdán, M.E., Becerra, M., Sanz-Aparicio, J., 2010. Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of α -galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications* 66, 44–47.

Ferreira, I.M.P.L.V.O., Pinho, O., Vieira, E., Tavela, J.G., 2010. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science & Technology* 21, 77–84.

Ferreira, J.G., Reis, A.P., Guimarães, V.M., Falkoski, D.L., da Silva Fialho, L., de Rezende, S.T., 2011. Purification and characterization of *Aspergillus terreus* α -galactosidases and their use for hydrolysis of soymilk oligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164, 1111–1125.

Ferreira, P.G., da Silveira, F.A., dos Santos, R.C.V., Genier, H.L.A., Diniz, R.H.S., Ribeiro, J.I., Fietto, L.G., Passos, F.M.L., Da Silveira, W.B., 2015. Optimizing ethanol production by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 in a mixture of

- sugarcane bagasse and ricotta whey. *Food Science and Biotechnology* 24, 1421–1427.
- Fialho, S., Monteze, V., Marin, C., Pataro, A., 2008. Characterization and biotechnological application of an acid α -galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. seeds. *Phytochemistry* 69, 2579–2585.
- Filho, M., Pessela, B.C., Mateo, C., Carrascosa, A. V., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M., 2008. Immobilization-stabilization of an α -galactosidase from *Thermus sp.* strain T2 by covalent immobilization on highly activated supports: Selection of the optimal immobilization strategy. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 265–271.
- Finn, B., Harvey, L.M., McNeil, B., McNeil, B., 2006. Near-infrared spectroscopic monitoring of biomass, glucose, ethanol and protein content in a high cell density baker's yeast fed-batch bioprocess. *Yeast* 23, 507–517.
- Gassara, F., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Verma, M., Surampalli, R.Y., 2010. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal* 49, 388–394.
- Geng, X., Tian, G., Zhao, Y., Zhao, L., Wang, H., Ng, T.B., 2015. A fungal α -galactosidase from *Tricholoma matsutake* with broad substrate specificity and good hydrolytic activity on raffinose family oligosaccharides. *Molecules* 20, 13550–13562.
- Ghazi, S., Rooke, J.A., Galbraith, H., 2003. Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease and α -galactosidase treatment in broiler cockerels and broiler chicks. *British Poultry Science* 44, 410–418.
- Gibson, B.R., Lawrence, S.J., Leclaire, J.P.R., Powell, C.D., Smart, K.A., 2007. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling, *FEMS Microbiology Reviews*.
- Gietz, R.D., Sugino, A., 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed

with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction site. *Gene* 74, 527–534.

Girigowda, K., Kapnoor, S.S., Kulkarni, D., Mulimani, V.H., 2007. Degradation of raffinose oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 1430–1436.

Gong, W., Xu, L., Gu, G., Lu, L., Xiao, M., 2016. Efficient and regioselective synthesis of globotriose by a novel α -galactosidase from *Bacteroides fragilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 6693–6702.

González-Siso, M., Freire-Picos, M., Ramil, E., González-Domínguez, M., Rodríguez Torres A, Cerdán, M., 2000. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Insights and perspectives. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 699–705.

González-Siso, M.I., Ramil, E., Cerdán, M.E., Freire-Picos, M. a., 1996. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect. *Enzyme and Microbial Technology* 18, 585–591.

González Siso, M.I., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* 57, 1–11.

Goulas, V., Stylos, E., Chatziathanasiadou, M. V., Mavromoustakos, T., Tzakos, A.G., 2016. Functional components of carob fruit: Linking the chemical and biological space. *International Journal of Molecular Science* 17, 1–20.

Gray, K.A., Zhao, L., Emptage, M., 2006. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology* 10, 141–146.

Grousl, T., Ivanov, P., Malcova, I., Pompach, P., Frydlova, I., Slaba, R., Senohrabkova, L., Novakova, L., Hasek, J., 2013. Heat shock-induced accumulation of translation elongation and termination factors precedes assembly of stress granules in *S. cerevisiae*. *PLoS One* 8, 1–17.

Guarente, L., 1983. Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of

- cloned genes in yeast. *Methods in Enzymology* 101, 181–191.
- Guimarães, V.M., De Rezende, S.T., Moreira, M.A., De Barros, E.G., Felix, C.R., 2001. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochemistry* 58, 67–73.
- Guo, Y., Song, Y., Qiu, Y., Shao, X., Wang, H., Song, Y., 2016. Purification of thermostable α -galactosidase from *Irpex lacteus* and its use for hydrolysis of oligosaccharides. *Journal of Basic Microbiology* 56, 448–458.
- He, Z., Huang, Y., Qin, Y., Liu, Z., Mo, D., 2012. Comparison of alpha-Factor preprosequence and a classical mammalian signal peptide for secretion of recombinant xylanase xynB from yeast *Pichia*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 479–483.
- Hermanson, G.T., 2008. *Functional Targets. Bioconjugate Techniques (Second Edition)*. Academic Press.
- Hu, Y., Tian, G., Zhao, L., Wang, H., Ng, T.B., 2017. A protease-resistant α -galactosidase from *Pleurotus djamor* with broad pH stability and good hydrolytic activity toward raffinose family oligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules* 94, 122–130.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology* 153, 163–168.
- Janika, S., Gernig, A., Murray, P., Fernandes, S., Tuohy, M.G., 2010. Cloning and expression of a thermostable α -galactosidase from the thermophilic fungus *Talaromyces emersonii* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 1653–1663.
- Johansson, B., Christensson, C., Hobbey, T., Hahn-Hägerdal, B., 2001. Xylulokinase Overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose

reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4249–4255.

Jong, S. C., Edwards, M. L. S., 1990. American Type Culture Collection Catalogue of Yeasts. 18th de. Rockville, M.D., pp. 39.

Kaneko, R., Kusakabe, I., Ida, E., Murakami, K., 1991. Substrate specificity of α -galactosidase from *Aspergillus niger* 5-16. *Agricultural and Biological Chemistry* 55, 109–115.

Kasukabe, I., Zamora, A.F., Satoru, K., Fernández, W.L., Murakami, K., 1986. Studies on the mannanase of *Streptomyces*. *J. Trop. Agr.* 30, 264–271.

Kato, K., Yamamoto, Y., Izawa, S., 2011. Severe ethanol stress induces assembly of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 28, 339–347.

Katrolia, P., Jia, H., Yan, Q., Song, S., Jiang, Z., Xu, H., 2012. Characterization of a protease-resistant α -galactosidase from the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* and its application in removal of raffinose family oligosaccharides. *Bioresource Technology* 110, 578–586.

Kim, S. B., Kim, J. H., Lee, Y. M., Kim, Y. M., Park, S. W., Lee, K. P., 2009. Process for manufacturing tagatose using soy oligosaccharide. WO2009/096693.

Kim, W.-D., Kaneko, S., Park, G.-G., Tanaka, H., Kusakabe, I., Kobayashi, H., 2003. Purification and characterization of α -galactosidase from sunflower seeds. *Biotechnology Letters* 25, 353–358.

Klimecki, H.M., 2010. Expression of human neutrophil elastase in *K. lactis*. Undergraduate Honors Theses. Paper 2. <http://dc.etsu.edu/honors/2>.

Kulkarni, D.S., Kapanoor, S.S., Girigouda, K., Kote, N. V, Mulimani, V.H., 2006. Reduction of flatus-inducing factors in soymilk by immobilized alpha-galactosidase. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 45, 51–57.

- Kusakabe, I., Kaneko, R., Takada, N., Zamora, A. F., Fernández, W.L., Murakami, K., 1990. A simple method for elucidating structures of galactomannooligosaccharides by sequential actions of β -mannosidase and α -galactosidase. *Agricultural and Biological Chemistry* 54, 1081–1083.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S.G., Hwang, S., 2006. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 123, 273–280.
- Levine, B., Ph, D., Weisman, S., Ph, D., 2004. Enzyme Replacement as an Effective Treatment for the Common Symptoms of Complex Carbohydrate Intolerance. *Nutrition in Clinical Care* 7, 75–81.
- Liljestriim, P.L., Tubb, R.S., Korhola, M.P., 1991. Construction of new α -galactosidase producing yeast strains and the industrial application of these strains. US5055401 A.
- Liljeström, P.L., 1985. The nucleotide sequence of the yeast MELI gene. *Nucleic Acids Research*. 13, 7257–7268.
- Linden, J.C., 1982. Immobilized α -D-galactosidase in the sugar beet industry. *Enzyme and Microbial Technology* 4, 130-136.
- Liu, C., Ruan, H., Shen, H., Chen, Q., Zhou, B., Li, Y., He, G., 2007. Optimization of the fermentation medium for alpha-galactosidase production from *Aspergillus foetidus* ZU-G1 using response surface methodology. *Journal of Food Science* 72, 120–125.
- Liu, C.Q., He, G.Q., 2012. Multiple α -galactosidases from *Aspergillus foetidus* ZU-G1 : purification, characterization and application in soybean milk hydrolysis. *European Food Research and Technology* 234, 743–751.

- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Lööke, M., Kristjuhan, K., Kristjuhan, A., 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* 50, 325–328.
- López-Gallego, F., Fernández-Lorente, G., Rocha-Martin, J., Bolivar, J.M., Mateo, C., Guisan, J.M., 2013. Stabilization of enzymes by multipoint covalent immobilization on supports activated with glyoxyl groups. *Immobilization of Enzymes and Cells (Third Edition)*, Guisan, J.M. (Ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 59–71.
- López-López, O., Fuciños, P., Pastrana, L., Rúa, M.L., Cerdán, M.E., González-Siso, M.I., 2010. Heterologous expression of an esterase from *Thermus thermophilus* HB27 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* 145, 226–232.
- Malgas, S., van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2015. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 1167–1175.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1989. Analysis of genomic DNA by Southern hybridization. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 9.31–9.55.
- MAPAMA, 2016. Anuario Estadística Agraria.
- Marques, W.L., Raghavendran, V., Stambuk, B.U., Gombert, A.K., 2015. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. *FEMS Yeast Research*, 16, 1-16.
- Martínez Moro, Á., 2015. Estudio de la expresión de proteína heteróloga en levaduras a partir de subproductos de la industria alimentaria. Trabajo fin de máster, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.

- Mateo, C., Abian, O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Grazu, V., Pessela, B.C.C., Giacomini, C., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejevi, K., Batista-Viera, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M., 2005. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme and Microbial Technology* 37, 456–462.
- Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Abian, O., Fernández-Lafuente, Roberto Guisán, J.M., 2000. Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules* 1, 739–745.
- Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Rocha-Martin, J., Bolivar, J.M., Guisan, J.M., 2013. Oriented covalent immobilization of enzymes on heterofunctional-glyoxyl supports. *Immobilization of Enzymes and Cells (Third Edition)* Guisan, J.M. (Ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 73–88.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. 40, 1451–1463.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., López-Gallego, F., Pessela, B.C.C., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., 2006. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 274–280.
- McCleary, B. V., 1983. beta-D-mannosidase from *Helix pomatia*. *Carbohydrate Research* 111, 297–310.
- McCleary, B. V., Travel, F.R., Cheetham, N.W.H., 1982. Preparative-scale isolation and characterisation of 6¹-α-D-galactosyl-(1→4)-β-d-mannobiose and 6²-α-D-galactosyl-(1→4)-β-d-mannobiose. *Carbohydrate Research* 104, 285–297.
- McDonald, A.G., Boyce, S., Tipton, K.F., 2009. ExplorEnz: The primary source of the

- IUBMB enzyme list. *Nucleic Acids Research* 37, 593–597.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426–428.
- Mitsunori, I., Kaneko, S., Kuno, A., Koyama, Y., Yoshida, S., Park, G., Sakakibara, Y., Kusakabe, I., Kobayashi, H., 2001. Purification and characterization of the recombinant *Thermus sp.* strain T2 α -galactosidase expressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1601–1606.
- Morel, F.B., Dai, Q., Ni, J., Thomas, D., Parnet, P., Fanc, P., 2015. Alpha-galacto-oligosaccharides dose-dependently reduce appetite and decrease inflammation in overweight adults. *The Journal of Nutrition* 145, 2052–9.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., Anderson-Cook, Ch. M., 2016. Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments (Third Edition), John Wiley & Sons.
- Nakai, H., Baumann, M.J., Petersen, B.O., Westphal, Y., Hachem, M.A., Dilokpimol, A., Duus, J.O., Schols, H.A., Svensson, B., 2010. *Aspergillus nidulans* α -galactosidase of glycoside hydrolase family 36 catalyses the formation of α -galacto-oligosaccharides by transglycosylation. *The FEBS Journal* 277, 3538–3551.
- Nakane, K., Kawaoi, A., 1974. Peroxidase-labeled a new antibody method conjugation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 22, 1084–1091.
- Nielsen, J., 2013. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: Advances through metabolic engineering. *Bioengineered* 4, 207–211.
- Overbeeke, N., Termorshuizen, G.H.M., Giuseppin, M.L.F., Underwood, D.R., Verrips, C.T., 1990. Secretion of the α -galactosidase from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) by *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1429–1434.
- Parra Huertas, R.A., 2009. Whey: Importance in the food industry. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 62, 4967–4982.

- Parzenese, M., 2008. Tecnologías para la Industria Alimentaria - Procesamiento de lactosuero. *Alimentos Argentinos* 13, 1–9.
- Patil, A.G.G., Kote, N. V., Mulimani, V., 2009. Enzymatic removal of flatulence-inducing sugars in chickpea milk using free and polyvinyl alcohol immobilized α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36, 29–33.
- Pessela, B.C.C., Mateo, C., Carrascosa, A. V, Vian, A., Rivas, G., Alfonso, C., Guisan, M., Ferna, R., 2003. One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of a thermophilic Poly-His-tagged β -galactosidase from *Thermus sp.* strain T2 by using novel heterofunctional chelate-epoxy sepabeads. *Biomacromolecules* 4, 107–113.
- Pessela, B.C.C., Mateo, C., Filho, M., Carrascosa, A., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J.M., 2007. Selective adsorption of large proteins on highly activated IMAC supports in the presence of high imidazole concentrations: Purification, reversible immobilization and stabilization of thermophilic α - and β -galactosidases. *Enzyme and Microbial Technology*. 40, 242–248.
- Querijero-Palacpac, N.M., Martínez, M.R., Boussiba, S., 1990. Mass cultivation of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Gloeotrichia natans*, indigenous to rice-fields. *Journal of Applied Phycology* 2, 319–325.
- Ramalingam, Rudra, Saraswathy, N., Sadasivam, S., 2010. Degradation of flatulence-causing oligosaccharides in soymilk by α -galactosidase — A novel thermotolerant from *Penicillium purpurogenum*. *Indian Journal Biotechnology* 9, 160–165.
- Read, J.D., Colussi, P. a., Ganatra, M.B., Taron, C.H., 2007. Acetamide selection of *Kluyveromyces lactis* cells transformed with an integrative vector leads to high-frequency formation of multicopy strains. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5088–5096.
- Revillion, J.P.D.P., Brandelli, A., Ayub, M. a Z., 2003. Production of yeast extract from

- whey using *Kluyveromyces marxianus*. Brazilian Archives of Biology and Technology 46, 121–127.
- Ripuan, T.S., Oki, K. a, Amamoto, K.Y., Ongkao, D.T., Umagai, H.K., 2003. Purification and characterization of thermostable α -galactosidase from *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry 67, 1485–1491.
- Rodrigues, B., Peinado, J.M., Raposo, S., Constantino, A., Quintas, C., Lima-Costa, M.E., 2015. Kinetic and energetic parameters of carob wastes fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Crabtree effect, ethanol toxicity, and invertase repression. Journal of Microbiology and Biotechnology 25, 837–844.
- Ryan, M.P., Jones, R., Morse, R.H., 1998. SWI-SNF Complex participation in transcriptional activation at a step subsequent to activator binding. Molecular and Cellular Biology 18, 1774–1782.
- Sambrook, J., Russell, D. W., 2001. Molecular cloning: A laboratory manual (Third Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santos, A.C., Bezerra, M.S., Pereira, Heloize dos Santos Santos, E.S., Macedo, G.R., 2010. Production and recovery of rhamnolipids using sugar cane molasses as carbon source. Journal of Chemistry and Chemical Engineering 4, 27–33.
- Schiffmann, R., 2009. Fabry disease. Pharmacology & Therapeutics 122, 65–77.
- Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M., Sandmann, G., Schrader, J., 2011. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. Applied Microbiology and Biotechnology 89, 555–571.
- Schröder, C., Janzer, V.A., Schirmacher, G., Claren, J., Antranikian, G., 2016. Characterization of two novel heat-active α -galactosidases from thermophilic bacteria. Extremophiles 21, 85–94.
- Schügerl, K., 2001. Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses

- during the last 20 years. *Journal of Biotechnology* 85, 149–173.
- Shibuya, H., Kobayashi, H., Yoshida, S., Kaneko, S., Park, G.G., Kusakabe, I., 1999. Purification and characterization of recombinant *Mortierella vinacea* α -galactosidases I and II expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63, 1096-1099.
- Singh, N., Kayastha, A.M., 2012a. Purification and characterization of α -galactosidase from *White Chickpea* (*Cicer arietinum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 3253–3259.
- Singh, N., Kayastha, A.M., 2012b. Cicer α -galactosidase immobilization onto chitosan and amberlite MB-150: Optimization, characterization, and its applications. *Carbohydrate Research* 358, 61–66.
- Singh, N., Srivastava, G., Talat, M., Raghubanshi, H., Srivastava, O.N., Kayastha, A.M., 2014. Cicer α -galactosidase immobilization onto functionalized graphene nanosheets using response surface method and its applications. *Food Chemistry* 142, 430–438.
- Spohner, S.C., Schaum, V., Quitmann, H., Czermak, P., 2016. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology* 222, 104–116.
- Sumner-Smith, M., Bozzato, R.P., Skipper, N., Davies, R.W., Hopper, J.E., 1985. Analysis of the inducible *MEL1* gene of *Saccharomyces carlsbergensis* and its secreted product, alpha-galactosidase (melibiase). *Gene* 36, 333–340.
- Takakuwa, N., Tamura, M., Ohnishi, M., Oda, Y., 2006. Sequence analysis of the α -galactosidase *MEL* gene governing the efficient production of ethanol from raffinose-rich molasses in the yeast *Lachancea thermotolerans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 587.
- Ukibe, K., Hashida, K., Yoshida, N., Takagi, H., 2009. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress

tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7205–7211.

Van Ooyen, A.J.J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M.M.A., Jacobs, D.I., Colussi, P.A., Taron, C.H., 2006. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research* 6, 381–392.

Verstrepen, K.J., Iserentant, D., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Van Dijck, P., Winderickx, J., Pretorius, I.S., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R., 2004. Glucose and sucrose: Hazardous fast-food for industrial yeast? *Trends in Biotechnology* 22, 531–537.

Verwaal, R., Wang, J., Meijnen, J.P., Visser, H., Sandmann, G., Van Den Berg, J.A., Van Ooyen, A.J.J., 2007. High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4342–4350.

Viana, P.A., de Rezende, S.T., Marques, V.M., Trevizano, L.M., Passos, F.M., Oliveira, M.G., Bemquerer, M.P., Oliveira, J.S., Guimarães, V.M., 2006. Extracellular α -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2385–2391.

Von Heijne, G., 1985. Signal sequence: The limits of variation. *Journal of Molecular Biology* 184, 99–105.

Wang, Y., Black, B. a., Curtis, J.M., Gänzle, M.G., 2014. Characterization of α -galacto-oligosaccharides formed via heterologous expression of α -galactosidases from *Lactobacillus reuteri* in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 2507–2517.

Xu, W., Liang, L., Zhu, M., 2014. Determination of sugars in molasses by HPLC following solid-phase extraction. *International Journal of Food Properties* 18, 547–557.

- Yaman, S., Calik, P., 2016. Beet molasses-based feeding strategy enhances recombinant thermostable glucose isomerase production by *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Biotechnology and Applied Biochemistry* (DOI: 10.1002/bab.1549).
- Yamashita, A., Hashimoto, H., Fujita, K., Okada, M., Mori, S., Kitahata, S., 2005. Reverse reaction of *Aspergillus niger* APC-9319 alpha-galactosidase in a supersaturated substrate solution: production of alpha-linked galactooligosaccharide (alpha-GOS). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69, 1381–8.
- Yang, D., Tian, G., Du, F., Zhao, Y., Zhao, L., Wang, H., Ng, T.B., 2015. A fungal alpha-galactosidase from *Pseudobalsamia microspora* capable of degrading raffinose family oligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 176, 2157–2169.
- Yoshida, S., Tan, C.-H., Shimokawa, T., Turakainen, H., Kusakabe, I., 1997. Substrate specificities of α -galactosidases from yeasts. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61, 359–361.
- Yoshimitsu, M., Higuchi, K., Fan, X., Takao, S., Medin, J.A., Tei, C., Takenaka, T., 2011. Sequencing and characterization of the porcine α -galactosidase A gene: Towards the generation of a porcine model for Fabry disease. *Molecular Biology Reports* 38, 3145–3152.
- Zheng, X., Fang, B., Han, D., Yang, W., Qi, F., Chen, H., Li, S., 2016. Improving the secretory expression of an α -galactosidase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *PLoS One* 11, 1–12.
- Zhou, J., Dong, Y., Li, J., Zhang, R., Tang, X., Mu, Y., Xu, B., Wu, Q., Huang, Z., 2012. Cloning, heterologous expression, and characterization of novel protease-resistant α -galactosidase from new *Sphingomonas* strain. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 1532–1539.
- Zitomer, R.S., Hall, D., 1976. Yeast cytochrome c messenger RNA. In vitro translation

and specific immunoprecipitation of the *CYC1* gene product. *Journal of Biological Chemistry* 251, 6320–6326.

APÉNDICE I

ABREVIATURAS

μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromol
°C	Grados Celsius
A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADH2	Alcohol deshidrogenasa 2
Amp^R	Resistencia a ampicilina
APS	Persulfato amónico
ARN	Ácido ribonucleico
bp	par-base
α-Gals	α-Galactosidasas
α-GOS	α-Galacto-oligosacáridos
CM	Medio Completo
CM-T	Medio Completo sin triptófano
CM-U	Medio Completo sin uracilo
DCC	Diseño Compuesto Central
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EC	Código de clasificación de enzimas
EDA	Etilendiamina
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
Endo H	Endoglicosidasa H
EPI	Epiclorohidrina

FDA	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FEDNA	Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal
g	Gramo
Gal¹Man₃	6 ¹ -mono- α -D-galactopiranosil- β -1,4-manotriosa
Gal^{3,4}Man₅	6 ³ , 6 ⁴ -di- α -D-galactopiranosil- β -1,4-manopentosa
GH	Glucósido Hidrolasa
GRAS	Generalmente reconocido como seguro (<i>Generally Recognized As Safe</i>)
h	Hora
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IDA	Ácido iminodiacético
IMAC	Cromatografía de afinidad de metal quelado inmovilizado (<i>Immobilized Metal-chelate Affinity Chromatography</i>)
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
IUBMB	Unión internacional de bioquímica y biología molecular (<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>)
Kb	Kilobase
KDa	KiloDalton
L	Litro
LB	Luria-Bertani
Lys	Lisina
M	Molar
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
mg	Miligramo
min	Minuto

mL	Mililitro
mM	Milimolar
MSR	Metodología de Superficie de Respuesta
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
OD₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
ORF	Pauta de lectura abierta (<i>Open Reading Frame</i>)
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- β -D-galactopiranosido
Ori	Origen de replicación
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Polymerase</i>)
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
pK_a	Constante de disociación ácida
PNPG	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-galactopiranosido
Poli-His	Etiqueta de purificación de 6 His
RFOs	Oligosacáridos de la familia de la rafinosa (<i>Raffinose Family Oligosaccharides</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
ScAGal	α -galactosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCP	Proteína de origen unicelular (Single Cellular Protein). Complemento alimenticio proteico obtenido de cultivos de microorganismos.
SDS	Dodecil sulfato sódico
TE	Tris-EDTA

TEMEZ	N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina
TLC	Cromatografía de capa fina (<i>Thin-Layer Chromatography</i>)
Trp	Triptófano
U	Unidad enzimática
WPC	Concentrado de Proteínas de Suero (<i>Whey Protein Concentrate</i>)
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YNB	Base nitrogenada para levaduras (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)

APÉNDICE II

Curriculum vitae

Currículum vitae

María E. Álvarez Cao

Formación académica

Titulación Superior	Centro	Fecha
Máster en Biología Molecular, Celular y Genética.	Facultade de Ciencias da Universidade da Coruña.	08/09/2014
CAP (Curso de Aptitud Pedagógica).	Dirección Xeral de Relacións Laborais, Xunta de Galicia.	17/12/2009
Técnico Superior en Prevención de Riesgos Laborales.	Facultade de Ciencias da Educación da Universidade de Vigo.	31/03/2009
Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.	Facultade de Ciencias (Campus de Ourense) da Universidade de Vigo.	17/08/2005
Máster en Enología, Viticultura y Marketing del vino.	Colegio Oficial de Ingenieros Técnicos Agrícolas de Ourense.	24/06/2004
Licenciatura en Biología fundamental y sanitaria.	Facultade de Ciencias da Universidade de Vigo.	03/02/2004

Actividades anteriores de carácter Científico-Profesional

Puesto	Institución	Fechas
Técnico controlador de vendimia.	Consello Regulador do Ribeiro, Ribadavia, Ourense.	26/09/2016-4/10/2016
Estadía predoctoral.	Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.	23/06/2016-21/09/2016
Personal científico-técnico con cargo al Proyecto CONSOLIDACIÓN-XUGA (CN2012/118).	Laboratorio de bioquímica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.	01/07/2014-30/06/2015
Personal científico-técnico con cargo al Proyecto BIO-ALFA-GAL, Fundación BARRIÉ (550/2011).	Laboratorio de bioquímica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.	16/01/2012-15/06/2013
Asistencia técnica en el desarrollo de técnicas analíticas de biología molecular.	Laboratorio de bioquímica, Facultade de Ciencias (Campus de Ourense), Universidade de Vigo.	01/09/2011-31/01/2012
Titulado Superior de Actividades Técnicas y Profesionales con cargo al Proyecto I3P.	Instituto de Química-Física Rocasolano, Departamento de Cristalografía y Biología Estructural, (CSIC).	30/06/2009-29/06/2011
Tecnóloga de Alimentos a cargo del Proyecto Promoción de estilos de vida saludables.	Concejalía de Sanidad, Ayuntamiento de Ourense.	22/04/2008-31/12/2008

Puesto	Institución	Fechas
Beca de Formación de Tecnólogos y personal de apoyo a la investigación agraria, Consellería do Medio Rural.	Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia.	18/07/2007-28/12/2007
Tecnóloga de alimentos a cargo del Proyecto RETEC.	Agencia Española de Cooperación Internacional en Ecuador	06/10/2006-30/06/2007
Beca de prácticas para titulados en especialidades agrarias.	Bodegas Pazo de Vieite. Ourense.	01/08/2006-30/09/2006
Técnico controlador de vendimia.	Consello Regulador do Ribeiro, Ribadavia, Ourense.	23/09/2005-05/10/2005
Beca de prácticas pre-profesionales. Convenio de Cooperación Educativa.	Cooperativa Vitivinícola del Ribeiro. S.C.G. Ourense	27/07/2004-30/11/2004
Beca de prácticas pre-profesionales. Convenio de Cooperación Educativa.	FERGOFRÍO S.L., Vigo, Pontevedra.	01/03/2002-30/08/2002

Publicaciones

Agustín Rico-Díaz, María-Efigenia Álvarez-Cao, Juan-José Escuder-Rodríguez, María-Isabel González-Siso, M. Esperanza Cerdán & Manuel Becerra. Rational mutagenesis by engineering disulphide bonds improves *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase for high temperature industrial applications. *Sci Rep.* 2017 Mar 31;7:45535. doi: 10.1038/srep45535.

María-Efigenia Álvarez-Cao, María-Isabel González-Siso, M. Esperanza Cerdán & Manuel Becerra. Optimization of the production of *Saccharomyces cerevisiae* α -galactosidase and its application in the degradation of raffinose family oligosaccharides. En preparación.

María-Efigenia Álvarez-Cao, María-Isabel González-Siso, M. Esperanza Cerdán & Manuel Becerra. Bioconversion of beet molasses into α -galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae* by a genetically modified strain of *S. cerevisiae*. En preparación.

María-Efigenia Álvarez-Cao, María-Isabel González-Siso, M. Esperanza Cerdán & Manuel Becerra. Valuation of whey and beet molasses by production of α -galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae* by *Kluyveromyces lactis*. En preparación.

Participación en proyectos de I+D+i financiados en convocatorias públicas (Nacionales y/o Internacionales)

Título del proyecto: Consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas del sistema Universitario de Galicia.

Entidad financiadora: Xunta de Galicia.

Duración, desde: 2012 hasta: 2015.

Investigador responsable: Dra. María Esperanza Cerdán Villanueva.

Título del proyecto: Bio-alfa-Gal.

Entidad financiadora: Fundación Barrié.

Entidades participantes: UDC, ISIS, FB
 Duración, desde: 2011 hasta: 2014.
 Investigador responsable: Dra. María Esperanza Cerdán Villanueva.

Título del proyecto: Búsqueda de nuevos catalizadores para la resolución de principios activos quirales a partir de fuentes geotermales gallegas (10MDS373027PR).
 Entidad financiadora: Xunta de Galicia.
 Entidades participantes: Universidad de A Coruña, Universidad de Vigo, Galchimia.
 Duración, desde: 2010 hasta: 2013.
 Investigador responsable: Dra. María Luisa Rúa Rodríguez.

Título del proyecto: Mecanismos moleculares de reconocimiento e hidrólisis de carbohidratos: estructura de glicosidasas modulares y de sus complejos con oligosacáridos mediante cristalografía de proteínas.
 Entidad financiadora: Nacional Inv. Científica y Desarrollo Tecnológico Bio2010-20508-C04-03.
 Duración, desde: 2009 hasta: 2011.
 Investigador responsable: Dra. Julia Sainz Aparicio.

Título del proyecto: The structure of a major signalling network that regulates plant ion homeostasis.
 Entidad financiadora: DGPYTC (BFU2008-00368/BMC).
 Duración, desde: 2009 hasta: 2011.
 Investigador responsable: Dr. Armando Albert De La Cruz.

Título del proyecto: Biología estructural de la señalización por inositol. Inositol fosfato kinasas: regulación, reconocimiento del sustrato y diseño de fármacos.
 Entidad financiadora: MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN (BFU2008-02897/BMC).
 Duración, desde: 2009 hasta: 2011.
 Investigador responsable: Dra. Beatriz González Pérez.

Participación en proyectos de I+D+i de especial relevancia con empresas y/o administraciones públicas (Nacionales y/o Internacionales)

Título del contrato/proyecto: Mecanismos moleculares de reconocimiento e hidrólisis de carbohidratos: estructura de glicosidasas modulares y de sus complejos con oligosacáridos mediante cristalografía de proteínas.
 Empresa/administración financiadora: Nacional Inv. Científica y Desarrollo Tecnológico Bio2010-20508-C04-03.
 Duración, desde: 2009 hasta: 2011.
 Investigador responsable: Dra. Julia Sainz Aparicio.

Contribución a congresos

Autores: M^a Efigenia Álvarez Cao, M^a Esperanza Cerdán Villanueva, M^a Isabel González Siso, Manuel Becerra Fernández.
 Título: Revalorización del suero de leche como sustrato para la producción heteróloga de α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* por *Kluyveromyces lactis*.
 Tipo de participación: Póster.

Congreso: Conferencia final Susmilk: Soluciones para la fabricación sostenible de lácteos.

Publicación: Libro de resúmenes online <http://www.greendairy.net/map.php>.

Lugar celebración: Santiago de Compostela Fecha: 22-23 Septiembre 2016.

Autores: M^a Efigenia Álvarez Cao, M^a Isabel González Siso, Manuel Becerra Fernández

Título: Optimización del proceso productivo de la enzima α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

Publicación: Libro de resúmenes online <http://www.sebbm.com/xxxviiiicongreso/>.

Lugar celebración: Valencia Fecha: 7-10 Septiembre 2015.

Autores: M^a Efigenia Álvarez Cao, M^a Esperanza Cerdán Villanueva, M^a Isabel González Siso, Manuel Becerra Fernández.

Título: Producción y caracterización de la enzima α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

Publicación: Libro de resúmenes online <http://www.sebbm.com/xxxviiicongreso/>.

Lugar celebración: Granada Fecha: 9-12 Septiembre 2014.

Autores: M^a Efigenia Álvarez Cao, M^a Esperanza Cerdán Villanueva, M^a Isabel González Siso, Manuel Becerra Fernández.

Título: Construcción de una cepa de *Kluyveromyces lactis* productora de α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

Publicación: Libro de resúmenes online <http://www.sebbm.com/xxxvicongreso/>.

Lugar celebración: Madrid Fecha: 4-6 Septiembre 2013.

Cursos y Seminarios

EIB821: Biocatálisis aplicada y biotransformaciones, dictado por el Dr. Gregorio Álvaro, profesor asociado del Departamento de Ingeniería química, biológica y ambiental de la Universidad Autónoma de Barcelona. Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 16/08/2016-09/09/2016 (12 h)

Seminario de postgrado "*Expanding the industrial use of Robust Oxidative Biocatalysts for the conversión and production of alcohols*", dictado por el Dr. Gregorio Álvaro, profesor asociado del Departamento de Ingeniería química, Biológica y Ambiental de la Universidad Autónoma de Barcelona. Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 31/08/2016 (1h).

X Curso Latinoamericano de Biotecnología. Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 24-29/07/2016 (21 h)

Curso teórico-práctico sobre cromatografía de proteínas con el sistema de *NCG Quest 10 Plus*. Bio-Rad Laboratorios, S.A., 16-18/02/2016 (20 h).

Taller sobre “*Some tips for writing scientific papers*”, Dr. Alejandro Martínez Abraín, Facultad de Ciencias - Universidade de Coruña (UDC), 14/01/2016 (4 h).

Análisis de datos con SPSS: Nivel inicial. Curso organizado por la Vicerreitoría de Títulos, Calidade e Novas Tecnoloxías y el Centro Universitario de Formación e Innovación de Educativa (CUFIE) da Universidade da Coruña. 10-12/12/2014 (15 h)

Recursos y utilidades documentales para la Tesis y otros trabajos académicos. CUFIE. Universidade da Coruña. Curso organizado por el Servizo de Biblioteca Universitaria Sección de Información e Coordinación da Universidade da Coruña (UDC). 19/03/2014 (10 h).

Introducción a la cromatografía de gases. Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. Curso organizado por el Gabinete de Formación de la Agencia Estatal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). 9-13/05/2011 (25 h).

Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. Curso organizado por el Gabinete de Formación de la Agencia Estatal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). 18-21/10/2010 (26 h).

