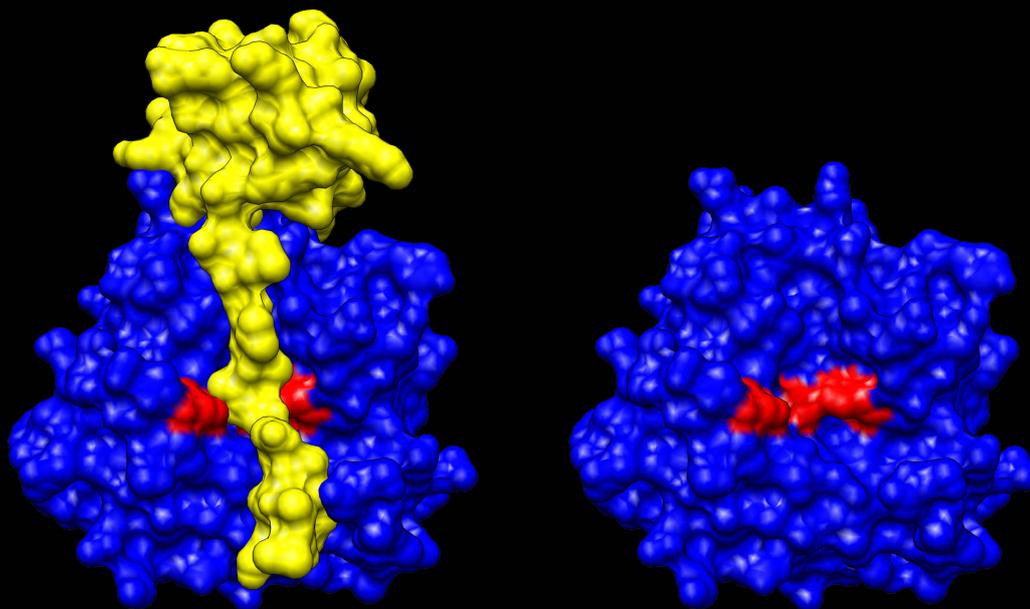


TESIS DOCTORAL

Purificación, caracterización y expresión
heteróloga de la proteasa menor extracelular (Epr)
de *Bacillus licheniformis*



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

JOSÉ MANUEL AGEITOS MARTÍNEZ
SANTIAGO DE COMPOSTELA
2011

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGÍA



Tesis Doctoral

**Purificación, caracterización y expresión
heteróloga de la proteasa menor extracelular (Epr)
de *Bacillus licheniformis***

José Manuel Ageitos Martínez

Santiago de Compostela 2011
ISBN 978-84-9887-790-8 (Edición digital PDF)

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGÍA

**Purificación, caracterización y expresión
heteróloga de la proteasa menor extracelular (*Epr*)
de *Bacillus licheniformis*.**

Memoria presentada por el Licenciado José Manuel Ageitos Martínez para
optar al grado de Doctor en Biología

Santiago, 2011

Fdo.: José Manuel Ageitos Martínez

Santiago de Compostela, 2011 **TOMÁS GONZÁLEZ VILLA,**
CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO
DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CERTIFICA:

La presente tesis titulada: **“Purificación, caracterización y expresión heteróloga de la proteasa menor extracelular (Epr) de *Bacillus licheniformis*”** que presenta José Manuel Ageitos Martínez para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada bajo mi dirección y la de la Dra. Margarita Poza Domínguez, en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, y hallándose concluida, autorizo su presentación para que sea evaluada por el tribunal correspondiente:

Y para que así conste, firmamos en la presente en Santiago de Compostela, Mayo, 2011.

Fdo. Tomás González Villa

Fdo. Margarita Poza Domínguez

“No sigas las huellas de los antiguos. Busca lo que ellos buscaron”

Matsuo Bashō

A mi niña

La luz de mi vida

Agradecimientos:

Al Profesor **Tomás G. Villa** por hacerme parte de un mundo que se ha vuelto mi familia. Por haber depositado su confianza en mí y en mi trabajo. Por su dirección, y por ser mi padre científico.

A la Doctora **Margarita Poza** por su asesoramiento y apoyo a pesar de las dificultades. Y gracias a Roque por dejarle tiempo para corregir.

A **Juan Andrés Vallejo**, mi hermano de otra madre, por ser mi brújula, mi apoyo y mi compadre. Por el tiempo que hemos compartido hombro con hombro, por los roces y por el cariño que nos tenemos.

A **Patricia Veiga**, por los consejos y los momentos que hemos pasado.

A **Sara Tomé**, por ayudarme a hacer más llevaderos los malos tiempos. No hay mal que cien experimentos dure.

A **Koke, Lucía² y José Luis**, por ser mis compañeros durante este largo periodo. A aquellos que ya no están pero estuvieron, y a los que están llegando.

A **David Buceta**, por estar, por no estar, por lo que dices, por lo que piensas, por ser tú. Nunca me he sentido tan completo como cuando estamos juntos, *Domo arigato gozaimasu*.

A **Mauro** por hacer que el tiempo se detenga y se vuelva entretenido. Por los cafés, por los paseos que te has dado para acercarte y por soportar el frío por mis caprichos.

A mi **familia**, por todo lo que me han enseñado, por su confianza y respeto. Por darme un cariño incondicional a pesar de todo, de mis caprichos y mis enfados.

A **Carlota**, la mujer más importante de mi vida, mi amiga, mi compañera, mi esposa. Por aguantarme todos estos años. Nada sería lo mismo sin ti.

A **mi hija**, mi inspiración, mi futuro, mi legado. Por el amor incondicional, por ser lo mejor de mi vida. Por enseñarme como algo tan pequeño puede serlo todo.

A todos aquellos de los que no me acuerdo porque siempre están cuando se les necesita, y por ello son a veces poco valorados, **gracias a todos**.

CCP: fosfato cálcico coloidal.
3.4-DCI: 3.4-dicloroisocoumarina.
BSA: seroalbúmina bovina.
CBS: “*Center for Biological Sequence Analysis*”.
CFS: Factor de esporulación y competencia.
Chap: chaperonas citoplasmáticas.
DFP: Diisopropilfluorofosfato.
DM: peso seco.
DMSO: Dimetil sulfosido.
DTT: Ditioneitol.
DW: Peso húmedo.
E.64: L-3- carboxitrans- 2.3-epoxipropil-leucilamida (4-guanidina) butano
DFP: diisopropilfluorofosfato.
EDTA: etilendiaminotetracético.
EGTA: Ácido etilenglicol tetraacético.
FC: contenido en grasa.
FITC: isotiocianato de fluoresceína.
FTC: tiocarbamoil de fluoresceína.
IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
Kan: kanamicina.
LB: Luria-Bertani.
MALDI-TOF: Desorción/ionización asistida por láser.
MNF: humedad del contenido no graso.
PI: punto isoelectrónico.
PMF: huella peptídica de masa.
PMSF: fenilmetilsulfonilfluoruro.
PS: péptido señal Sec ()
SAP: “*Shrimp Alkaline Phosphatase*”.
TAE: Tris Acetato EDTA.
TCA: ácido tricloro acético.
TEMED: tetrametil etilendiamina.
TLCK: tosil-L-lisina clorometil cetona.
YNB: Base de nitrógeno para levaduras.

Introducción.....	12
1. El queso.....	13
2. La leche.....	14
3. Las Proteasas.....	17
3.1. Serín proteasas.....	19
3.2. Cisteín/tiol proteasas.....	19
3.3. Proteasas Aspárticas.....	19
3.4. Metaloproteasas.....	20
4. El proceso de coagulación de la leche.....	20
5. Cuantificación de la actividad coagulante de la leche.....	22
6. EL GÉNERO <i>Bacillus</i>	25
6.1. <i>Bacillus licheniformis</i>	29
6.1.1 <i>B. licheniformis</i> USC-13.....	32
6.2. Sistema de secreción Sec en el género <i>Bacillus</i>	33
6.3. Proteasas de <i>Bacillus</i>	34
6.3.1. Familia de peptidasas S8 (Familia Subtilisina).....	35
6.3.1.1. Región inhibitoria I9.....	37
6.3.2. Proteasa menor extracelular Epr (3.4.21.--).....	38
7. Expresión de proteínas en <i>Escherichia coli</i>	40
7.1. Cuerpos de inclusión en <i>E. coli</i>	41
7.2. Sistema pET de expresión en <i>E. coli</i>	42
Objetivos.....	45
Materiales y métodos.....	47
1. Cepas y vectores empleados.....	48
1.1. Cepas empleadas.....	48
1.2. Plásmidos utilizados:.....	48
1.2.1 pCR Blunt II TOPO (Invitrogen).....	48
1.2.2. pET30a (Novagene).....	49
1.2.3. pHIL-S1 (Invitrogen).....	50
2. Medios y condiciones de cultivo.....	51
2.1. Cultivo de <i>B. licheniformis</i>	51
2.1.1. Cultivo de <i>B. licheniformis</i> en un fermentador a escala piloto.....	52
2.2 Cultivo de <i>E. coli</i>	54
2.2.1. Cultivo de la cepa recombinante de <i>E.coli</i> con el vector pET30 y el gen preproEpr en un fermentador a escala piloto.....	54
2.3 Cultivo de <i>P. pastoris</i>	55
3. Ensayos enzimáticos.....	56
3.1. Ensayo FTC- <i>k</i> -caseína.....	56

3.1.1. Preparación de los reactivos.....	56
3.1.2. Mezcla de reacción.....	56
3.1.3. Medición de la fluorescencia.....	57
3.1.4. Recta patrón.....	57
3.2. Ensayos cinéticos.....	58
3.3. Ensayos de inhibición enzimática.....	58
3.4. Ensayo FTC-caseína.....	59
3.5 Ensayo FTC- <i>k</i> -caseína vs. FTC-caseína.....	59
3.6. Ensayos de coagulación de leche.....	60
3.7 Determinación de la temperatura y pH óptimos del enzima.....	60
3.8 Localización celular del enzima.....	61
4. Técnicas de proteína.....	61
4.1. Cuantificación de proteína por el método de Bradford.....	61
4.2. Precipitación con sulfato amónico.....	62
4.3. Preparación de las muestras enzimáticas.....	63
4.4. Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE)..	64
4.5. Isoelectroenfoque.....	66
4.6. Cromatografía de intercambio catiónico.....	67
4.7. Cromatografía de exclusión molecular.....	67
4.8 Secuenciación de aminoácidos.....	68
5. Elaboración de las masas queseras.....	68
5.1. Análisis de las masas queseras.....	69
6. Técnicas de manipulación de DNA:.....	70
6.1. Extracción de DNA genómico de <i>B. licheniformis</i>	70
6.2. Amplificación de DNA por PCR.....	71
6.2.1. Oligonucleótidos.....	72
6.3. Precipitación de DNA con fenol cloroformo.....	73
6.4. Electroforesis de DNA.....	74
6.5. Extracción y purificación de DNA a partir de geles agarosa.	74
6.6. Cuantificación de DNA.....	75
6.6.1. Determinación de la concentración de DNA mediante espectrofotometría.....	75
6.6.2. Determinación de la concentración de DNA mediante electroforesis.....	75
6.6.2.1. Empleando DNA del fago λ	75
6.6.2.2. Empleando 2-Log DNA Ladder.....	76
6.6.3. Cuantificación del tamaño de DNA mediante electroforesis	76
6.7. Extracciones de DNA plasmídico.....	77
6.7.1. Extracción de DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979).....	77

6.7.2. Extracción del DNA plasmídico usando el kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen).....	77
6.7.3. Extracción de DNA plasmídico empleando el kit Miniprep Express Matrix (Qbiogene).....	78
6.7.4. Extracción de DNA plasmídico empleando el kit Plasmid Midiprep (Qiagen).....	79
6.8. Ligación vector-inserto.....	79
6.9. Técnicas de clonación de fragmentos de DNA.....	80
6.9.1. Clonación del inserto en el vector pCR Blunt II TOPO.....	80
6.9.2. Clonación en el vector pET30a.....	81
6.9.3. Clonación en pHIL-S1 α	82
6.10. Secuenciación de DNA.....	83
7. Técnicas de transformación.....	83
7.1. Transformación de <i>E. coli</i>	83
7.1.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	83
7.1.2. Transformación por choque térmico.....	85
7.2. Transformación de <i>P. pastoris</i>	85
7.2.1. Preparación de células electrocompetentes de <i>P. pastoris</i> ..	85
7.2.2. Transformación.....	86
7.3. Análisis de los transformantes de <i>P. pastoris</i>	86
7.4. Selección de los transformantes Mut + y Mut s en <i>P. pastoris</i> .	87
8. Expresión de proteínas recombinantes.....	88
8.1. Expresión en <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	88
8.1.1. Obtención de proteínas del interior celular.....	89
8.1.1.1. Rotura por disrupción mecánica:.....	89
8.1.1.2. Rotura por tratamiento enzimático.....	90
8.1.1.3. Protocolo de rotura mecánico-enzimático.....	91
8.1.2. Renaturalización de proteínas.....	92
8.1.3. Activación enzimática.....	93
8.2. Expresión en <i>P. pastoris</i>	93
9. Modelización informática.....	94
10. Análisis estadísticos.....	95
11. Comparación de secuencias.....	95
Resultados.....	96
1. Caracterización parcial de la cepa <i>B. licheniformis</i> USC13.....	97
2. Desarrollo del método FTC- <i>k</i> -caseína.....	98
2.1. Estandarización del método FTC- <i>k</i> -caseína.....	98
2.2. Validación del método FTC- <i>k</i> -caseína.....	99
2.2.1 Linealidad del método.....	99
2.2.2 Estabilidad y sensibilidad del método.....	100

2.3. Determinación de los parámetros cinéticos.....	101
2.4. Ensayos de inhibición.....	102
2.5. Especificidad del ensayo FTC- <i>k</i> -caseína para la medición de la degradación de la <i>k</i> -caseína.....	103
2.6. Análisis de los sustratos FTC-caseína y FTC- <i>k</i> -caseína.....	106
3. Crecimiento microbiano y producción de enzima.....	106
3.1. Producción del enzima en un fermentador de 30L.....	107
4. Determinación de K_m y $V_{máx}$	107
5. Purificación del enzima.....	108
6. Localización celular del enzima.....	110
7. Temperatura y pH óptimos.....	111
8. Elaboración y análisis de las masas queseras.....	112
9. Clonación del gen de la proteasa Epr.....	114
10. Expresión de la proteasa Epr en <i>E. coli</i>	115
11. Modelización de la proteasa.....	119
12. Experimentos de plegamiento y activación de la proteasa.....	122
13. Expresión de la proteasa Epr en <i>E. coli</i> BL21(DE3) en fermentador a escala piloto.....	125
14. Temperatura y pH óptimos del enzima recombinante.....	126
15. Expresión en <i>P. pastoris</i>	128
Discusión.....	130
Conclusiones.....	148
Bibliografía.....	150
Anexo.....	167

Índice de figuras.

Figura 1: Modelización tridimensional de las α S1, α S2, β y <i>k</i> caseínas a partir de los modelos atómicos de Kumosinski <i>et al.</i> , 2009; Farrell <i>et al.</i> , 2009; Kumosinski <i>et al.</i> , 1993 y Kumosinski <i>et al.</i> , 1993b; respectivamente.	15
Figura 2: Modelo de Walstra. (Walstra, 1990).	16
Figura 3: A. Modelo de Holt (Holt y Horne, 1996). B. Modelo de Horne (Lucey, 2002).	17
Figura 4: Distribución de ventas de enzimas. En azul se indica la venta total de proteasas. Modificado de Rao <i>et al.</i> , 1998.	18
Figura 5: Esquema del comportamiento de la leche y el paso a estado gel (Vasbinder <i>et al.</i> , 2003).	21
Figura 6: A. Modelización informática de la superficie molecular de la quimosina. B. Modelización informática de la superficie molecular de la <i>k</i> -caseína. En rojo se resalta el residuo Phe104, en azul el residuo Met105, en blanco la fracción de Para- <i>k</i> -caseína, y en amarillo el caseinomacropéptido.	22
Figura 7: Ensayo clásico de coagulación. A. Medición en placas multipocillo. B. Medición en tubo.	23
Figura 8: A. Isotiocianato de Fluoresceína Isómero I. B. Espectro de emisión del FITC.	24

Figura 9: A. Esquema de una espora bacteriana. Dibujado por Vaike Haas, Universidad de Wisconsin. B. Esporas de <i>Bacillus sp.</i> teñidas con verde malaquita. Cortesía de CDC/ Larry Stauffer, “Oregon State Public Health Laboratory”.	27
Figura 10: Aspecto típico de las colonias de <i>B. licheniformis</i> USC13 en medio Luria-Bertani Agar.	29
Figura 11: Mapa circular del cromosoma de <i>B. licheniformis</i> . Las secuencias codificantes se representan en naranja y azul, dependiendo su orientación. En verde se representa la homología con el cromosoma de <i>B. subtilis</i> (Veith <i>et al.</i> , 2004).	31
Figura 12: Figura esquemática del sistema de secreción Sec en <i>B. subtilis</i> (Tjalsma <i>et al.</i> , 2004).	33
Figura 13: Modelado tridimensional de la subtilisina. PDB 1ST2 (Bott <i>et al.</i> , 1988).	35
Figura 14: Modelización tridimensional del modelo estructural de la familia I9. Amarillo: Inhibidor I9. Azul: Proteasa. PDB 3co0 (Bryan <i>et al.</i> , 2010).	37
Figura 15: Esquema de la preproEpr, destacando los residuos activos. PS: Péptido señal. I9: Inhibidor I9. I09.UPW: región propéptica. S08.126: Región catalítica mínima. (Fuente: MEROPS, Rawlings <i>et al.</i> , 2008).	39
Figura 16: Fotografía de microscopio electrónico de barrido de cuerpos de inclusión de <i>E. coli</i> (Peternel <i>et al.</i> , 2008).	41
Figura 17: Esquema del sistema de expresión pET (Novagene).	43
Figura 18: Dibujo esquemático del vector pCR Blunt II TOPO.	49
Figura 19: Dibujo esquemático del vector pET-30a(+).	50
Figura 20: Dibujo esquemático del vector pHIL-S1.	51
Figura 21: A. Fermentador Braun Biostat C. B. Esquema del fermentador. VE: Entrada de vapor. VS: Salida de vapor. AR: Agua refrigeración. AS: Salida de agua. IC: Intercambiador de calor. B: Bomba. ✕: Válvula.	53
Figura 22: Recta patrón de BSA para la cuantificación de proteína por el método de Bradford.	62
Figura 23: A. Placa de LB con <i>B. licheniformis</i> USC-13. B: Placa de LB con de leche con <i>B. licheiformis</i> USC-13. C: Hidrólisis de <i>B. licheniformis</i> USC-13 sobre LB con leche tras 2, 4 y 7 días de crecimiento.	97
Figura 24: <i>B. licheniformis</i> USC-13 en placa de agar con LB+FeSO ₄ 0.4 g/L tras 24 h a 37° C.	98
Figura 25. Recta de calibrado que relaciona la fluorescencia con la cantidad de (□) FTC-caseína degradada ($Y = 59.232X + 13.64$; $R^2 = 0.993$) y (■) FTC-k-caseína ($Y = 13.464X + 9.0912$; $R^2 = 0.996$). X se refiere a mg de proteína /mL e Y se refiere a los valores de fluorescencia. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados.	99
Figura 26. Actividad específica de las proteasas coagulantes de la leche procedentes de (□) <i>R. miehei</i> ($Y = 46.093X + 4.497$; $R^2 = 0.984$), (■) <i>B. licheniformis</i> ($Y = 2.386X + 5.359$; $R^2 = 0.984$) el extracto de cuajar de (o) <i>B. arnee bubalis</i> ($Y = 0.190X + 3.079$. $R^2 = 0.996$). X se refiere a mg de proteína /mL e Y se refiere a los valores de actividad (U/mL). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados.	100
Figura 27. Efecto del tiempo de incubación y el factor de dilución sobre la actividad enzimática de la proteasa procedente de <i>R. miehei</i> . (□) 1/1.000 ($Y = 0.071X + 0.574$; $R^2 = 0.995$) y (■) 1/10.000 ($Y = 0.020X - 0.431$; $R^2 = 0.995$). X se refiere al tiempo e Y se refiere a los valores de actividad (U/mL). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados.	100

Figura 28. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de; (■) Chymax®, (o) <i>R. miehei</i> , <i>B. arnee bubalis</i> (▲) y (◇) <i>C. cardunculus</i> . Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados.	101
Figura 29. Representación de Lineweaver-Burk de la actividad enzimática de; (■) Chymax® ($Y = 0.072X + 0.629$; $R^2 = 0.995$), (o) <i>R. miehei</i> ($Y = 0.041x + 0.087$; $R^2 = 0.996$), (▲) <i>B. arnee bubalis</i> ($Y = 0.095X + 0.045$; $R^2 = 0.997$), y (◇) <i>C. cardunculus</i> ($Y = 0.058x + 0.256$; $R^2 = 0.993$).	102
Figura 30: Gel de electroforesis de proteínas SDS-PAGE de los sustratos FTC- <i>k</i> -caseína (Calle 1) y FTC-caseína (Calle 2). L: marcador de pesos moleculares. α) α-caseína. β) β-caseína. <i>k</i>) <i>k</i> -caseína	106
Figura 31: Curvas de crecimiento y producción de <i>B. licheniformis</i> USC-13 cultivado en matraz (A) y en un fermentador (B). Actividad enzimática (□) y densidad óptica del cultivo (■). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados.	107
Figura 32: A. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. B. Representación de Lineweaver-Burk de las muestras enzimáticas de <i>B. licheniformis</i> USC-13. ($Y = 0.007X + 0.026$; $R^2 = 0.996$). Las barras de error se corresponden con la desviación estándar de las muestras.	107
Figura 33: Ensayos de coagulación de los extractos de <i>B. licheniformis</i> USC-13 sobre leche en polvo reconstituida. A. Control negativo. B. Muestra semipurificada. C. Muestra total concentrada.	109
Figura 34: SDS-PAGE de las diferentes muestras enzimáticas de <i>B. licheniformis</i> USC-13. A. Calle 1. Muestra concentrada de sobrenadante de cultivo. Calle 2: Muestra enzimática del sobrenadante de cultivo semipurificada con sulfato de amonio. Calle 3. Muestra enzimática procedente de la fracción activa de 35 kDa de la cromatografía de exclusión molecular. Calle 4. Marcador de pesos moleculares. Calle 5: Muestra enzimática procedente de la fracción pI 9.2 del isoelectroenfoque. B. Calle 1: Marcador de peso molecular. Calle 2: Muestra enzimática procedente de la cromatografía de intercambio catiónico. C. Calle 1: Muestra enzimática procedente de la fracción activa de 60 kDa de la cromatografía de exclusión molecular. Calle 2: Marcador de peso molecular.	109
Figura 35: Localización celular de la actividad <i>k</i> -caseinolítica de <i>B. licheniformis</i> USC-13. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar de las muestras.	110
Figura 36: A. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las muestras enzimáticas de <i>B. licheniformis</i> USC-13. ■ Actividad de la muestra de 62 kDa. □ Actividad de la muestra de 34 kDa. B. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de las muestras enzimáticas de <i>B. licheniformis</i> USC-13. ■ Actividad de la muestra de 62 kDa. □ Actividad de la muestra de 34 kDa. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de las muestras.	111
Figura 37: Masas queseras elaboradas con la muestra enzimática semipurificada con sulfato amónico. A: Leche de vaca. B: Leche de búfala. C: Leche en polvo desnatada reconstituida.	112
Figura 38: Electroforesis de DNA. A: Amplificación del gen de la proteasa <i>epr</i> . B: Patrón de bandeo del vector pCR-BluntII TOPO con el gen <i>epr</i> digerido con <i>EcoRI</i> . C: Amplificación del gen de la proteasa <i>epr</i> con dianas a diferentes temperaturas. M: Marcador de peso molecular.	114
Figura 39: SDS-PAGE del extracto total de <i>E. coli</i> BL21(DE3) con pET30a proEpr tras 1 hora post inducción a diferentes temperaturas. CO: Control negativo. Kan-/Kan+:	116

sin y con kanamicina. *Banda del tamaño teórico de la preproEpr. L: Marcador de peso molecular.	
Figura 40: SDS-PAGE del extracto total de <i>E. coli</i> BL21(DE3) con pET30a proEpr tras 3 h de inducción a diferentes temperaturas. CO: Control negativo. Kan-/Kan+: Expresión sin y con kanamicina. *Banda de tamaño teórico de la preproEpr. L: Marcador de pesos moleculares.	117
Figura 41: SDS-PAGE de la fase soluble total de las células <i>E. coli</i> BL21(DE3) con pET30a proEpr tras 3 h de inducción a 24° C. Calles 1, 2 y 3: Cepa control. Calle 1: Tiempo 0. Calle 2: 1 h de inducción. Calle 3: 3 h de inducción. Calle 4: Marcador de peso molecular. Calles 5, 6 y 7: Cepa portadora del vector. Calle 5: Tiempo 0. Calle 6: 1 h de inducción. Calle 7: 3 h de inducción. Flecha negra: Banda proteica control de <i>E. coli</i> . Flecha roja: Banda del peso teórico de la preproEpr.	118
Figura 42: Actividad enzimática específica de la fracción soluble de <i>E. coli</i> BL21(DE3) con pET30a + preproEpr a 24° C y 37° C. Control: Cepa con vector sin inserto. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de los triplicados.	118
Figura 43: Modelización informática de la estructura tridimensional de la proEpr. Destacando los aminoácidos del centro activo. A: vista frontal. B: Vista lateral.	119
Figura 44: Modelización informática de la superficie atómica de la proEpr y su forma activa, destacándose en rojo los aminoácidos del centro activo y en amarillo la sección inhibitoria I9. A: propéptido. B: Estructura de la proteasa madura activa Epr.	120
Figura 45: Representación gráfica de los Qmean para un tamaño de 341 (+/- 10 %) aminoácidos. Comparación de la proEpr con modelos no redundantes del Protein data bank.	121
Figura 46: Representación gráfica de Qmean para un tamaño de 265 (+/- 10 %) aminoácidos. Comparación de la Epr madura con modelos no redundantes del Protein data bank.	121
Figura 47: SDS-PAGE de cuerpos de inclusión renaturalizados y plegados en tampón 20 mM Ca ²⁺ , 200 mM Tris-HCl, pH 7.5 expresados en células <i>E. coli</i> BL21(DE3) con pET30a preproEpr a diferentes concentraciones. Calles 1 y 2: Expresión a 24° C. Calles 3 y 4: 37° C. L: Marcador de peso molecular. Flecha roja: banda de proteólisis. Flecha Negra: tamaño de la Epr activada. Flecha verde: tamaño del propéptido desprendido.	122
Figura 48: Efecto de la concentración de calcio durante el plegado de la preproEpr en 200 mM Tris-HCl, pH 7.5. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de los triplicados.	123
Figura 49: Efecto del tampón sobre la activación de la preproEpr. Muestra 4 h, 24°C. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de los triplicados.	123
Figura 50: Efecto de la concentración de calcio sobre la activación de la preproEpr, 4 h, 24°C en tampón 200 mM Tris-HCl, pH 7.5. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de los triplicados.	124
Figura 51: Efecto de la congelación y la activación de la preproEpr a 4 h, 24°C y en tampón 200 mM Tris-HCl, pH 7.5. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de los triplicados.	124
Figura 52: Curva de crecimiento en fermentador de la cepa <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET30preproEpr. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de los triplicados.	125

- Figura 53: A.** Ensayo de coagulación sobre leche desnatada en polvo reconstituida. **126**
C-: Control negativo tampón con 200 mM de CaCl₂. **M**: Cuerpos de inclusión renaturalizados con 200 mM de CaCl₂. **C+**: Control positivo con enzima comercial de *R. miehei* con 200 mM de CaCl₂. **B.** Masa quesera de leche entera reconstituida. **C**: Masa quesera de leche desnatada reconstituida. Masa quesera de leche entera cruda con Chymax y Epr. Masa quesera de leche entera cruda.
- Figura 54: A.** Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la preproEpr renaturalizada a partir de cuerpos de inclusión. **127**
B: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la preproEpr renaturalizada a partir de cuerpos de inclusión. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar de las muestras.
- Figura 55:** Imagen resultante de la comparación de crecimiento de las colonias de *P. pastoris* transformadas en medio MM para la búsqueda de transformantes Mut+ y MutS. **126**
- Figura 56:** Curva de crecimiento de *P.pastoris* Mut S y Mut+ con el vector pHILS1 + preproEpr inducida con metanol. C-: Cepa portadora de vector sin inserto. **128**
- Figura 57:** Curva de producción de enzima de los clones *P.pastoris* Mut S y Mut+ con el vector pHILS1 + preproEpr. C-: Cepa control portadora de vector sin inserto. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de las muestras. **128**
- Figura 58:** Prueba de coagulación de leche con los sobrenadantes de los clones de *P.pastoris* portadores de la construcción pHILS1-preproEpr. C-: Cepa control portadora de vector sin inserto. CC+: Control positivo de coagulación con enzima comercial. CC-: Control negativo de coagulación (leche+tampón). **129**

1. El queso

Desde la antigüedad el procesado de la leche se ha llevado a cabo con enzimas gástricos de animales. Dependiendo del animal más abundante en el entorno, se conseguían diferentes enzimas. A lo largo del tiempo el proceso se ha ido perfeccionado consiguiéndose diferentes acabados, con distintas características reológicas y organolépticas. Los enzimas de origen microbiano presentan ciertas ventajas frente a los de origen animal o de plantas (Poza *et al.*, 2003). Entre dichas ventajas se encuentran: su menor coste de producción, su mayor diversidad bioquímica o su sencilla manipulación biotecnológica. Las proteasas microbianas representan el 40% del mercado mundial de enzimas (Rao *et al.*, 1998). Muchas de las proteasas microbianas tienen su origen en el género *Bacillus*, ya que los miembros del género *Bacillus* secretan proteasas durante la fase estacionaria de crecimiento y, muchas de ellas, han sido clonadas y caracterizadas (Rao *et al.*, 1998).

El queso se originó en los países cálidos del mediterráneo oriental hace unos 8.000 años. Hay datos que indican el uso de reninas en el antiguo Egipto y en Mesopotamia, y se supone que su descubrimiento fue casual al transportar la leche en odres de animales. Así, el queso se convirtió en uno de los primeros sistemas de conservación de la leche.

Desde la antigüedad se han venido utilizando enzimas naturales para la elaboración de productos lácteos tales como el queso. Los enzimas más utilizados han sido los enzimas gástricos de mamífero y, dependiendo del animal más frecuente en la zona, han ido surgiendo los diferentes tipos de quesos al proporcionar la acción proteolítica de diferentes masas queseras. La composición y características fisicoquímicas de la leche varían según el animal que la produce (Ahmad *et al.*, 2007). Así, hoy en día

existen unas 2.000 variedades de queso diferentes. El proceso de fabricación del queso y sus diferentes variedades están fuertemente estipulados desde la antigüedad. Un ejemplo de esto es el *Codex Alimentarius* donde se distinguen ya variedades como el Emmenthal, Edam o Cheddar (Nilson y Weréen, 2002).

2. La leche

Para poder entender el proceso de elaboración de queso, o el estudio de las proteasas empleadas durante este proceso es necesario el entendimiento de su principal componente, la leche. Su principal función biológica es la de suministrar nutrientes a los lactantes. Para llevar a cabo esta función, las proteínas de la leche se agrupan formando agregados con fosfato cálcico coloidal (**CCP**) que coagulan inmediatamente en el estomago de los lactantes (Phandungath, 2005).

La leche, básicamente, contiene dos tipos de proteínas, las caseínas, que precipitan durante la coagulación de la leche, y las proteínas del suero, que permanecen solubles durante el proceso y se eliminan durante el desuerado de las masas queseras. De estas proteínas solo las caseínas son importantes para la producción del queso. Las caseínas son una familia de fosfoproteínas (α_1 , α_2 , β y k) (Fig. 1) que representan aproximadamente el 80% de las proteínas en la leche bovina (Lucey *et al.*, 2003). Forman agregados solubles donde las moléculas de k -caseína se sitúan en la periferia y estabilizan la estructura micelar. Las caseínas se encuentran en las micelas en una proporción 4:1:4:1.3 y tienen una composición de materia inorgánica que alcanza el 7 %, en su mayoría sales de calcio y fósforo (Walstra, 1990).

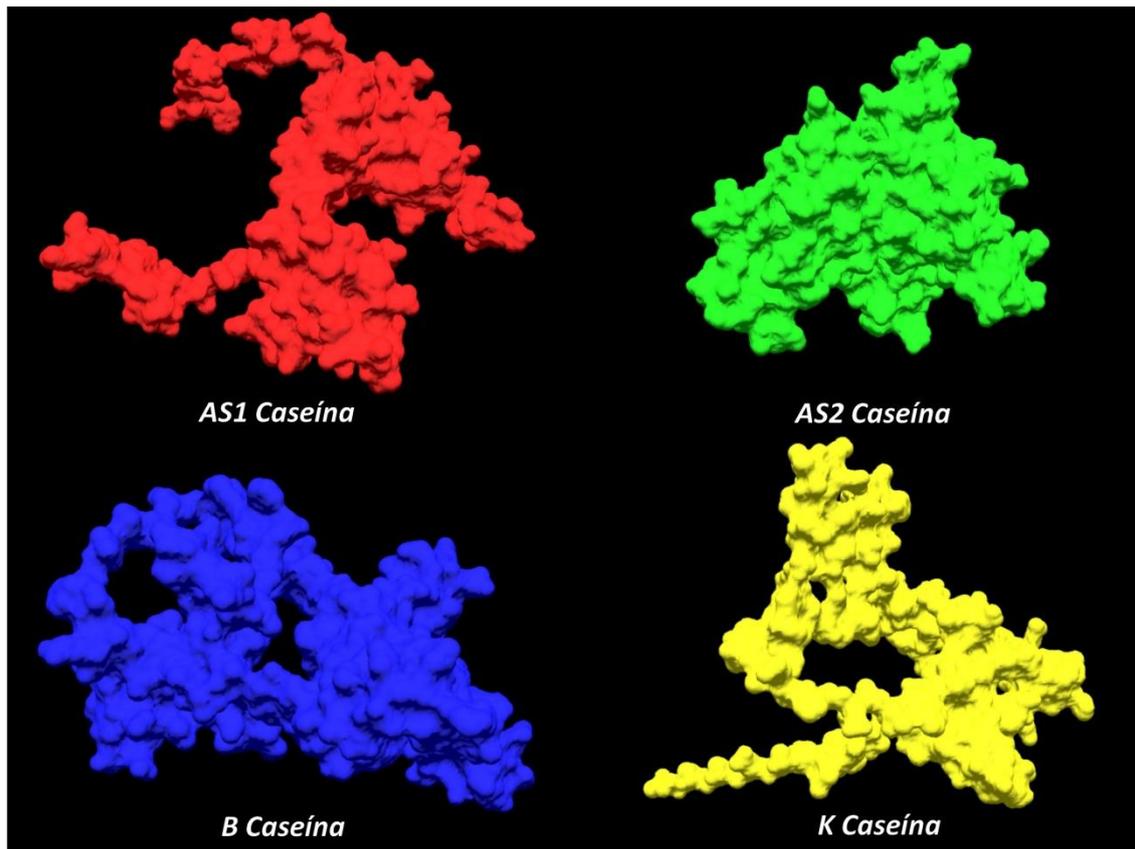


Figura 1: Modelización tridimensional de las α 1, α 2, β y k caseínas a partir de los modelos atómicos de Kumosinski *et al.*, 2009; Farrell *et al.*, 2009; Kumosinski *et al.*, 1993 y Kumosinski *et al.*, 1993b; respectivamente.

Las micelas de caseína son estructuras coloidales de un diámetro aproximado de 500 Å. Las α y β caseínas son insolubles en presencia de calcio y la k -caseína se asocia con estas formando un “coloide protector” que previene la coagulación de las otras proteínas (Carlson *et al.*, 1987c).

Hay múltiples modelos que tratan de explicar la conformación espacial de las micelas de caseínas (Dalgleish, 1998). Uno de ellos propone que el núcleo micelar está formado por múltiples submicelas, y la periferia consiste en microvellosidades de k -caseína (Wastra, 1979) (Fig. 2). Otro de los modelos sugiere que el núcleo de las micelas está formado por fibras de caseína con uniones elásticas con CCP formando un gel (Holt, 1992) (Fig. 3A). Por último, el modelo más reciente (Horne, 1998) (Fig. 3B)

propone que hay un sistema de doble unión sobre las caseínas, donde las proteínas están unidas en las micelas mediante dos tipos de uniones diferentes. Tiene lugar, así, un balance entre las interacciones hidrofóbicas atractivas y la repulsión electrostática. La fuerza hidrofóbica es esencial para la formación de las micelas, mientras que las fuerzas de repulsión limitan el tamaño de las micelas. Las agrupaciones de CCP consolidan la unión entre las caseínas neutralizando las cargas negativas de los residuos de fosfoserina y reduciendo la repulsión electrostática. De este modo, las interacciones hidrofóbicas son las dominantes y es posible la estabilidad de las micelas.

En cualquier caso, a excepción del modelo de Parry y Carrol (1969) (Phandungath, 2005), que postula que la k -caseína se encuentra en el interior de las micelas formando un punto de nucleación para las α S1 y β caseínas estabilizadas por el CCP, los modelos más aceptados consideran a las micelas como partículas coloidales formadas por caseínas, recubiertas de moléculas solubles de k -caseína.

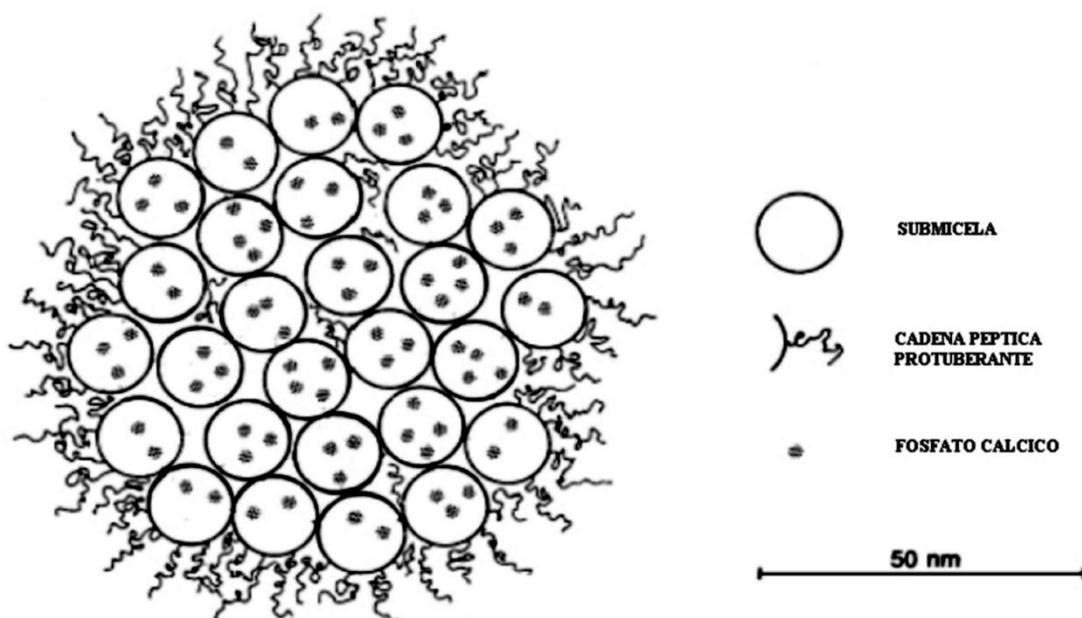


Figura 2: Modelo de Walstra. (Walstra, 1990).

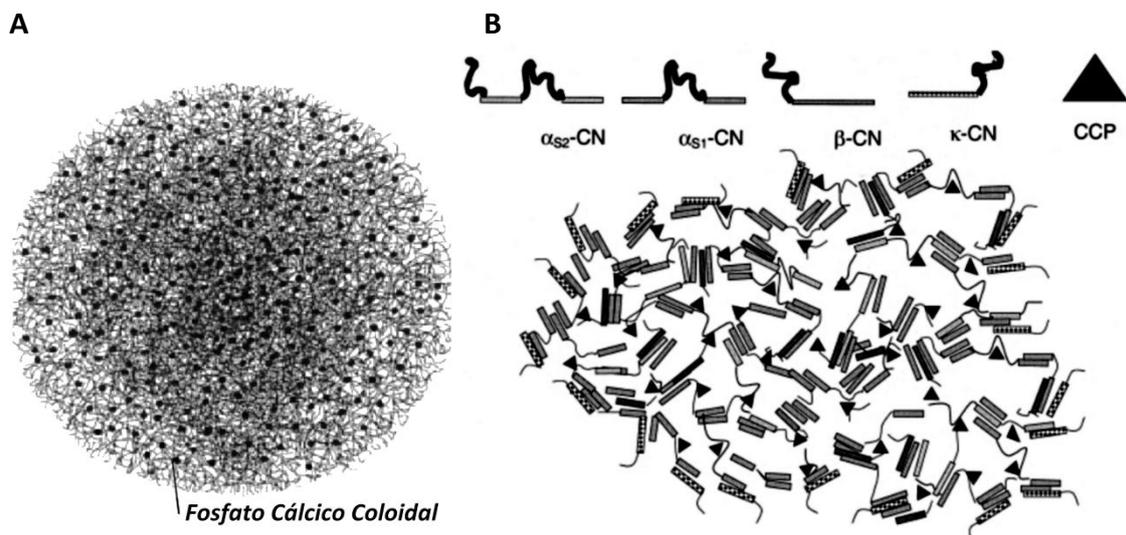


Figura 3: A. Modelo de Holt (Holt y Horne, 1996). B. Modelo de Horne (Lucey, 2002).

Desde mediados de la década de los 70 existe cierto interés en el estudio de la cinética que sigue la coagulación de la leche. Este interés es debido a los cambios que han tenido lugar en la industria quesera; la mecanización, la necesidad emergente de conocer los parámetros de enzimas inmovilizados o la utilización de retenatos de leche ultrafiltrada como material de origen para los quesos.

3. Las Proteasas

Las proteasas son enzimas que actúan sobre otras proteínas degradándolas. Las proteasas son uno de los tipos de enzimas más importantes en lo que a su aplicación industrial se refiere (Fig. 4). Así, se utilizan en la industria de los detergentes, en alimentación, en el procesado de pieles o en la industria farmacéutica (Feijoo-Siota y Villa, 2010). Las proteasas combinan eficacia y especificidad. Normalmente, actúan sobre un número limitado de sustratos, reconociendo un determinado motivo aminoacídico, en unas condiciones de sales y pH determinadas (Gupta *et al.*, 2002).

Los microorganismos producen gran variedad de enzimas, intracelulares y extracelulares. Las proteasas intracelulares son importantes en procesos

metabólicos, tales como la esporulación y la formación de conidios, germinación y diferenciación, recuperación de proteínas, maduración y modificación de enzimas y hormonas, mantenimiento de la reserva de proteínas celulares y en la regulación de la expresión génica (Rao *et al.*, 1998). Las proteasas extracelulares son importantes para la hidrólisis de proteínas en condiciones extracelulares y permiten a la célula la absorción y asimilación de los productos líticos.

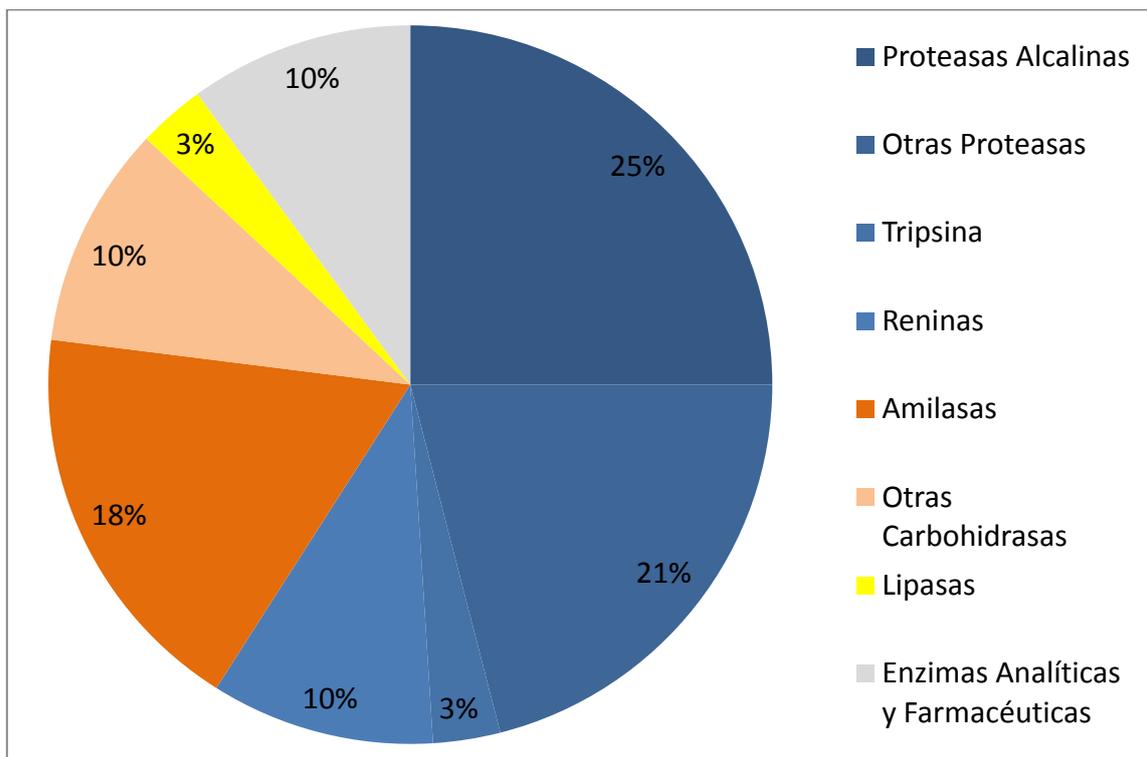


Figura 4: Distribución de ventas de enzimas. En azul se indica la venta total de proteasas. Modificado de Rao *et al.*, 1998.

Las proteasas se clasifican, según la Nomenclatura del *Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (Webb, 1984), como pertenecientes al subgrupo 4 del grupo 3 (hidrolasas). Las proteasas reciben su clasificación, basándose en el tipo de reacción que catalizan, en la naturaleza de su centro activo y en su filogenia.

Según las reacciones que catalizan, se dividen en exopeptidasas, que cortan a las proteínas en lugares cercanos a los extremos carboxi o amino terminal, y en endopeptidasas, que actúan en la zona interna.

Las proteasas se pueden clasificar según los aminoácidos que forman parte de su centro activo (Rao *et al.*, 1998) en:

3.1. Serín proteasas. Se caracterizan por la presencia de un residuo de serina en su centro activo. Las serín proteasas suelen ser activas a pH neutro o alcalino, con un pH óptimo entre 7 y 11. Su masa molecular es muy variable, entre los 18 y 126 kDa. Su punto isoeléctrico (PI) suele estar entre 4 y 6. Las serín proteasas alcalinas son activas a un pH muy elevado, cercano a 10 y con un punto isoeléctrico cercano a 9. Sufren una inhibición irreversible por 3,4-dicloroisocoumarina (3,4-DCI), L-3-carboxitrans-2,3-epoxipropil-leucilamida (4-guanidina) butano (E.64), diisopropilfluorofosfato (DFP), fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) y tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK).

3.2. Cisteín/tiol proteasas. Son un grupo muy variado de proteasas. Su actividad depende de una díada de cisteína e histidina. El pH óptimo suele ser neutro, pero algunas de ellas tienen su rango máximo de actividad en condiciones ácidas. Son susceptibles a ditioneitol (DTT).

3.3. Proteasas Aspárticas. Presentan un residuo de ácido aspártico en su centro activo. Suelen conocerse también como proteasas ácidas. La mayor parte de las proteasas aspárticas tiene su rango de actividad máxima a pH

bajo, de 3 a 4. Su PI está en el rango de 3 a 4.5. Su masa molecular varía de 30 a 45 kDa y sufren inhibición específica por pepstatina.

3.4. Metaloproteasas. Este es el grupo más heterogéneo de las proteasas. Están caracterizadas por su dependencia de un ión metálico divalente para realizar su función catalítica. Debido a esta dependencia son inhibidas por factores quelantes de metales como el EDTA (etilenodiaminotetracético).

4. El proceso de coagulación de la leche

El proceso de coagulación de la leche consiste básicamente en tres fases (Carlson *et al.*, 1987a); i) la degradación enzimática de la *k*-caseína, ii) la floculación de las micelas y iii) la formación del gel. Cada una de las fases sigue una cinética diferente siendo el paso limitante de la coagulación la tasa de degradación de la *k*-caseína. El modelo cinético de la segunda fase del proceso está influido por la naturaleza cooperativa de la agregación de las micelas (Carlson *et al.*, 1987b, Silva y Malcata, 2005) mientras que las propiedades reológicas del gel formado dependen del tipo de proteasa utilizada, del tipo de leche y del patrón de corte de las proteasas (Silva y Malcata, 2005).

El proceso entero está influido por varios factores tales como el pH o la temperatura (Esteves *et al.*, 2003; Vasbinder *et al.*, 2003) (Fig. 5). La variación de estos factores afecta sobre todo a la segunda fase de la coagulación, la floculación de las micelas posterior a la fase enzimática (Carlson *et al.*, 1987c).

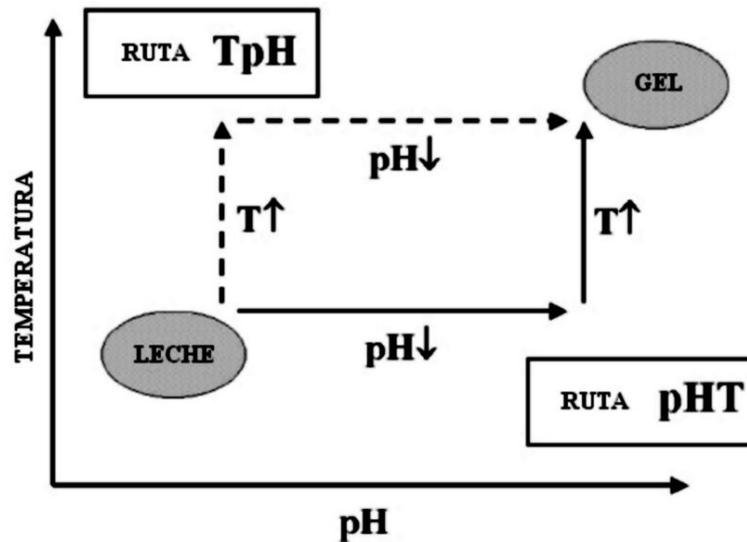


Figura 5: Esquema del comportamiento de la leche y el paso a estado gel (Vasbinder *et al.*, 2003).

Las proteasas que coagulan la leche actúan sobre la porción soluble de las caseínas, la *k*-caseína, lo cual origina una estructura micelar inestable que conduce a la formación del coágulo lácteo (Vasbinder *et al.*, 2003). La quimosina (E.C. 3.4.23.4) es una proteasa aspártica (Fig. 6a) que hidroliza específicamente el enlace en Phe105-Met106 de la *k*-caseína (Fig. 6B). El fragmento mayor de la *k*-caseína, que va desde el aminoácido 1 al 105, conocido como "para-kappa-caseína" (Fig. 6B), queda asociado a la micela, mientras que el fragmento menor, el "caseinomacropéptido" (Fig. 6B), se libera y queda en solución. Tras la coagulación de las micelas, este fragmento permanecerá en el lactosuero. La quimosina se considera la proteasa más eficiente para la industria quesera (Rao *et al.*, 1998). No obstante, existen otras proteasas coagulantes de leche capaces de romper otros enlaces de la cadena de *k*-caseína. Un ejemplo de estas proteasas es la endotiapepsina producida por *Endothia parasitica* (Drohse y Foltmann, 1989). Así mismo, hay otras proteasas, que siendo capaces de romper el enlace Phe105-Met106 de la *k*-caseína, actúan, además, sobre otras

caseínas. Ejemplo de ellas son la proteasas producidas por *Cynara cardunculus* (Lucey *et al.*, 2002; Esteves *et al.*, 2003; Silva y Malcata, 2005) o la quimosina bovina (Kobayasi, 2004). Estos diferentes modos de acción permiten la elaboración de distintas variedades de queso, con cualidades reológicas y organolépticas diversas.

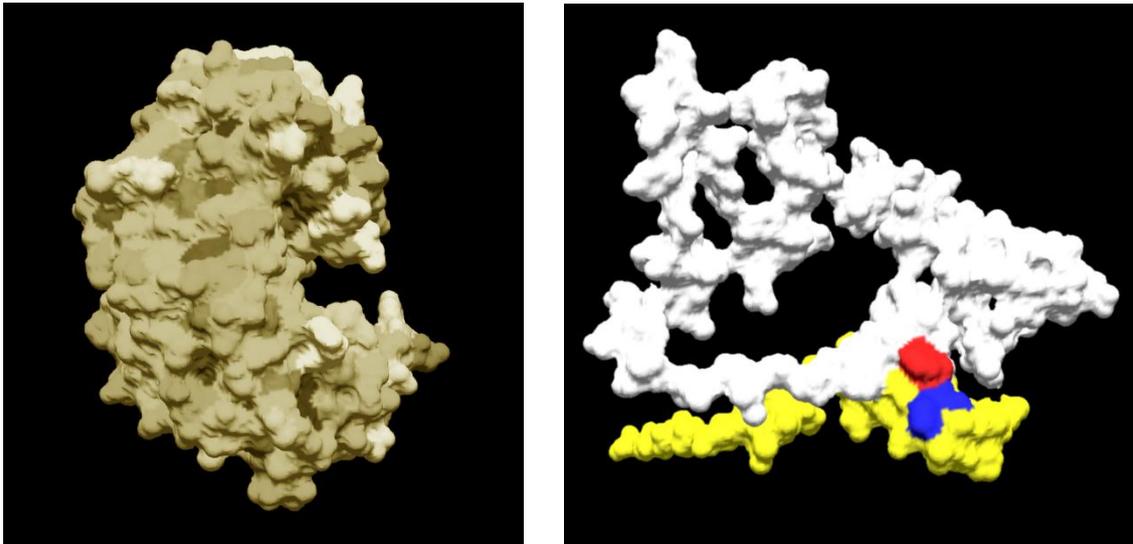


Figura 6: A. Modelización informática de la superficie molecular de la quimosina. B. Modelización informática de la superficie molecular de la κ -caseína. En rojo se resalta el residuo Phe104, en azul el residuo Met105, en blanco la fracción de Para- κ -caseína, y en amarillo el caseinomacropéptido.

5. Cuantificación de la actividad coagulante de la leche

El método convencional para medir la actividad coagulante de un enzima emplea leche como sustrato, y determina su actividad en base al tiempo empleado hasta la aparición del coágulo lácteo (Poza *et al.*, 2003) (Fig. 7). Sin embargo, la coagulación de la leche puede producirse sin la presencia de ningún enzima, debido a factores fisicoquímicos, tales como bajadas de pH o subidas de temperatura (Lucey, 2002; Lucey *et al.*, 2003; Vasbinder *et al.*, 2003) (Fig. 5).



Figura 7: Ensayo clásico de coagulación. **A.** Medición en placas multipocillo. **B.** Medición en tubo.

Como consecuencia de esto, dicho método convencional puede originar resultados confusos e irreproducibles, especialmente cuando se trabaja con enzimas de baja actividad. Del mismo modo, dicho método no es lo suficientemente específico, ya que no consigue definir el momento exacto de la coagulación. Por ello, la determinación de unidades enzimáticas se vuelve difícil. Además, aunque se ha descrito que la degradación de *k*-caseína durante la coagulación de la leche sigue una cinética de Michaelis-Menten (Carlson *et al.*, 1987a), esta es muy difícil de determinar empleando el método clásico dado que la variación de la viscosidad durante el proceso de coagulación no comienza hasta que transcurre un 60 % del tiempo de coagulación (Lucey, 2002).

Para solucionar estos problemas se han propuesto otros métodos alternativos, tales como la medición colorimétrica (Hull, 1947), la determinación de diámetro de halo en agar-leche (Poza *et al.*, 2003), o la determinación del grado de degradación de caseína previamente marcada bien con un isótopo radioactivo (Christen, 1987) o bien con compuestos fluorocrómicos (Twining, 1994). Todos estos métodos utilizan caseína

como sustrato para cuantificar la capacidad proteolítica o la actividad coagulante.

El método FTC-*k*-caseína (Ageitos *et al.*, 2006) utilizado es el resultado de la modificación de un método descrito previamente por Twining (1984). El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es una sustancia fluorescente ampliamente utilizada para el marcaje de proteínas (Schreiber y Haimovich, 1983) (Fig. 8). El grupo isotiocianato reacciona con los grupos amino terminal y las aminas primarias de la proteína formando un derivado tiocarbamoil, tiocarbamoil de fluoresceína (FTC) que queda unido a la proteína (Twining, 1984).

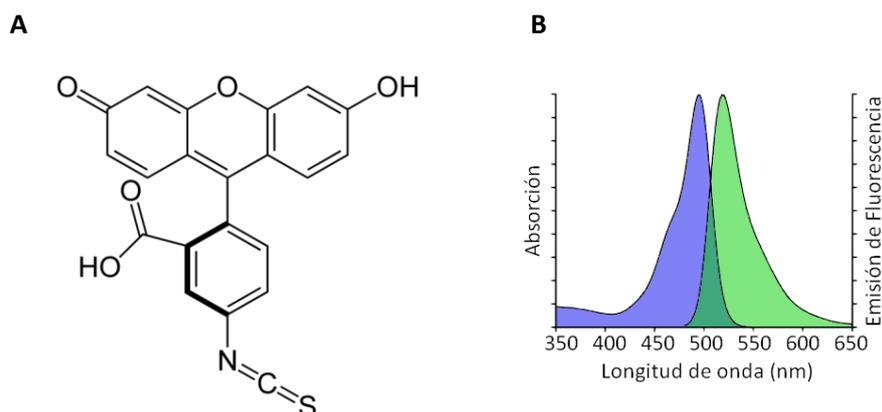


Figura 8: A. Isotiocianato de Fluoresceína Isómero I. B. Espectro de emisión del FITC.

El cambio principal en el método FTC-*k*-caseína consiste en la sustitución del sustrato usado por Twining (1984) (caseína) por *k*-caseína unida con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (**FITC**) para formar su derivado tiocarbamoil de fluoresceína (**FTC**). Esta variación permite la cuantificación de la degradación de las moléculas de *k*-caseína de un modo más preciso y específico, detectando sólo aquellos enzimas capaces de actuar sobre dicho sustrato, y que son, por tanto, susceptibles de producir la

coagulación de la leche. El método descrito por Twining (1984) fue diseñado para detectar la actividad proteolítica de diferentes tipos de proteasas. El método FTC-*k*-caseína permite la caracterización de los enzimas capaces de romper la *k*-caseína. Debido a que la ruptura de la *k*-caseína produce la formación de los coágulos de leche, este método propone la detección, cuantificación y caracterización de enzimas capaces de producir masas queseras útiles para la industria para la elaboración de diferentes tipos de queso.

6. EL GÉNERO *Bacillus*

El género *Bacillus* un género clásico en Microbiología y uno de los más estudiados. Fue descrito por primera vez por Ferdinand Cohn en 1872 a partir de un aislado obtenido de materia orgánica del suelo. Estas bacterias se caracterizan por tener una forma alargada, que simula un bastón, y suelen ser móviles con flagelos peritricos. Más del 90 % de las especies de este género son catalasa positivo, formadoras de endoesporas, móviles y Gram positivo en cultivos frescos (Fig. 9). Forman esporas durante la fase estacionaria de crecimiento, no más de una por célula. El proceso de esporulación no está inhibido por la presencia de oxígeno como en otros géneros como por ejemplo *Clostridium*, pero por la disponibilidad de fuente de nitrógeno. Rebasado el punto de decisión la esporulación tiene lugar irremediablemente (Donohue y Bernlohr, 1978).

Las especies pertenecientes al género *Bacillus* crecen bien en medios sintéticos que contengan azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos como única fuente de carbono y amoníaco como única fuente de nitrógeno. Algunas especies, como *B. megaterium*, requieren factores de crecimiento no orgánico. Otros necesitan aminoácidos y/o vitaminas del grupo B.

Muchos miembros de este género son productores de enzimas hidrolíticas extracelulares que degradan polisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, lo que les permite usar dichos productos como fuente de carbono y donadores de electrones. La mayoría de las especies son mesófilas, con temperaturas óptimas que oscilan entre 30 y 45 °C, pero el género también incluye especies termófilas con una temperatura óptima superior a 65 °C (Todar, 2005).

Las endosporas fueron descritas por primera vez por Ferdinand Cohn en *Bacillus subtilis* y posteriormente por Robert Koch en *B. anthracis*, una bacteria patógena productora del antrax. Cohn demostró la resistencia al calor de las endosporas y Koch describió la formación de la espora. Se denominan endosporas porque se forman intracelularmente. Las endosporas son uno de los tipos celulares más duraderos encontrados en la naturaleza y en su estado de latencia pueden permanecer viables durante largos periodos de tiempo, incluso cientos de años.

La espora bacteriana difiere de la forma vegetativa, por su estructura (Fig. 9A), refracción óptica, composición química y resistencia. Dado su pequeño tamaño, las preparaciones se observan mejor con aceite de inmersión. Las endosporas son muy impermeables a los colorantes, por eso es necesario utilizar métodos de tinción específicos tales como la tinción con verde malaquita (Fig. 9B), o método de Wirtz.

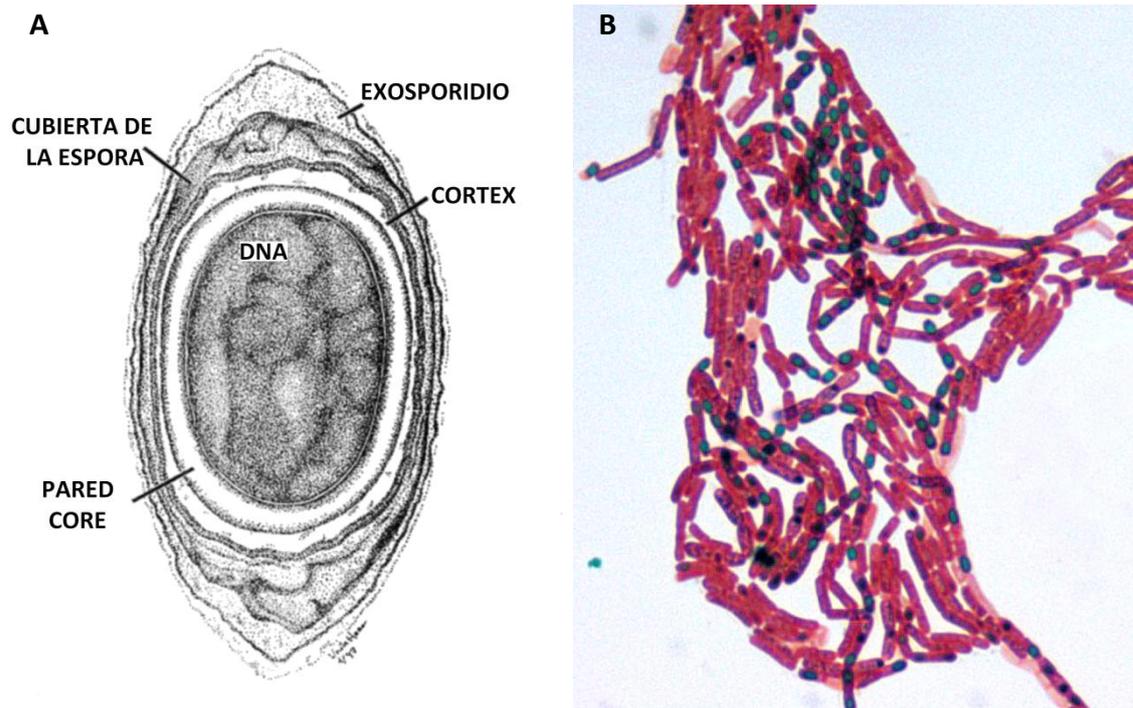


Figura 9: **A.** Esquema de una espora bacteriana de *Bacillus*. Dibujado por Vaike Haas, Universidad de Wisconsin. **B.** Esporas de *Bacillus sp.* teñidas con verde malaquita. Cortesía de CDC/ Larry Stauffer, "Oregon State Public Health Laboratory".

El proceso de formación de la espora se puede dividir en las siguientes fases:

Fase 0: Crecimiento vegetativo de la célula.

Fase I: Presentación; el DNA forma un filamento axial.

Fase II: Septación de los cromosomas resultando en la formación de una célula asimétrica.

Fase III: Absorción de la preespora, la membrana de la espora en formación se desprende completamente de la célula madre y rodea el protoplasto de la espora.

Fase IV: Comienzo de la formación del córtex.

Fase V: Síntesis de la cubierta de la espora.

Fase VI: Desarrollo de la refringencia y la resistencia al calor, maduración de la espora.

Fase VII: Lisis del esporangio y liberación de la espora madura.

El protoplasto de la espora está rodeado de la pared de la célula, el córtex, y este por la cubierta de la espora. Dependiendo de la especie puede estar presente un exosporidio (Fig. 9A). La pared está compuesta por los mismos tipos de péptidoglicanos de la pared de la célula vegetativa. El córtex está compuesto por un único péptidoglicano. La parte exterior de la cubierta de la espora representa del 30 al 60 % del peso seco de la espora (Eyles *et al.*, 2006). Las proteínas de la cubierta de la espora contienen una alta cantidad de cisteína y aminoácidos hidrofóbicos, muy resistentes a los tratamientos de solubilización de proteínas. La resistencia al calor de la espora está atribuida al bajo contenido en agua (menos del 15 %) y a su contenido en ácido dipicolínico (Errington, 1993). Durante las fases III y IV de la esporulación, el ácido dipicolínico entra en el protoplasto de la espora. El Ca^{2+} presente en el espacio periplásmico es transportado activamente al interior de la célula. El Ca^{2+} se queda secuestrado por unión al ácido dipicolínico formándose dipicolinato cálcico. Esto produce la expansión de péptidoglicano y la pérdida de agua por presión.

Donohue y Bernlohr (1978) han demostrado que la esporulación del *B. licheniformis* no sólo ocurre durante la fase estacionaria, sino que también se produce durante la fase exponencial. *B. licheniformis* no rompe las cubiertas durante la germinación, y pertenece al grupo de bacterias que absorben sus cubiertas según la clasificación de Lamanna (Knaysi, 1948).

6.1. *Bacillus licheniformis*

Organismo celular; *Bacteria*;
Firmicutes; *Bacilli*; *Bacillales*;
Bacillaceae; *Bacillus*; grupo *Bacillus subtilis*; *Bacillus licheniformis*.

Clostridium licheniforme

Weigmann 1898; *Denitrobacillus licheniformis* (Weigmann 1898)

Verhoeven 1952; *Bacillaceae*;

Bacillaceae Fischer 1895;

Bacillales; *Bacillales* Prevot 1953;

Bacilli; *Bacillus*; *Bacillus* Cohn 1872;

Bacillus licheniformis; *Bacillus licheniformis* (Weigmann 1898) Chester 1901 (NCBI Taxonomy; Benson *et al.*, 2009).



Figura 10: Aspecto típico de las colonias de *B. licheniformis* USC13 en medio Luria-Bertani Agar.

B. licheniformis (Fig. 10) es una bacteria saprófita ampliamente distribuida que contribuye al ciclo de la materia dada la gran cantidad de enzimas que produce (Claus and Berkeley, 1986). Se considera a esta especie homogénea genéticamente según los estudios de hibridación de DNA realizados por Claus y Berkely (1986). Está considerado como un microorganismo seguro, dado que no se ha encontrado que produzca toxinas (Edberg, 1992) y, aunque puede crecer fácilmente en la piel humana, no se han encontrado evidencias de septicemias ni enfermedades causadas específicamente por este microorganismo. Por ello, ha sido reconocido como microorganismo GRAS (generalmente reconocido como seguro) por la “U.S. Food and Drug Administration” (Sharp *et al.*, 1989).

B. licheniformis se utiliza industrialmente para la producción de enzimas, tales como proteasas y α -amilasas (Priest, 1977). Se ha descrito que es capaz de secretar cantidades de proteína superiores a 25 g/L (Schallmeyer *et al.*, 2004), lo que lo convierte en un microorganismo muy interesante para su estudio.

Este microorganismo produce gran cantidad de enzimas extracelulares tales como proteasas, α -amilasa, penicilinasas, pentosanasas, cicloglucosiltransferasa, β -mananasa y varios enzimas pectinolíticos. Las proteasas producidas por *B. licheniformis* se utilizan principalmente para la industria de detergentes y en el encurtido de cuero (Rey *et al.*, 2004). Las amilasas se utilizan para la hidrólisis del almidón. Ciertas cepas de *B. licheniformis* se utilizan para la producción de antibióticos péptidos, tales como la bacitracina y protricina (Poza *et al.*, 2006). Estos microorganismos pueden ser aislados de suelos y restos vegetales, tienen la morfología típica del género *Bacillus*, son extremadamente móviles en observación de muestras frescas al microscopio.

Durante su crecimiento, *B. licheniformis* puede formar cadenas. Sus colonias en placa se vuelven opacas con superficie roma y áspera, y suelen tener una adhesión muy fuerte al agar (Fig. 10). Es común la formación de excrecencias filiculares, y suele acumular lóbulos mucilaginosos cuando crecen en medios como glucosa agar, o agar glutamato-glicerol, debido a la producción de un glutamil polipéptido que da una forma amorfa a los bordes de la colonia. Este microorganismo produce extracelularmente un levano de sacarosa y rafinosa con interés prebiótico y puede crecer hasta

una temperatura de 55° C. Algunas cepas producen un pigmento rojo (posiblemente pulquerrimina) en medio con carbohidratos si contienen suficiente hierro (Uffen *et al.*, 1972). Los cultivos antiguos tienen tendencia a volverse marrones, produciendo un producto extracelular mucilaginoso y un olor característico.

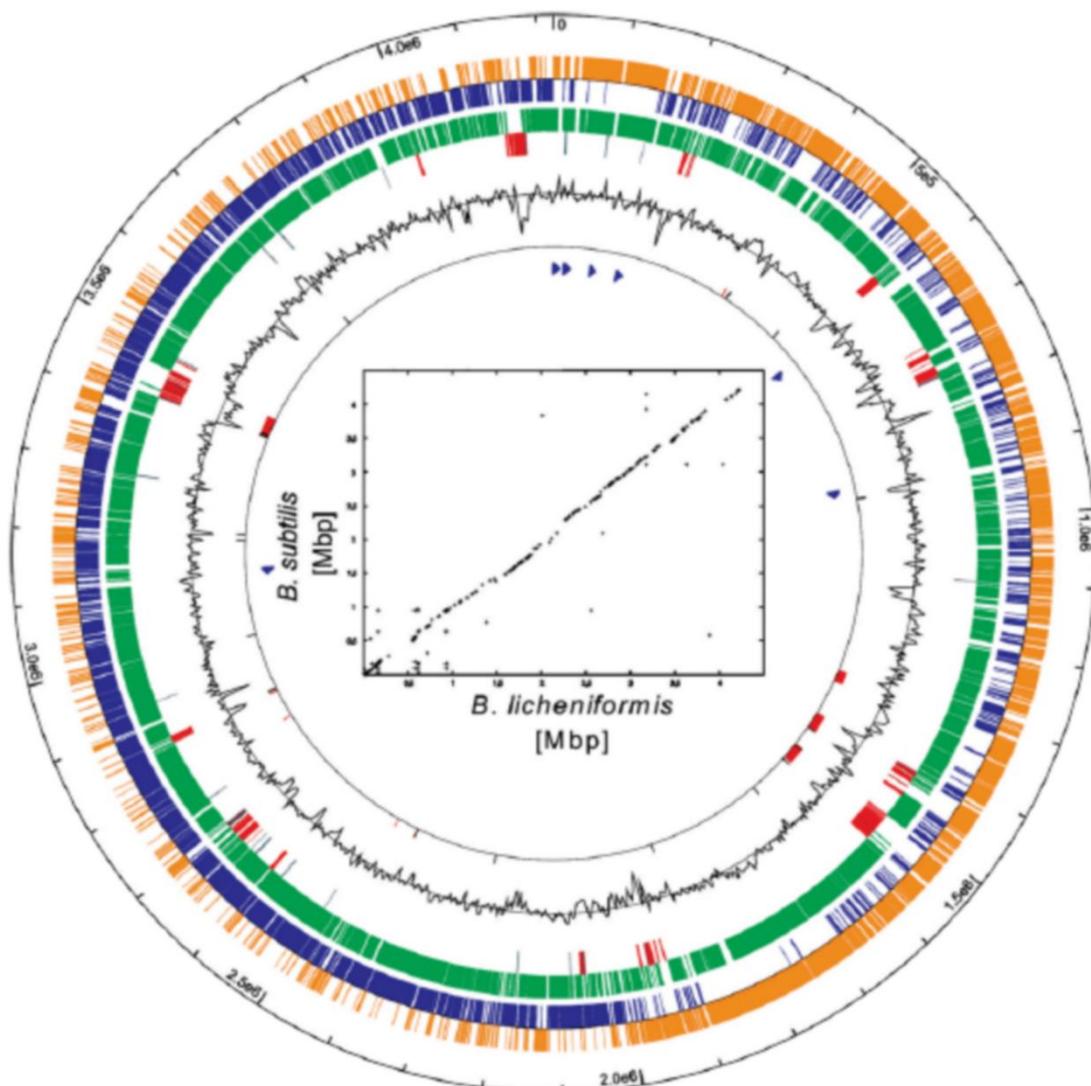


Figura 11: Mapa circular del cromosoma de *B. licheniformis*. Las secuencias codificantes se representan en naranja y azul, dependiendo su orientación. En verde se representa la homología con el cromosoma de *B. subtilis* (Veith *et al.*, 2004).

Se ha descrito que el porcentaje de C+G del DNA varía de 42 a 49 % y los estudios de hibridación DNA-DNA han demostrado que es una especie homogénea genéticamente. El genoma de la especie tipo *B. licheniformis* DSM13/ATCC1458 está organizado en un único cromosoma y tiene una longitud de 4.2 Mb con un contenido de GC del 46.2%. En el año 2004 investigadores de Novozymes (Veith *et al.*, 2004) y de la Universidad de Göttingen (Rey *et al.*, 2004) secuenciaron el genoma de *B. licheniformis* DSM 13 / ATCC 14580. Su genoma consta de 4.222.597-4.222.645 bp, con 4152-4196 secuencias codificantes de proteína, de las cuales 138 están anotadas como peptidasas (Rawlings *et al.*, 2008) (Fig. 11).

6.1.1 *B. licheniformis* USC-13

La caracterización previa de esta cepa (Banet, 2001) mostró que se trata de una bacteria de forma bacilar, Gram positivo, catalasa positivo, esporulada, oxidasa negativo, anaerobio facultativa, ureasa negativo, no hidroliza esculina y no reduce nitrato. Las colonias forman vesículas mucilaginosas en los bordes. Es capaz de crecer en rango de temperatura de 10 a 55°C y muestra un límite de tolerancia al NaCl del 13%. En cuanto a su capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono, se encontraron ciertas diferencias con respecto a la cepa tipo ATTC 14580 (DSM13; NCIB 9375; NCTC 10341). Así, la cepa USC-13 de estudio no crece empleando arabinosa, ni dulcitol, ni manitol, ni sacarosa y sí crece empleando fructosa, lactosa y xilosa, al contrario de lo que ocurre con la cepa tipo. La cepa USC-13 presenta un flagelo en posición subpolar y la tinción con verde malaquita indicó que las esporas se sitúan en una posición subterminal que distiende ligeramente la pared del esporangio. Por medio

de microscopía electrónica de barrido se observó que las esporas son ovaladas y con una hendidura en la zona central.

6.2. Sistema de secreción Sec en el género *Bacillus*

B. licheniformis y *B. subtilis* comparten una fisiología muy similar, los mecanismos de transporte celular y producción de proteínas de *B. subtilis* han sido ampliamente investigados encontrándose gran similitud con *B. licheniformis*. La secuenciación del genoma de *B. licheniformis* (Rey *et al.*, 2004, Veith *et al.*, 2004) describe 296 proteínas con señales aminotermiales de secreción citoplasmática. Muchas de estas señales dirigen las proteínas al exterior celular mediante el mecanismo de secreción Sec (Voigt *et al.*, 2006) (Fig. 12).

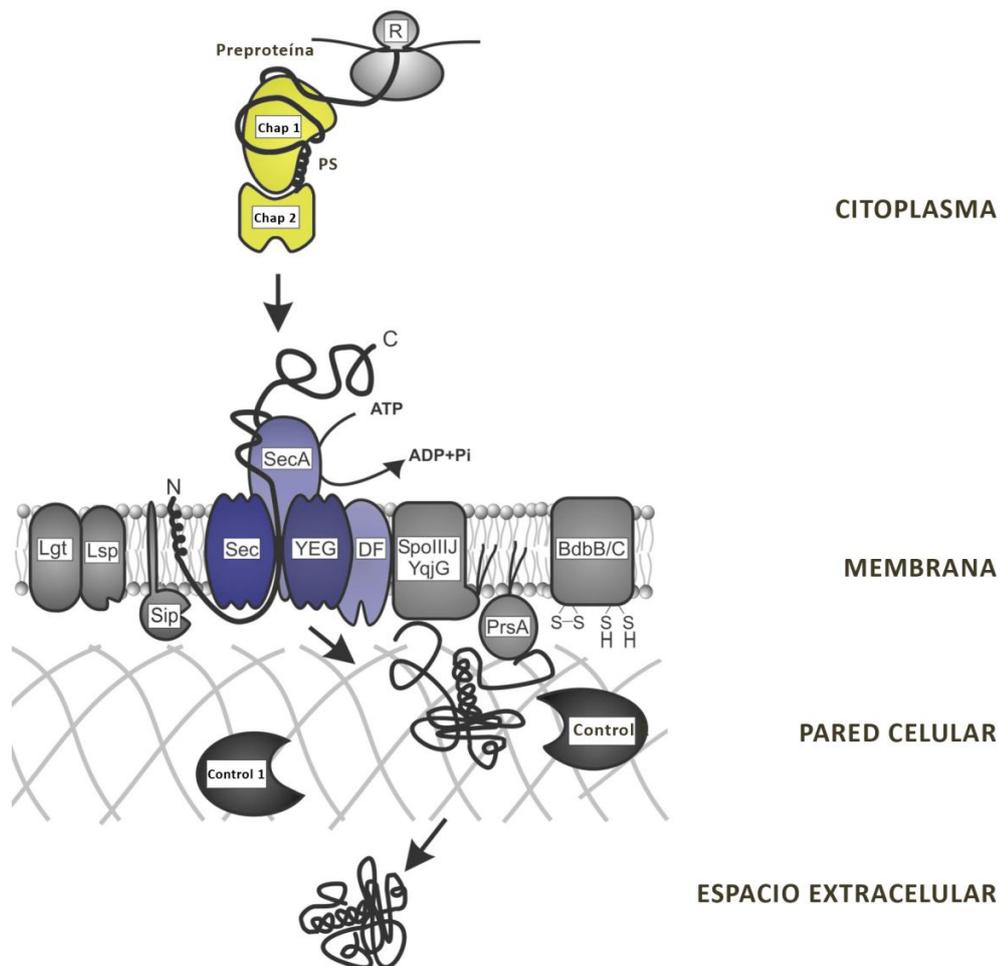


Figura 12: Figura esquemática del sistema de secreción Sec en *B. subtilis* (Tjalsma *et al.*, 2004).

En *Bacillus*, las proteínas secretadas mediante el sistema Sec son sintetizadas como precursores con un péptido señal N-terminal (PS) (Fig. 12). Las chaperonas citoplasmáticas (Chap) mantienen el precursor en una forma soluble y ayudan a su fijación al complejo de translocación de membrana; este complejo se compone de las subunidades SecA, SecY, SecE, SecG y SecDF.

Dependiendo del tipo de proteína, la forma preproteica es digerida por una peptidasa tipo I (Sip) o modificada por la diacilgliceril transferasa (Lgt) y, posteriormente digerida por la proteasa específica de lipoproteínas (Lsp). Los enzimas PrsA (55), BdbBC, y/o SpoIIJ/YqjG están implicados en el correcto plegamiento de la mayor parte de las proteínas. La calidad de la secreción está controlada por otro grupo de enzimas en la pared celular. Una vez traspasada la pared celular, el enzima es secretado en su forma madura (Voigt *et al.*, 2006).

6.3. Proteasas de *Bacillus*

Muchas de las proteasas comerciales, mayoritariamente neutras o alcalinas, son producidas por microorganismos pertenecientes al género *Bacillus*. Este género secreta múltiples proteasas durante la fase estacionaria de crecimiento. La mayor parte de estas proteasas han sido clonadas o caracterizadas (Rao *et al.*, 1998). Muchos de estos enzimas fueron caracterizados como serín-proteasas, cisteín-proteasas o metaloproteasas. Sólo una proteasa de este género se caracterizó como proteasa aspártica atípica, descrita en *B. licheniformis* (Carroll y Setlow, 2005, Poza *et al.*, 2006). Las Subtilisinas constituyen la familia más representativa de *Bacillus*.

6.3.1. Familia de peptidasas S8 (Familia Subtilisina)

Hasta la determinación de la secuencia (Smith *et al.*, 1966) y la estructura (Wright *et al.*, 1969) de la subtilisina (Fig. 12) se dio por supuesto que todas las serín proteasas de este grupo eran del tipo de la quimotripsina. Sin embargo, la subtilisina está claramente diferenciada de la quimotripsina. La familia S8 (Familia tipo peptidasa S08.001- Subtilisina Carlsberg de *B. licheniformis*, MEROPS MER000309), también conocida como familia Subtilasa, es la segunda familia más grande dentro de las serín proteasas. La familia se divide en dos subfamilias de subtilisinas, la Subfamilia S8A, encabezada por la subtilisina (S8.001) y la subfamilia S8B, encabezada por la kexina (S08.070) (Rawlings *et al.*, 2008). El centro activo de los miembros de la familia S8 contiene una triada catalítica con un orden de secuencia Asp, His y Ser, el cual difiere con el de otras familias de serín proteasas (S1, S9 y S10).



Figura 13: Modelado tridimensional de la subtilisina. PDB 1ST2 (Bott *et al.*, 1988).

En la subfamilia S8A, los residuos del centro activo suelen contener los motivos Asp-Thr/Ser-Gly (similar al motivo de secuencia His-Gly-Thr-His y Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Xaa-Pro de la familia de endopeptidasas aspárticas como la pepsina A).

La actividad de la mayoría de los miembros de esta familia S8 es de tipo endopeptidasa, aunque el enzima TPP-II es una exopeptidasa que libera tripéptidos de la parte N-terminal de las proteínas.

La mayoría de los miembros de la familia S8 son activos a pH neutro o a un pH alcalino medio. Muchas peptidasas de esta familia son termoestables. El sustrato típico para estos enzimas es la caseína, y el sustrato artificial de síntesis típico es la estructura aminoacídica Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NHPhNO₂. La mayoría de los miembros son proteasas inespecíficas con una preferencia de corte después de residuos hidrofóbicos. Sin embargo, ciertos miembros de la subfamilia S8B, tales como la kexina y la furina, cortan después de los aminoácidos dibásicos (Rawlings *et al.*, 2008).

La mayor parte de los miembros de esta familia son inhibidos por los inhibidores genéricos de las serín proteasas, tales como el PMSF y el DFP (Diisopropilfluorofosfato). Como muchos de los miembros necesitan la unión de calcio para la estabilidad, se puede observar inhibición con EDTA y EGTA (Ácido etilenglicol tetraacético), inhibidores específicos de las metaloproteasas.

La estructura terciaria típica de una peptidasa S8 consiste en tres capas, consistentes en dos hélices α , entre las que se intercala una lámina β de 7 hebras (Fig. 13). La subtilisina es el modelo estructural del clan. A pesar de las diferencias estructurales, los centros activos de la subtilisina y de la quimotripsina pueden superponerse, lo que sugiere similitudes por convergencia evolutiva más que a una evolución divergente. La estabilidad

térmica se debe, mayoritariamente, a dos sitios de unión a calcio. La mayoría de los miembros de la familia no son proteínas multidominio. Muchos de los miembros bacterianos de esta familia tienen dominios C-terminales esenciales para su secreción.

6.3.1.1. Región inhibitoria I9

La región propeptídica presente en estas proteasas pertenece a la familia de inhibidores I9, entre los que se incluye el inhibidor proteínasa B de *Saccharomyces cerevisiae* y los péptidos de activación de las peptidasas de la familia de la subtilisina (Fig. 13). Los propéptidos de las subtilisinas tienen la función conocida de actuar como chaperonas moleculares, ayudando al plegamiento de la peptidasa madura (Li *et al.*, 1995), pero también actúan como “inhibidores temporales” de estas proteasas (Kojima *et al.*, 1997).

Los inhibidores de peptidasas de esta familia pueden encontrarse como un dominio simple en la proteína (Fig. 14 y Fig. 15), o bien como dominios simples o múltiples que no se encuentran dentro de una proteína. En muchos casos son sintetizados como parte de una proteína precursora más larga, tanto como un prepropéptido o como un dominio N-terminal asociado con la peptidasa inactiva.



Figura 14: Modelización tridimensional del modelo estructural de la familia I9. Amarillo: Inhibidor I9. Azul: Proteasa. PDB 3co0 (Bryan *et al.*, 2010).

El mecanismo de acción de estos inhibidores es variado, algunos inhibidores interactúan directamente con las proteasas utilizando un sistema de cierre no covalente y un mecanismo de llave; otros inhibidores utilizan un sistema de cambio de conformación que altera su estructura y propiedades termodinámicas.

La proteólisis de las pre-proteínas se efectúa *in vivo* por acción de unas convertasas específicas. Hay muchos procesos biológicos importantes que requieren el procesamiento desencadenado por esas enzimas, entre los que se encuentran la síntesis de péptidos hormonales, el procesamiento de proteínas virales o la maduración de receptores.

Los propéptidos inhibidores de proteasas (muchas veces llamados péptidos de activación) juegan un papel importante durante el plegamiento y modulan la actividad del proenzima. El propéptido se encuentra anclado, impidiendo la unión del sustrato a su centro activo, lo que produce la inhibición de la actividad enzimática (Fig. 14). La conformación estructural de estos dominios inhibitorios se encuentra conservada, muchos de estos propéptidos presentan una topología similar, incluso con una baja homología en su secuencia (Tangrea *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 1998). La región del propéptido es un intercalado abierto α antiparalelo β antiparalelo, con dos hélices α y cuatro hojas β con una topología duplicada $\beta/\alpha/\beta$ (Fig. 14).

6.3.2. Proteasa menor extracelular Epr (3.4.21.--)

La proteasa Epr es una de las proteasas expresadas durante la fase estacionaria de crecimiento en *B. subtilis*, representando un 2-4% del

porcentaje total de proteasas durante de esa fase. (Dixit *et al.*, 2002), pertenece a la familia de peptidasas S8 y no es necesaria para el crecimiento o la esporulación (Sloma *et al.*, 1988). Su expresión se ve inhibida catabólicamente por la acción de reguladores de estado de transición (Kodgire *et al.*, 2006). Enzimáticamente, esta proteasa presenta inhibición por PMSF y, a pesar de no ser una metaloproteasa, es inhibida ante concentraciones elevadas de EDTA (Sloma *et al.*, 1988).

Esta proteasa es una de las encargadas del procesamiento de la señal CSF (factor de esporulación y competencia). El CSF es un pentapéptido extracelular transportado a la célula por una permeasa cuando este alcanza un valor umbral en el medio y es capaz de estimular la respuesta *quorum sensing* (Lazazzera *et al.*, 1999).

La expresión de la proteasa Epr en *B. subtilis* está regulada por el promotor σ^D (Dixit *et al.*, 2002). Este promotor regula la motilidad y la producción de autolisinas implicadas en la separación celular y el mantenimiento de la heterogeneidad (Perez-Castor, 2007). La “proteasa menor extracelular” Epr se expresa en forma de prepropéptido, con un péptido señal Sec (PS) de 27 aminoácidos (Fig. 15).

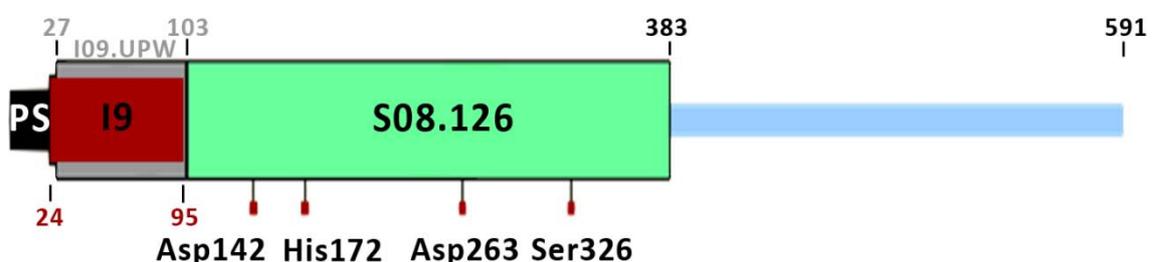


Figura 15: Esquema de la preproEpr, destacando los residuos activos. PS: Péptido señal. I9: Inhibidor I9. I09.UPW: región propéptica. S08.126: Región catalítica mínima. (Fuente: MEROPS, Rawlings *et al.*, 2008).

Esta señal PS dirige la proteasa hasta el espacio periplásmico. *B. subtilis* acumula calcio en esta zona, llegando a concentraciones superiores a 2 mM (Colomer–Pallas *et al.*, 2003). Esta acumulación de calcio es necesaria para la formación de la espora. La proteasa Epr sufre su segundo plegamiento en esas condiciones, tras atravesar el sistema Sec, lo que parece indicar que el calcio presenta un papel importante en el plegado de la misma.

La proEpr presenta un propéptido (28-103 aminoácidos), de modo que la región comprendida entre los aminoácidos 25 y 95 actúa como un inhibidor I9. Esta región es esencial para el plegamiento correcto de la proteasa. La región catalítica mínima de la proteasa se extiende entre los aminoácidos 104 y 383. La región C-terminal 384-591 está implicada en el fenómeno de movimiento en enjambre en *B. subtilis* sobre superficies sólidas, siendo imprescindible para que este se produzca (Gupta y Rao, 2009). Esta región sirve como señal para este fenómeno tras ser separada de la región catalítica, bien por autoproteolisis o por acción de otra proteasa (Dixit *et al.*, 2002). Este tipo de movimiento de agregación se produce a altas densidades celulares y depende de la señalización celular.

7. Expresión de proteínas en *Escherichia coli*

E. coli es uno de los microorganismos más utilizados para la producción de proteínas heterólogas y su genética está ampliamente estudiada (Baneyx, 1999). Las principales ventajas de este microorganismo son su rápido crecimiento en medios de cultivo de bajo coste y la gran cantidad de vectores y sistemas de expresión comerciales que se encuentran a disposición de los investigadores.

Sin embargo, el uso de *E. coli* para la producción de proteínas recombinantes ha encontrado multitud de problemas. Por ejemplo, este microorganismo no es capaz de producir proteínas complejas que contengan puentes disulfuro o proteínas que requieran modificaciones postraduccionales. Por otro lado, las proteínas pueden sufrir procesos de degradación que limitan su estabilidad. La mayoría de las proteínas sobre-expresadas en *E. coli* tienden a agregarse en cuerpos de inclusión, y suelen requerir largos procesos de renaturalización y plegado para volver a ser funcionales (Choi *et al.*, 2006).

7.1. Cuerpos de inclusión en *E. coli*

La sobre-expresión de proteínas en *E. coli* suele conducir a la formación de agregados citoplasmáticos insolubles llamados cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son estructuras amorfas no cristalinas (Fig. 16) que suelen estar formadas principalmente por la proteína de interés (Palmer y Wingfield, 2002).

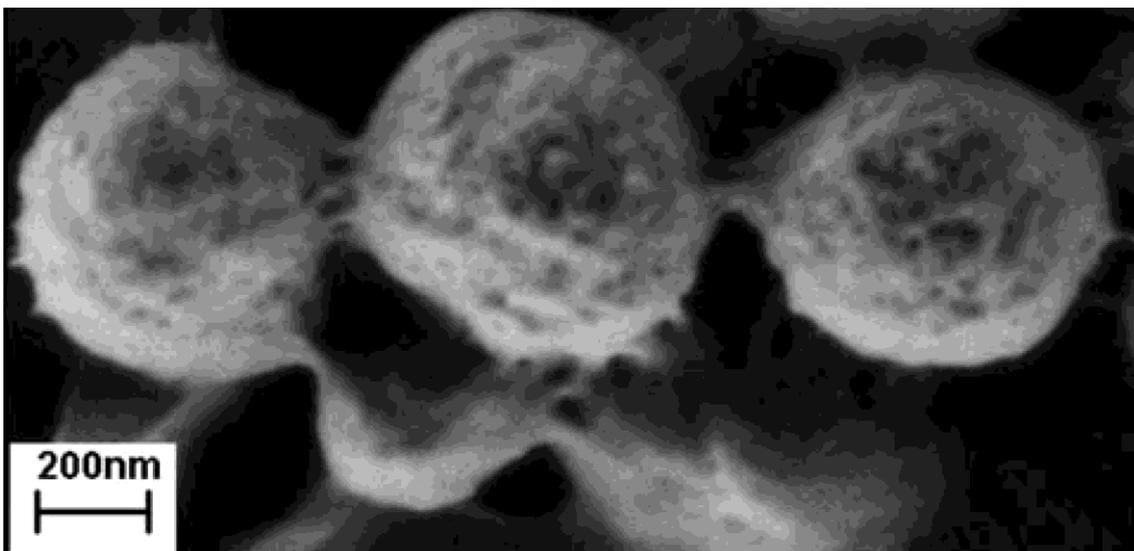


Figura 16: Fotografía de microscopio electrónico de barrido de cuerpos de inclusión de *E. coli* (Peternel *et al.*, 2008).

Al ser fácilmente aislables por centrifugación se suelen utilizar como un sistema para purificar la proteína de interés. La recuperación de proteína activa a partir de los cuerpos de inclusión suele requerir la desnaturalización con un agente caotrópico o ácidos, seguido de un proceso de diálisis o dilución en un tampón óptimo para el plegamiento (Thomas y Baneyx, 1996).

Si bien los cuerpos de inclusión son estructuras amorfas no cristalinas (Fig. 16), hay evidencias de que están formados por agregados de proteínas parcialmente plegadas, llamados intermediarios de plegamiento, que tienen una estructura secundaria similar a la nativa (Oberg *et al.*, 1994). La formación de estos agregados insolubles tiene lugar en un período tardío dentro del proceso de plegamiento de las proteínas en *E. coli*. Así, es posible recuperar la conformación nativa de la proteína si estas estructuras se disgregan y se evita la formación de nuevos agregados.

7.2. SISTEMA pET DE EXPRESIÓN EN *E. coli*

El sistema pET es uno de los sistemas más potentes para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Los genes de interés son clonados bajo el control del promotor del bacteriófago T7. La acción del promotor T7 depende de la RNA polimerasa del fago T7 cuyo gen se encuentra insertado en el genoma de las células de *E. coli* BL21 (DE3). A su vez la T7 RNA polimerasa se encuentra bajo el control del promotor *lac*, inducible por IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) (Fig. 17).

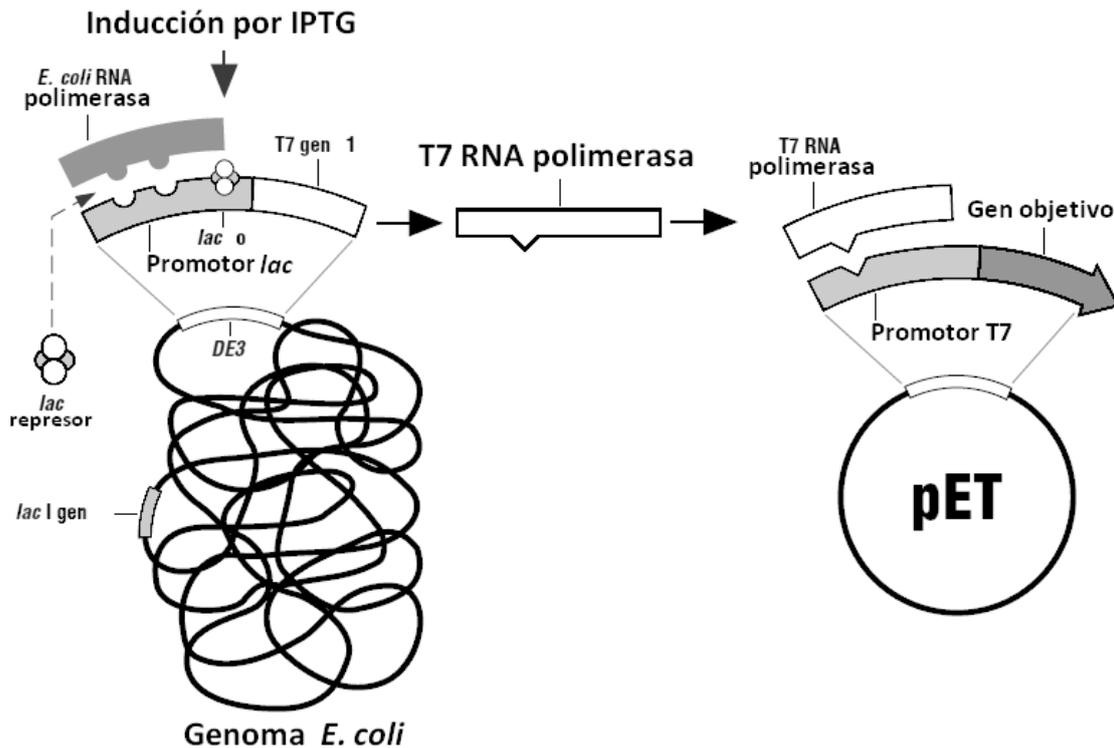


Figura 17: Esquema del sistema de expresión pET (Novagene).

Mediante el uso de este sistema el gen expresado puede llegar a constituir más del 50% de la proteína celular total en pocas horas, aunque este valor se puede reducir disminuyendo la concentración de inductor (IPTG). De esta manera, se consigue incrementar la solubilidad de la proteína a expresar.

El sistema pET requiere que los genes a expresar sean previamente clonados en células de una cepa de *E. coli* que no contenga en su genoma el gen de la T7 RNA polimerasa. Así, se consigue que las células receptoras crezcan sin dificultad, sin tendencia a perder el plásmido por un excesivo gasto energético.

Además, la cepa BL21 (DE3) tiene muy baja capacidad de ser transformada y produce un bajo número de copias plasmídicas, por lo que, el análisis de sus plásmidos se ve dificultado. Por ello, es necesario emplear una cepa

intermedia. Más tarde, las construcciones plasmídicas obtenidas serán empleadas para transformar *E. coli* BL21 (DE3) y, así, lograr la expresión del gen de interés.

OBJETIVOS

1. Purificación y caracterización de la proteasa coagulante de leche producida por *B. licheniformis* USC-13.
2. Desarrollo de un método que permita la medición de la actividad de las proteasas coagulantes de leche de un modo sensible y específico.
3. Clonación y expresión de la proteasa coagulante producida por *B. licheniformis* USC-13 en *E. coli* y *Pichia pastoris*.
4. Obtención de una nueva fuente de proteasa coagulante de leche con aplicabilidad para la industria quesera.

1. Cepas y vectores empleados

1.1. Cepas empleadas

***Bacillus licheniformis* USC13:** Cepa aislada en nuestro laboratorio.

***Escherichia coli* DH5 α :** F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG* ϕ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(rK⁻ mK⁺), λ -.

***E. coli* TOP10:** F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 nupG recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL*(StrR) *endA1* λ -.

***E. coli* BL21(DE3):** F⁻ *ompT gal dcm lon hsdSB*(rB⁻ mB⁻) λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]).

***Pichia pastoris* GS115:** *his4*.

1.2. Plásmidos utilizados:

1.2.1. pCR Blunt II TOPO (Invitrogen)

El vector pCR Blunt II TOPO (Fig. 18) es un vector de clonación que se presenta linealizado, con las DNA topoisomerasas del *Vaccinia* virus unidas a los extremos 3' cada hebra de DNA. El sistema permite la ligación directa a partir de productos de PCR siempre que estos sean de extremos romos. Este vector permite la selección directa de recombinantes por interrupción de la expresión del gen letal de *E. coli ccdB*. Este gen se encuentra unido por el extremo C-terminal a un fragmento del gen *LacZ α* . La ligación de un

inserto interrumpe la expresión del producto de fusión LacZ α -Ccdb, permitiendo que sólo crezcan aquellas colonias recombinantes. Además, este vector permite seleccionar transformantes resistentes a kanamicina y a zeocina. Contiene un origen de replicación para *E. coli*.

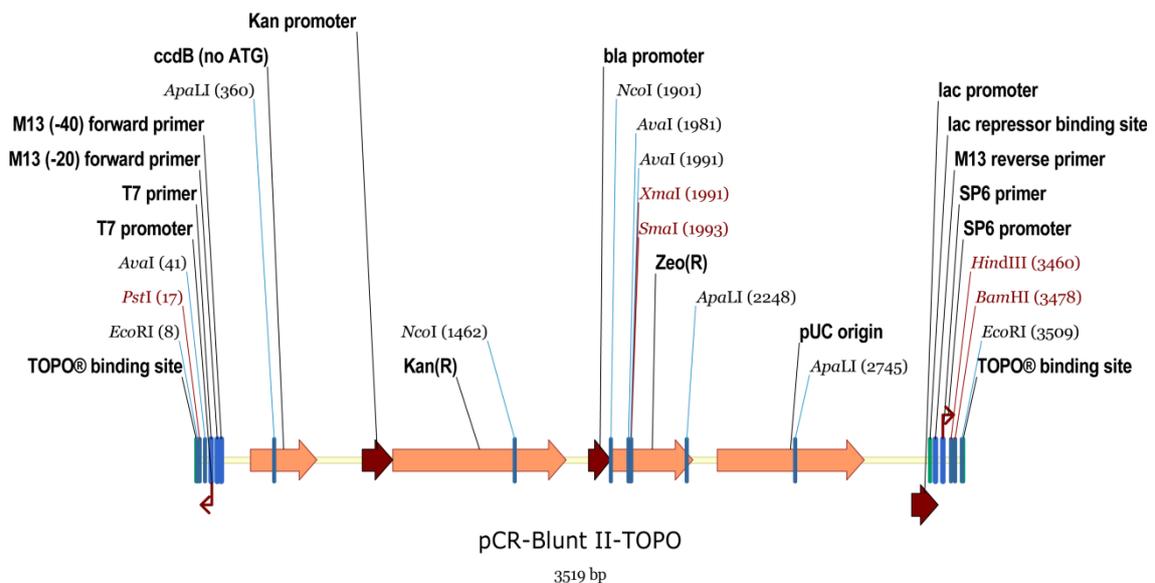


Figura 18: Dibujo esquemático del vector pCR Blunt II TOPO.

1.2.2. pET30a (Novagene)

El vector pET30a (Fig. 19) es un vector de expresión de *E. coli* que contiene un gen de resistencia a kanamicina. Presenta secuencias de colas de histidina en sus extremos C-terminal y N-terminal. Además, presenta secuencias para el reconocimiento de proteasas, lo que permite la purificación del producto proteico y la eliminación de la cola de histidina N-terminal. La diana de restricción *NdeI* permite la expresión de proteínas en su forma nativa.

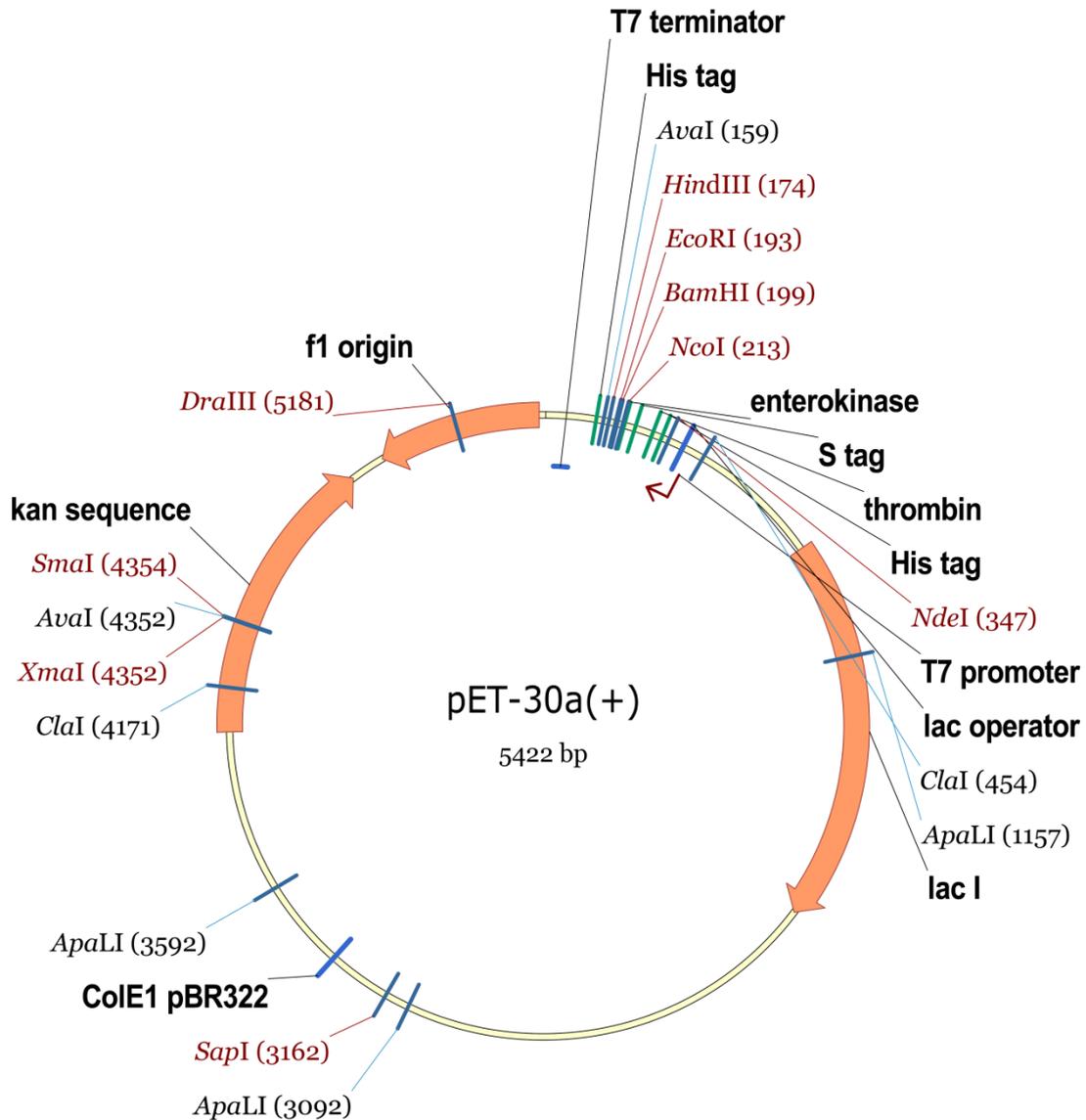


Figura 19: Dibujo esquemático del vector pET-30a(+).

1.2.3. pHIL-S1 (Invitrogen)

Es un vector de expresión con origen de replicación en *E. coli*. Contiene un gen de resistencia a ampicilina, que permite seleccionar transformantes cuando se introduce en *E. coli* y el gen *his4*, que permite seleccionar transformantes cuando es introducido en una cepa de *P. pastoris* auxótrofa para la histidina. Los insertos clonados son expresados bajo el control del promotor AOX1, inducible por metanol. Este vector lleva la secuencia del péptido señal del gen de la fosfatasa ácida de *P. pastoris*

(PHO1), lo cual facilita la secreción de la proteína de fusión al exterior. El inserto clonado debe de conservar la pauta de lectura con dicha secuencia (Fig. 20).

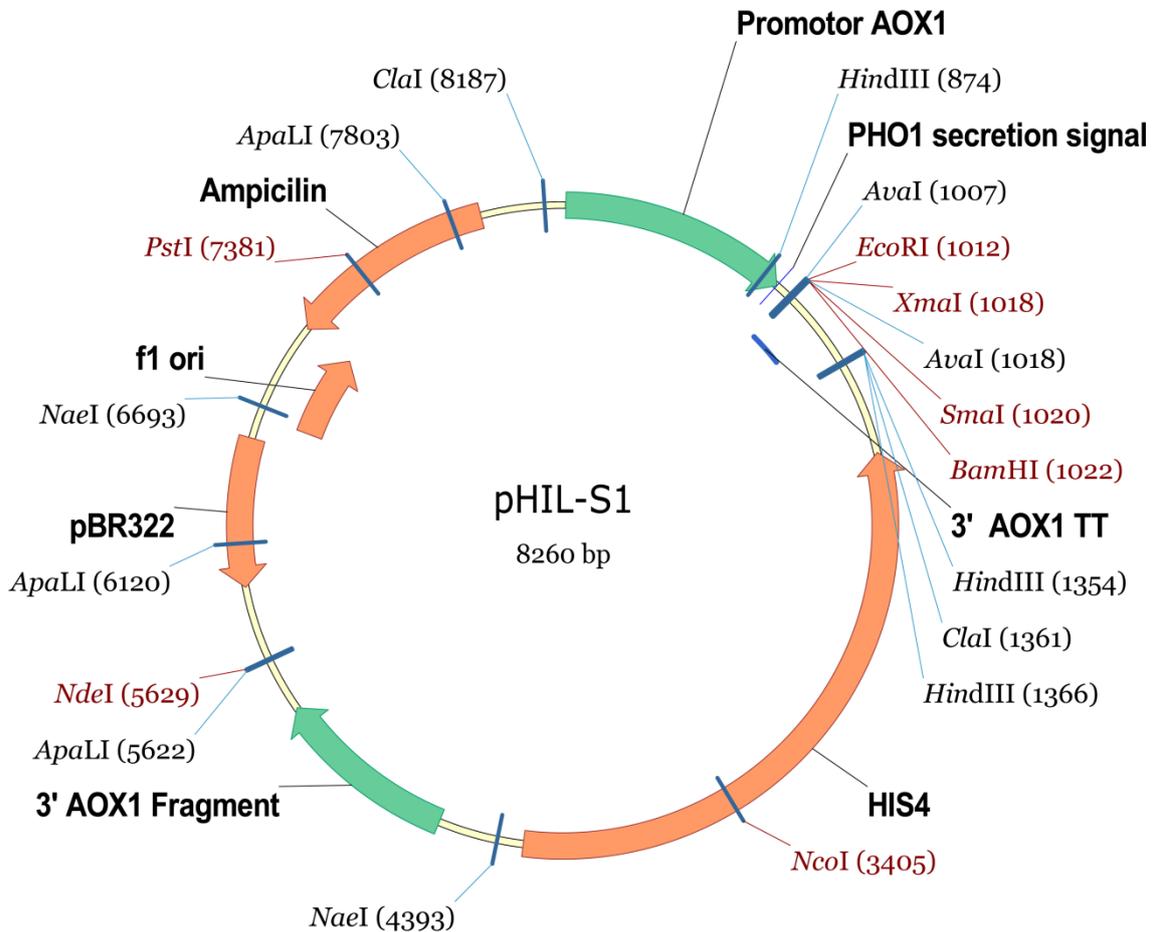


Figura 20: Dibujo esquemático del vector pHIL-S1.

2. Medios y condiciones de cultivo

2.1. Cultivo de *B. licheniformis*

La cepa USC 13 fue cultivada en agitación orbital a 180 rpm y 37°C. El medio de cultivo utilizado de forma rutinaria fue Luria-Bertani (LB) que consiste en triptona (10g/L), extracto de levadura (5 g/L) y NaCl (10 g/L). Se añadió agar al 2% cuando fue necesario.

La cepa fue cultivada en medio mínimo (glucosa 20 g/L, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 10 g/L, urea 3 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.41 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 mg/L y NaCl 50 mg/L) para evaluar la producción.

Los medios fueron inoculados al 1% con un cultivo en fase estacionaria de crecimiento.

B. licheniformis se cultivó en placas de LB con 0.2 g/L y 0.4 g/L de FeSO_4 para evaluar si la cepa produce pulquerrimina.

Se cultivó este microorganismo en placas de LB con un 2 % de leche desnatada en polvo para detectar los halos de proteólisis. Así, se incubó a 37° C durante una semana, y se observó el tamaño y distribución del halo de degradación de la caseína.

Para elaborar las curvas de crecimiento y producción, 2 L de medio LB fueron inoculados con 20 mL de un cultivo en fase estacionaria de *B. licheniformis* USC-13. Durante 9 días se retiraron del cultivo alícuotas de 100 mL. A las muestras se les midió el pH y fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes fueron filtrados a través de membranas de nitrocelulosa GSWP de tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore Corporation, Billerica, MA). El filtrado fue congelado a -20 °C hasta que se utilizó. Durante estos 9 días, 100 μL de diluciones seriadas de cada muestra fueron sembrados en placas de LB agar y estas incubadas a 37°C durante 24 h. La densidad óptica fue estimada a 600 nm con un espectrofotómetro DU-40 (Beckman Instruments, Inc., Irvine, CA).

2.1.1. Cultivo de *B. licheniformis* en un fermentador a escala piloto

Las fermentaciones se llevaron a cabo en un fermentador Biostat C (B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemania) de 30 L de capacidad

(Fig. 21) usando 20 L de medio LB. El medio fue esterilizado *in situ* a 121 °C durante 30 min con agitación suave, siguiendo las instrucciones del fabricante.

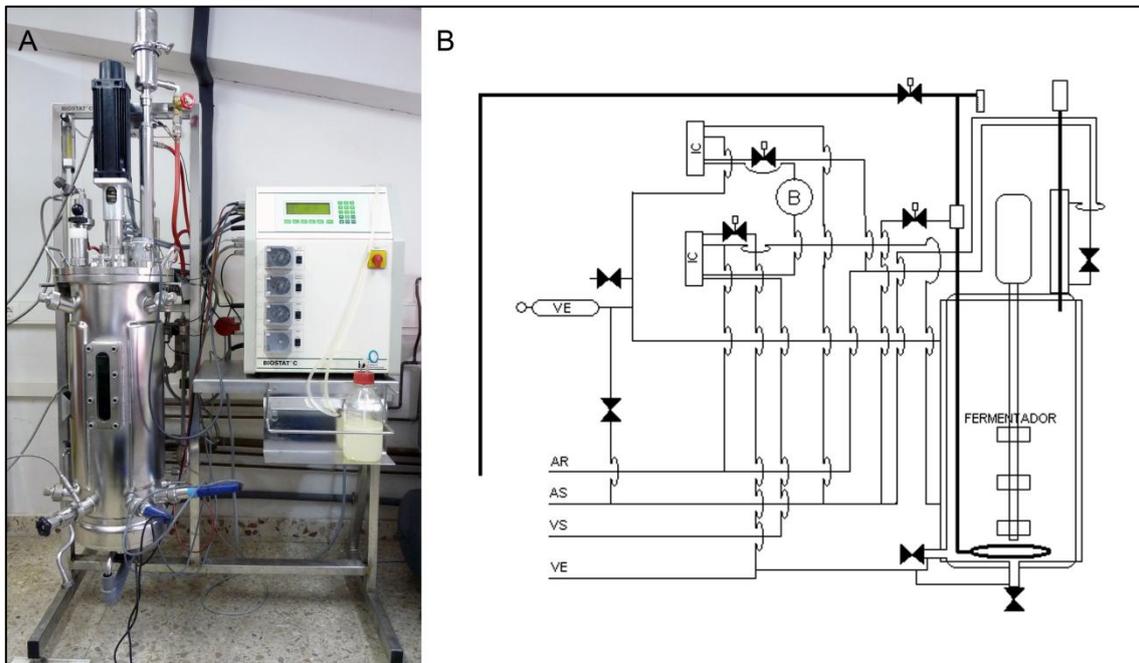


Figura 21: A. Fermentador Braun Biostat C. B. Esquema del fermentador. VE: Entrada de vapor. VS: Salida de vapor. AR: Agua refrigeración. AS: Salida de agua. IC: Intercambiador de calor. B: Bomba. ◀▶: Válvula.

Se realizaron controles de contaminación para evaluar la esterilidad del medio no inoculado.

El inóculo consistió en 1.5 L de cultivo con una densidad celular de 10^5 células por mL.

La fermentación se llevó a cabo con una entrada de aire de 5 L min^{-1} , pH 7 y una agitación de 300 rpm a 37°C. Se añadió un antiespumante (B.Braun Biotech International. Melsungen, Alemania) controlado automáticamente por el fermentador. El flujo de aire y la agitación se incrementaron cuando aumentó la demanda biológica de oxígeno. Se obtuvieron muestras durante 24 h para determinar el pH, la densidad celular y la actividad

enzimática. Las células se cosecharon empleando una centrifuga de flujo continuo de alta velocidad Modelo CEPA GLE (New Brunswick Scientific, USA).

2. 2. Cultivo de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* empleadas se cultivaron de forma rutinaria en medio LB. Este medio fue suplementado con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o zeocina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cuando se transformaron las células con un plásmido que confería resistencia a alguno de estos antibióticos. El contenido en sal se redujo a la mitad cuando se utilizó zeozina.

Medio SOC: 2% Triptona, 0.5 % Extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 y 20 mM glucosa.

El medio de cultivo SOC se empleó para realizar el protocolo de transformación con la cepa One Shot TOP 10 siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, las células se mantuvieron 1 h en este medio previamente a su siembra en placas de LB kanamicina.

Los medios sólidos se elaboraron añadiendo agar bacteriológico al 2 %. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 1.1 atm y 20 min. *E. coli* se cultivó a 24, 30 y 37 °C a 180 rpm, según necesidades.

2.2.1. Cultivo de la cepa recombinante de *E.coli* con el vector pET30 y el gen preproEpr en un fermentador a escala piloto.

Con el objetivo de obtener suficiente enzima para realizar estudios sobre masas queseras, se procedió al cultivo en un fermentador a escala piloto de la cepa recombinante de *E. coli* pET30-preproEpr.

La fermentación se llevó a cabo en un fermentador Biostat C (Fig. 20) (B. Braun Biotech International. Melsungen, Alemania) de 30 L de capacidad usando 10 L de medio de cultivo FLB glucosa (10 g/L triptona, 20 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl y 5 g/L de glucosa). El medio fue esterilizado *in situ* a 121° C durante 30 min con agitación suave, siguiendo las instrucciones del fabricante. El inóculo consistió en 1 L de medio LB con kanamicina. La fermentación se llevó a cabo con una entrada de aire de 10 L min⁻¹, pH 7 y una agitación de 300 rpm a 28 ° C. El flujo de aire, la agitación y la temperatura se modularon para controlar el crecimiento. Se añadió glucosa al 60% de modo continuo durante las primeras 22 h. Posteriormente, se indujo la expresión del gen preproEpr con lactosa (37 %) hasta el fin de la fermentación (41 h). Las células se cosecharon empleando una centrífuga de flujo continuo de alta velocidad modelo CEPA GLE (new Brunswick Scientific, USA). El precipitado celular se empleó para los protocolos de purificación de proteína.

2. 3. Cultivo de *P. pastoris*

Para el cultivo habitual de *P. pastoris* se emplearon los siguientes medios:

YPD: 2 % peptona, 1 % extracto de levadura y 2 % glucosa.

MD: 1.34 % YNB (sin aminoácidos), 4 x 10⁻⁵ % biotina y 2% dextrosa.

MM: 1.34 % YNB (sin aminoácidos); 4 x 10⁻⁵ % biotina; 0.5 % metanol.

En el caso de los medios MD y MM sus componentes fueron esterilizados por filtración (0.22 µm) y añadidos al agua destilada estéril a la concentración indicada.

MGY: 1.34 % YNB (sin aminoácidos); 4 x 10⁻⁵ % biotina; 1 % glicerol.

Los medios sólidos se elaboraron añadiendo agar bacteriológico al 2 %. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 1.1 atm y 20 min.

Las condiciones de cultivo para *P. pastoris* fueron 30 °C y 200-300 rpm, según necesidades.

3. Ensayos enzimáticos

3.1. Ensayo FTC-*k*-caseína

3.1.1. Preparación de los reactivos

El ensayo se llevó a cabo según lo descrito por Twining (1984) por triplicado con ciertas modificaciones. Un gramo de *k*-caseína (Sigma-Aldrich, USA) se disolvió en 100 mL de tampón carbonato 50 mM, pH 9.5 y NaCl 150 mM. Posteriormente, se añadieron 40 mg de FITC (Sigma-Aldrich, USA) a la disolución y la mezcla fue agitada durante 1 h a temperatura ambiente. El FITC libre se eliminó por diálisis frente a 1 % de carbón activo en agua. Posteriormente se dializó frente a tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8.5, y por último, frente a tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. Todas las diálisis se mantuvieron durante toda la noche. La cantidad de proteína se ajustó al 0.5 % con tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. El sustrato se guardó en alícuotas de 1 mL a – 20 °C.

La cantidad de FITC unido a la *k*-caseína, 14.12 μ g por mg de sólido, fue determinada por comparación del sustrato obtenido con un sustrato comercial, isotiocianato de fluoresceína tipo III, que contiene 61 μ g de FITC por mg de sólido (Sigma-Aldrich, USA).

3.1.2. Mezcla de reacción

La mezcla de reacción contenía 10 μ L de la muestra enzimática, 20 μ L de tampón fosfato potásico 0.01 M, pH 6.0 y 20 μ L de FTC-*k*-caseína al 0.5 %.

La reacción se llevó a cabo en tubos Eppendorf y en agitación (180 rpm) a 37 ° C durante un tiempo que varió desde 15 hasta 185 min, dependiendo del experimento. La reacción se detuvo una vez añadidos 120 μ L de ácido tricloro acético (**TCA**) frío. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante como mínimo 1 h. Las proteínas se precipitaron por centrifugación durante 10 min a 14.000 rpm. Se añadieron 60 μ L de sobrenadante a 400 μ L de tampón Tris-HCl 0.5 M, pH 8.5.

3.1.3. Medición de la fluorescencia

Se midió la fluorescencia de una muestra de 350 μ L de la reacción anterior en placas de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) empleando un fluorímetro robotizado (Luminiscence Spectrometer LS50B, Perkin Elmer, USA) con una apertura numérica de 2.5 y a unos valores de longitud de excitación y de emisión de 490 y 525 nm, respectivamente.

Los niveles de fluorescencia basal fueron sustraídos de los resultados para determinar la cantidad de fluorocromo liberado. Los valores de proteína total fueron determinados mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.1.4. Recta patrón

Se realizó una recta patrón relacionando los valores de fluorescencia obtenidos con la cantidad FTC-*k*-caseína degradada. Se tuvo en cuenta que el FTC fue liberado después de la proteólisis de *k*-caseína y se midió su fluorescencia. Para ello, se incubaron cantidades crecientes del sustrato, FTC-*k*-caseína, en presencia de tripsina un tiempo suficiente para que

tuviese lugar la completa degradación del sustrato (1 h). Así, se obtuvo la relación entre la fluorescencia y la cantidad de FTC-*k*-caseína degradada (Fig. 25).

Se definió la unidad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 μg de FTC-*k*-caseína en 1 h a 37 ° C.

Así, a partir de los valores de fluorescencia emitida, se extrajeron los datos de actividad de las proteasas, empleando la ecuación de la recta patrón.

Para demostrar la precisión y la especificidad del método descrito, se llevaron a cabo estudios cinéticos y de inhibición.

3.2. Ensayos cinéticos

Como es habitual, la curva de Michaelis-Menten (Dixon y Webb, 1979) se llevó a cabo modificando las concentraciones de sustrato que variaron entre 0.087 y 1.74 mg/mL.

3.3. Ensayos de inhibición enzimática

Las muestras enzimáticas obtenidas a partir del cultivo de *B. licheniformis* y del cuajar de *B. arnee bubalis* se sometieron a estudios de inhibición usando los inhibidores de proteasas descritos por Rao *et al.*, (1998); pepstatina A, ditioneitol (**DTT**), phenilmetilsulfonilfluoro (**PMSF**), todos de Sigma-Aldrich (USA) y ácido etilendiamidatetraacético (**EDTA**) de Merck (Alemania). El PMSF, el DTT y la pepstatina A se disolvieron en 100 % etanol. Las muestras enzimáticas se incubaron 40 min en presencia de los inhibidores, tal como describen Croux *et al.*, (1990). La concentración final de los inhibidores fue de 1 mM para los casos de DTT, PMSF y EDTA, y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la pepstatina A. Las muestras enzimáticas, previamente

tratadas con el inhibidor, se sometieron al ensayo FTC-*k*-caseína. Se llevaron a cabo controles sustituyendo el inhibidor por etanol en todos los casos, excepto para el EDTA.

3.4. Ensayo FTC-caseína

Se llevó a cabo tal como describió Twining (1984). El sustrato usado fue el isotiocianato de fluoresceína III, (Sigma-Aldrich, USA). El método consistió en la determinación de la actividad proteolítica mediante la medición de la cantidad de fluorocromo liberado tras la degradación de la caseína. Los valores de fluorescencia fueron medidos tal como se describió anteriormente para el ensayo FTC-*k*-caseína. Se realizó una recta de patrón siguiendo la misma estrategia descrita para el ensayo FTC-*k*-caseína (Fig. 25).

3.5. Ensayo FTC-*k*-caseína vs. FTC-caseína

Para realizar la comparación entre ambos métodos se midió la actividad de una proteasa de acción específica, que actúa sólo sobre la *k*-caseína (proteasa de *Rhizomucor miehei*) y una proteasa capaz de degradar cualquier proteína con la secuencia lisina-arginina (tripsina). Ambos enzimas fueron incubadas en presencia de FTC-caseína o FTC-*k*-caseína, y la fluorescencia fue medida siguiendo los métodos anteriormente descritos. Esto permitió la comparación entre los valores de actividad usando la ecuación lineal; $Y = 3.6949X$ ($R^2 = 0.9981$), donde x se refiere a las unidades de FTC-caseína e y se refiere a las unidades de FTC-*k*-caseína. Los datos fueron comparados usando los análisis estadísticos que se describen en la sección 10.

3.6. Ensayos de coagulación de leche

Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando como sustrato leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana, España) reconstituida al 26% (p/v) en tampón 0.01 M fosfato potásico, pH 6.0.

Las reacciones enzimáticas se realizaron por triplicado a 37 °C en tubos de vidrio con 200 µL de muestra enzimática y 200 µL de sustrato, o 150 µL de enzima y 150 µL de sustrato cuando se realizaron en placas de 96 pocillos. Los coágulos de leche se observaron al voltear los tubos o placas.

3.7 Determinación de la temperatura y pH óptimos del enzima

Se realizó la medición de la actividad enzimática por el método FTC-k-caseína anteriormente mencionado. Las reacciones enzimáticas fueron sometidas a diferentes temperaturas (desde 10 hasta 40 ° C). Para la determinación del pH óptimo, las muestras fueron previamente sometidas a diferentes valores de pH (desde 4.0 hasta 8.0). Los diferentes tampones utilizados fueron 0.01 M fosfato potásico y 0.01 M Tris-HCl para los rangos 4.0-6.0 y 6.0-8.0 respectivamente.

Se realizó la medición de la actividad enzimática por el método FTC-k-caseína anteriormente mencionado añadiendo 200 mM CaCl₂ como activador cuando se midió la actividad de la proteasa recombinante. Las reacciones enzimáticas fueron sometidas a diferentes temperaturas (desde 10 hasta 60 ° C). Para la determinación del pH óptimo, las muestras fueron previamente sometidas a diferentes valores de pH (desde 3.0 hasta 9.0). Los diferentes tampones utilizados fueron 0.01 M acético acetato,

0.01 M MOPS y Tris-HCl para los rangos 3.0-6.0, 6.5-7 y 7.5-9.0 respectivamente.

3.8. Localización celular del enzima

La cepa USC13 se cultivó en matraces por lo menos durante 5 días en 1 L de LB a 37 °C. La masa celular obtenida fue dividida en dos porciones idénticas y se procedió a realizar el protocolo descrito por Villa *et al.*, (1975). Una porción fue centrifugada y resuspendida en 30 mL de 1 mM KH_2PO_4 (pH 7.6). Las células se trataron a 4000 rpm durante 3 min empleando un homogeneizador enfriado con CO_2 (I)(Braun MSK, Melsungen, Alemania) en presencia de perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro. Los restos celulares fueron retirados por centrifugación a 8000 rpm, y se midió la actividad proteolítica específica del sobrenadante. Las células de la otra porción fueron resuspendidas en 0.1 M HCl e incubadas durante 1 h a 18°C. Posteriormente, las células fueron lavadas y resuspendidas en el mismo tampón y homogenizadas del mismo modo. La gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa se utilizó como marcador intracelular en las muestras tratadas con HCl y las no tratadas. Finalmente, se sometieron los extractos enzimáticos a pruebas de coagulación y de actividad *k*-caseinolítica tal como se describe anteriormente.

4. Técnicas de manipulación de proteínas

4.1. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Las muestras enzimáticas extraídas a partir de un cultivo de *B. licheniformis* se sonicaron antes de ser cuantificadas.

Se añadieron 50 μL de muestra a 1.5 mL de reactivo Coomassie en un tubo Eppendorf. Se agitó fuertemente y se dejó reposar durante 10 min. El

blanco se realizó sustituyendo la muestra enzimática por tampón 0.01 M fosfato potásico, pH 6.0.

A continuación se midió la absorbancia a 595 nm empleando un espectrofotómetro. Se realizó una recta patrón con cantidades de seroalbúmina bovina (**BSA**) comprendidas entre 0 y 750 $\mu\text{g/mL}$. Se obtuvo la siguiente ecuación $Y = 0.001 + 0.017X$ ($R^2 = 0.9965$), donde x se refiere a la cantidad de BSA ($\mu\text{g/mL}$) e y se refiere a las unidades de densidad óptica a 595 nm (Fig. 22).

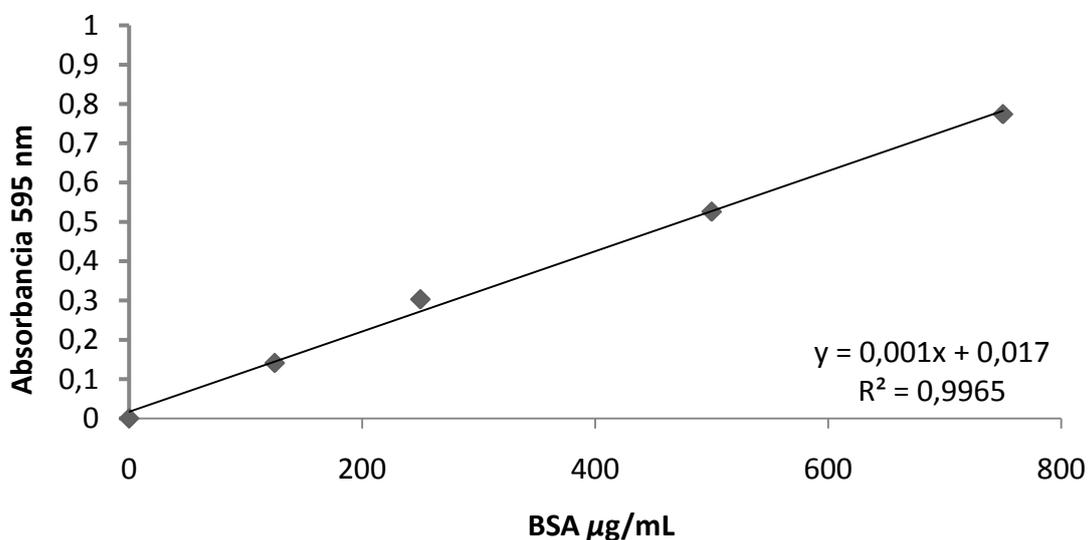


Figura 22: Recta patrón de BSA para la cuantificación de proteína por el método de Bradford.

4.2. Precipitación con sulfato amónico

Se determinó el porcentaje de sulfato amónico necesario para la precipitación de la mayor cantidad de enzima a la menor concentración total de proteína. Para ello, se añadió lentamente sulfato de amonio finamente molido a las muestras de sobrenadante de cultivo hasta alcanzar diferentes concentraciones (desde 20 hasta 80 %, considerando el 100% de saturación a 0 °C como 0.70 g/mL). Las muestras se incubaron

en agua con hielo durante 1 h y, a continuación, fueron sometidas a centrifugación a 15000 rpm durante 10 min.

El sobrenadante se dializó frente a 0.01 M tampón fosfato potásico, pH 6.0 a 4 °C. El precipitado se resuspendió en el mismo tampón y se sometió al mismo proceso de diálisis. Se determinó la actividad y la cantidad de proteína en el sobrenadante y en el precipitado del modo anteriormente descrito.

4.3. Preparación de las muestras proteicas

El método propuesto fue validado usando enzimas comerciales, tales como la obtenida a partir de *Rhizomucor miehei* (Arroyo, España) o la quimosina bovina recombinante producida por *Escherichia coli*; Chymax® (Pfizer, USA). Otras de las proteasas empleadas para la validación fueron obtenidas en nuestro laboratorio; la procedente de flores de *Cynara cardunculus*, la procedente de cultivos de *B. licheniformis*, y la obtenida a partir de un cuajar de *Bubalus arnee bubalis*. La muestra procedente de *C. cardunculus* se obtuvo mediante una infusión de las flores en el tampón 0.01 M fosfato potásico, pH 6.0. Posteriormente, las flores fueron retiradas mediante centrifugación y el sobrenadante filtrado a través de filtros de 0.22 µm. La muestra procedente de *B. licheniformis* se obtuvo a partir del sobrenadante de un cultivo en fase estacionaria de crecimiento llevado a cabo a 37 °C durante 7 días y a 180 rpm. El sobrenadante se filtró a través de filtros de 0.22 µm de tamaño de poro, se concentró diez veces y se precipitó con sulfato de amonio al 60 %. Posteriormente, la muestra se dializó frente a tampón 0.01 M fosfato potásico, pH 6.0. La muestra dializada se utilizó para llevar a cabo estudios enzimáticos.

Por su parte, el enzima procedente de *B. arnee bubalis* se obtuvo machacando el cuajar de un animal lactante, empleando nitrógeno líquido. El polvo resultante fue resuspendido en tampón 0.01 M fosfato potásico, pH 6.0 y, posteriormente, se centrifugó durante 15 min a 15.000 rpm. El sobrenadante filtrado y concentrado se usó como crudo enzimático. Finalmente, se disolvió tripsina (Boehringer Mannheim, Alemania) tal como describió Twining (1984) a una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 y 10 mM CaCl_2 .

4.4. Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas en geles de acrilamida se realizó siguiendo la técnica descrita por Laemmli, (1970) utilizando una cubeta de electroforesis Mini Protean II (BioRad).

El gel de resolución se preparó empleando un stock de acrilamida al 29 % y N,N'-metilenbisacrilamida al 1 %. Según la concentración de poliacrilamida deseada (Sambrook *et al.*, 1989) se mezclaron en el gel de resolución, distintos volúmenes de esta solución, previamente desgasificada con 2.5 mL de Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 y 100 μL de SDS (dodecilsulfato sódico) al 10%, para un volumen final de 10 mL. Antes de echar la mezcla en el formador de geles, se añadieron 50 μL de persulfato amónico al 10 % preparado en el momento y 5 μL TEMED (tetrametil etilendiamina) (BioRad) para forzar la polimerización.

Las muestras se prepararon en condiciones desnaturalizantes hirviéndose previamente en tampón de carga Laemmli.

Se empleó un marcador de peso molecular (Standard precision plus, BioRad).

El gel se sometió a una intensidad de corriente de 200 V (30 mA por placa) durante 1 h utilizando el tampón Tris-glicina (Tris-base 3 g/L, glicina 14.4 g/L y SDS 1 g/L) durante la electroforesis.

El gel fue sumergido en disolución fijadora durante 15 min para eliminar el exceso de SDS. Para revelar las bandas se tiñó el gel con azul de Coomassie R-250 (BioRad) hasta el punto de saturación (2 h). Se lavó con la solución decolorante 1 durante 30 min y posteriormente con la solución de decolorante 2 durante 12-16 h. Los geles fueron fotografiados empleando el sistema GeldocXR (Biorad) y guardados en una disolución de almacenamiento hasta su secado empleando un secador de geles al vacío 2003 Slab Gel Dryer (LKB Bromma). Los geles fueron digitalizados posteriormente empleando un scanner Epson Perfection V500 photo (Epson).

4.4.1 Composición de los tampones para SDS-PAGE

Gel Concentrador	Final	4%
Agua mQ (mL)		4.9
1.5 M Tris HCL, pH 6.6(mL)	125 mM	2.5
Acrilamida/Bis (30% Stock) (mL)		2.5
20% SDS (μ L)	0.1 %	50
TEMED (μ L)	0.05%	5
10% Persulfato amónico (μ L)	0.05%	50
Total		4 mL

Gel Separador	Final	7.5%	10%
Agua mQ (mL)		4.9	4.1
1.5 M Tris HCL, pH 8.8 (mL)	375 mM	2.5	2.5
Acrilamida/Bis (30% Stock) (mL)		2.5	3.3
20% SDS (μ L)	0.1 %	50	50
TEMED (μ L)	0.05%	5	5
10% Persulfato amónico (μ L)	0.05%	50	50
Total		10 mL	10 mL

- **Tampón de carga Lemmli 5x**

60 mM Tris-HCL (pH 6.8).

25% Glicerol.

2% SDS.

14.4 mM DTT.

0.1 % Azul de bromofenol.

9% Agua destilada.

El producto fue filtrado a través de papel Watman.

- **Solución fijadora:**

500 mL metanol; 70 mL ácido acético glacial; 430 mL agua.

- **Colorante Coomassie Blue R-250:**

0.25 g Coomassie blue R-250 (Biorad); 225 mL metanol; 46 mL ácido acético; 230 mL agua.

- **Solución decolorante 1:**

200 mL metanol; 100 mL etanol; 50 mL ácido acético; 650 mL agua.

- **Solución decolorante 2:**

100 mL ácido acético, 900 mL de agua.

- **Solución de almacenamiento:**

70 mL glicerol, 30 mL ácido acético, 900 mL agua.

4. 5. Isoelectroenfoco

El extracto enzimático obtenido fue sometido a isoelectroenfoco utilizando un ROTOFOR (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA) a 4°C. El gradiente de pH (3.0-10) se hizo usando anfolitos al 2% (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) a 500 V. Las muestras fueron recolectadas

y se determinó el pH y la concentración de proteína según el método de Bradford (1976). Las fracciones se dializaron frente a tampón 0.01 M fosfato potásico (pH 6.0) y posteriormente se evaluó su actividad *k*-caseinolítica por el método anteriormente descrito.

4.6. Cromatografía de intercambio catiónico

Las muestras enzimáticas obtenidas tras la precipitación con sulfato amónico fueron eluidas a través de una columna de intercambio iónico (38 x 3.5 cm) de CM-Biogel A (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) equilibrada con tampón 0.01 M fosfato potásico (pH 6.0). Las proteínas fueron eluidas usando un gradiente de NaCl (0-1 M) diluido en el mismo tampón con un flujo de 0.5 mL x min⁻¹. Se recolectaron fracciones de 4 mL, se midió la absorbancia a 280 nm y se evaluó la actividad coagulante y *k*-caseinolítica del modo anteriormente descrito. Las muestras que presentaron actividad fueron concentradas posteriormente empleando un concentrador Centricon (Millipore Corporation, Billerica, MA).

4.7. Cromatografía de exclusión molecular

3 mL de la muestra enzimática obtenida tras la cromatografía de intercambio catiónico se sometieron a cromatografía de exclusión molecular. La columna (80 x 3.5 cm) fue empacada con Sephacryl S-200 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) y equilibrada con tampón 0.01 M fosfato potásico (pH 6.0). El volumen muerto fue determinado de acuerdo con la elución de azul de dextrano (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO). La tasa de elución fue de 0.5 mL x min⁻¹. Las fracciones de 5 mL fueron medidas a 260 nm. Se utilizaron diferentes proteínas como marcadores de peso molecular; aldolasa (158 kDa), seroalbúmina bovina (67 kDa), albúmina de

huevo (45 kDa), quimotripsinógeno (35 kDa) y lisozima (14 kDa) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO). El peso molecular del enzima fue calculado según lo descrito por Whitaker (1963).

4.8. Secuenciación de aminoácidos

Las muestras fueron digeridas para su identificación. El mapa de la proteína se obtuvo mediante análisis por MALDI-TOF (Desorción/ionización asistida por láser). Este trabajo fue realizado por un servicio de proteómica de la Universidad de Santiago de Compostela. Se utilizó el programa ALDENTE ExpASy para la búsqueda en las bases de datos. Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa Vector NTI 10.3.1 (Invitrogen Corporation).

5. Elaboración de las masas queseras

Para evaluar el potencial de este enzima se realizaron diferentes masas queseras. Dichas masas queseras fueron sometidas a análisis reológicos y organolépticos.

Los enzimas utilizados fueron: i) un concentrado 10x del sobrenadante crudo de *B. licheniformis*, ii) el enzima parcialmente purificado y iii) un control positivo realizado con un enzima comercial procedente de *Rhizomucor miehei* (Arroyo, España). Cuando fue necesario se realizaron las masas queseras con extractos de proteasa Epr recombinante.

Las masas queseras se realizaron con leche desnatada y entera en polvo reconstituida (Central Lechera Asturiana, Siero, España) (13% p/v), con leche de vaca y con leche de búfala.

La coagulación se realizó en un volumen de 500 mL de leche a los cuales se les añadieron 10 mL de la preparación enzimática. La mezcla se incubó

a 37°C hasta la coagulación de la leche. Las masas queseras fueron desueradas y prensadas con un paño de algodón. Por último, se enviaron al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela (Lugo).

5.1. Análisis de las masas queseras

Se siguieron los protocolos descritos por Poza *et al.*, (2003). El peso seco (DM) de las masas queseras fue medido por el método gravimétrico, con una precisión de ± 0.1 %. 3 g de muestras fueron sometidas a 102 °C hasta que el peso se volvió constante, este tiempo fue normalmente de 3 h.

Los resultados fueron expresados en porcentajes (p/p). Los contenidos de humedad fueron determinados por el diferencial con el peso previo al secado. El contenido en grasa (FC) se determinó en muestras de 3 g, las cuales fueron introducidas en un butirómetro y cubiertas por ácido sulfúrico al 65%. Tras la adición de 1 mL de alcohol isoamílico, la mezcla fue centrifugada durante 5 min a 225 g en una centrifuga térmica Gerber (Orto Aldesa, Madrid, España). El FC fue medido directamente con el butirómetro y los resultados fueron expresados con una precisión del 0.2%. La relación entre el FC y el peso seco de las masas queseras fue determinada. La humedad del contenido no graso (MNF) de las masas queseras se determinó según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ MNF} = [(100 - \% \text{ DW}) / (100 - \% \text{ FC})] \times 100.$$

Las masas queseras fueron sometidas a análisis de penetrometría. La firmeza de las masas queseras fue medida en un equipo automático Hounsfield (HTE Hounsfield, Salford, UK) equipado con una celda de carga de 500 N. Las masas queseras fueron cortadas hasta obtener prismas

rectangulares de 1 cm² de sección y 3 cm de longitud. Las dimensiones del prisma fueron verificadas con un sistema micrométrico de calibración, siguiendo una desviación de 0.05 cm para cada dimensión.

Los prismas fueron sometidos a fuerzas verticales de 500 N con una celda de corte con una inclinación de 50°. La fuerza fue realizada perpendicularmente a la muestra, desde una altura de 20 mm, con una velocidad de 150 mm x min⁻¹.

La resistencia de los prismas de la masa quesera fue estimada a partir de las curvas de fuerzas obtenidas; la fuerza máxima ($F_{\text{máx}}$) (N) fue determinada con una precisión de $\pm 0.5\%$.

Las masas queseras fueron diluidas en una proporción 1:3 (p/v) en agua Mili-Q y el pH fue determinado usando un electrodo con un diámetro de 6 mm (Crison, Barcelona, España) con una precisión de ± 0.1 unidades de pH.

6. Técnicas de manipulación de DNA

6.1. Extracción de DNA genómico de *B. licheniformis*

Se utilizaron 15 mL de un cultivo de *B. licheniformis* de 18 h en las condiciones anteriormente descritas. El cultivo se centrifugó durante 15 min a 10.000 rpm, se desechó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en 5 mL de solución 25 mM Tris HCl pH 8, 25 mM EDTA, 2 mg/mL de lisozima; se añadieron perlas de vidrio de 0.1 mm a un volumen equivalente al de células. Se incubó durante 30-40 min a 30° C, y se sometió a pulsos de agitación en un vórtex. Se añadieron 2 mL de SDS al 5%, repitiendo ciclos de agitación en vórtex. Se dejó incubar durante 10 min a 60° C, y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Se añadió 2

mL de fenol-cloroformo a pH neutro, y se agitó en vórtex. Se centrifugó la muestra durante 5 min a 4 °C, 14000 rpm. El sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo, al que se añadió (v/v) 1/10 acetato sódico 2.5 M y 1/1 isopropanol. Se volteó el tubo hasta ver el DNA. Se rescató el DNA con una punta y se resuspendió en 0.5 mL de agua destilada estéril. Se centrifugó la muestra durante 5 min a 4 °C, 14000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en etanol frío al 70 %. Se centrifugó la muestra durante 5 min a 4 °C, 14000 rpm, se desechó el sobrenadante y se aspiraron los restos de etanol, se dejó secar el etanol durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadieron 200 μ L de agua mQ estéril y se dejó hidratar y resuspender durante 16 h a 4° C. Se agitó suavemente y se congeló la muestra hasta su posterior uso.

6.2. Amplificación de DNA por PCR

Las reacciones de amplificación PCR se realizaron siguiendo las condiciones generales de mezcla de reacción descritas en la Tabla 6.

Tabla 6: Mezcla de reacción de PCR.

	Reacción	BioTaq	<i>EcoTaq</i>	Accuzyme
dNTPs	0.2 mM	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Oligonucleótido 5'	0.2 μ M	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Oligonucleótido 3'	0.2 μ M	1 μ L	1 μ L	1 μ L
DNA molde	10-50 ng	0.1-1 μ L	0.1-1 μ L	0.1-1 μ L
MgCl ₂	1.5 mM	1.5 μ L	1.5 μ L	-
Polimerasa (5-2.5 u/mL)	2 u	0.4 μ L	0.4 μ L	0.8 μ L
Tampón (10x)	1x	5 μ L	5 μ L	5 μ L
BSA (10 mg/mL)	0.004%	-	2 μ L	2 μ L
Agua mQ		Hasta 50 μ L	Hasta 50 μ L	Hasta 50 μ L

Para cada oligonucleótido utilizado se realizaron pruebas de especificidad, en las que se observaba si se producía amplificación con cada pareja de oligonucleótidos por separado.

En el caso de amplificaciones con dianas de restricción, se utilizaron programas mixtos de baja y alta astringencia, primero con la temperatura calculada para la secuencia homóloga al molde, subiendo a la temperatura de hibridación del oligonucleótido con diana completo.

Los tiempos y temperaturas de extensión utilizados fueron los recomendados por los fabricantes de los enzimas.

6.2.1. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados sobre las secuencias depositadas en el Genbank (NC006270.3) utilizando los programas Vector NTI 10.3.1 (Invitrogen), Primer Premier 5 (Premier Biosoft International) y Bioedit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). A las secuencias se le añadieron secuencias de reconocimiento del enzima de restricción *EcoRI*. Se modificaron las secuencias manteniendo la pauta de lectura y la expresión, cambiando el uso de codones para evitar la formación de estructuras *intra* e *inter* oligonucleotídicas. Se evitó la formación de bucles y lazos dentro de la secuencias. Se realizaron ensayos de PCR en los que se varió la temperatura de hibridación, tomando como referencia la temperatura calculada por el programa y la obtenida por el cálculo “Nearest Neighbor” con la herramienta “OligoCalc” (Kibbe, 2007).

Los nucleótidos empleados se detallan a continuación:

preProepr 5'

5'-ATGAAGAAGTTATGGAAAATCGC-3' (51.4 °C; 34.8 %CG; Tm 52).

preProerpr 3'

5'-CTACTTGAGCTTAATGGCATTGATC-3' (53.5 °C; 40 %CG; Tm 55).

Proepr *EcoRI* 5'

5'-CCGGAATTCCGGGAGAGTAATAAGCAGGAAA-3' (68.2 °C; 48.4 %CG; Tm 64).

Proepr *EcoRI* 3'

5'-CCGGAATTCCGGCTACTTCAGTTTGATGGC-3' (70.2 °C; 53.3 %CG; Tm 64).

6.3. Precipitación de DNA con fenol cloroformo

Cuando fue necesario concentrar y limpiar muestras de DNA se utilizó el protocolo de precipitación con fenol cloroformo. Se enrasó la muestra hasta 200 μ L con agua mQ estéril. Se añadió el mismo volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se agitó en un vórtex durante unos segundos. Se centrifugó la muestra durante 10 min a 4 °C, 14000 rpm. Se recogió la fase superior de la muestra, teniendo cuidado de no tocar la interfase. Se añadió igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 y se agitó durante unos segundos en un vórtex. Se centrifugó la muestra durante 10 min a 4 °C, 14000 rpm. Se recogió la fase superior y se transfirió a otro vial limpio. Se añadió a la muestra un décimo de su volumen de sales de acetato sódico 2.5 M y dos volúmenes de etanol absoluto a -20° C. Se mezcló en un vórtex durante unos segundos.

Se mantuvo la muestra a -20° C durante 30 min. Se centrifugó la muestra durante 30 min a 4 °C, 14000 rpm. Se desechó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con etanol al 70% a -20° C. Se centrifugó la muestra durante 10 min a 4 °C, 14000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se aspiraron los restos de etanol, se dejó secar durante 2 h hasta la completa evaporación del etanol. Se resuspendió el precipitado en un volumen de agua mQ

adecuado, se incubó a 42° C durante 2 h, 65° C durante 1 h, o a 4°C durante 16 h. El DNA se congeló hasta su posterior uso.

6.4. Electroforesis de DNA

Las moléculas de DNA se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Normalmente, los geles se prepararon a una concentración de agarosa (Type II: Medium EEO, Sigma) del 0.9 % en tampón TAE (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.002 M). Cuando fue necesario extraer el DNA del gel, se empleó agarosa de bajo punto de fusión (Seaplaque GTG agarose, BMA o Agarosa LM-GQT, Hispanlab, Pronadisa) al 1 %. Estos geles de bajo punto de fusión se enfriaron a 4 °C. El DNA se visualizó incorporando bromuro de etidio al gel a una concentración final de 1 mg/mL e iluminándolo con luz ultravioleta en un transiluminador.

Las muestras de DNA a analizar se mezclaron en una proporción 4:1 (v/v) con una solución marcadora que contenía EDTA 25 mM, glicerol al 50 % y azul de bromofenol al 0.25 %.

Se cuantificó el tamaño de los fragmentos por interpolación gráfica frente a marcadores de peso molecular conocido, tales como: 1 Kb ladder (Promega), y 2-Log DNA Ladder (New England BioLabs).

6.5. Extracción y purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Para purificar el DNA a partir de geles de agarosa se emplearon diferentes kits comerciales tales como “GeneClean Turbo” (Qbiogene) para fragmentos de DNA superiores a 1 Kb y “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare) adecuado para todo tipo de tamaños, siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante.

6.6. Cuantificación de DNA

Para las técnicas de ingeniería genética es necesario conocer la concentración del DNA que se va a utilizar, puesto que normalmente se trabaja en concentraciones molares y es uno de los factores críticos para técnicas tales como la PCR. Otro factor importante es la determinación del tamaño de las bandas obtenidas, dado que permite su identificación como un paso previo a la secuenciación.

6.6.1. Determinación de la concentración de DNA mediante espectrofotometría

La cuantificación de la concentración de DNA mediante espectrofotometría se realizó empleando un espectrofotómetro (Biophotometer, Eppendorf) empleando una cubeta de cuarzo de 20 μ L de capacidad. Como blanco para la medición se utilizó agua mQ. Esta técnica tiene en cuenta que una unidad de D.O. a 280 nm equivale a 50 μ g de DNA por mL. También permite estimar la pureza de las muestras teniendo en cuenta que la relación A260/A280 debe ser mayor a 1.8.

Además, se utilizó el espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific), midiendo 2 μ L de muestra directamente. Los valores fueron analizados con el programa ND-1000 V3.7.

6.6.2. Determinación de la concentración de DNA mediante electroforesis.

6.6.2.1. Empleando DNA del fago λ .

Para la cuantificación de DNA genómico total se cargaron en los pocillos del gel las muestras con concentraciones conocidas de DNA y la muestra a analizar. Normalmente, se utilizó el DNA del fago λ en concentraciones que oscilaron entre 50 y 300 ng y los fragmentos se sometieron a

electroforesis junto con diferentes cantidades de DNA problema. Tras 30 min a 80 V, se visualizó el DNA con luz ultravioleta y se comparó la intensidad de las bandas de DNA de concentración conocida con las bandas de DNA problema. Con ayuda de un analizador de imágenes (GelDocXR, BioRad) y el software Quantity One (BioRad), se extrajo la ecuación de una recta en base a las intensidades de las bandas de la escalera creada con DNA del fago λ . Esta recta permitió cuantificar la banda problema.

6.6.2.2. Empleando 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs)

Se cargó en un pocillo de un gel una muestra comercial de pesos moleculares con concentraciones conocidas de DNA (2-Log DNA Ladder; New England BioLabs) y, en otro pocillo, la muestra a analizar. Se realizó un análisis de intensidad por píxeles empleando un sistema de documentación de geles GelDoc XR (BioRad) y el software Quantity One (BioRad).

6.6.3. Cuantificación del tamaño de DNA mediante electroforesis

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa tal como se describió en el apartado 6.4. Se realizó un análisis de intensidad por píxeles empleando un sistema de documentación de geles GelDoc XR (BioRad) y el software Quantity One (BioRad). Se utilizaron los marcadores de peso molecular como referencia, tales como el 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs). A través del el programa Quantity One se realizó una interpolación gráfica obteniendo el peso molecular de las bandas problema.

6.7. Extracción de DNA plasmídico

La separación del DNA plasmídico del genómico bacteriano es una de las técnicas más empleadas y rutinarias en ingeniería genética. Para la extracción de DNA plasmídico se utilizaron procedimientos diferentes.

6.7.1. Extracción de DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979)

Se inoculó una colonia en LB con ampicilina. Se incubó una noche a 37 °C. Se transfirieron 2 mL del cultivo a un vial eppendorf. Se centrifugó, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 350 μ L de tampón STET (sacarosa 8 %, triton X-100 5 %, EDTA 50 mM y Tris- HCl 10 mM, pH 8). Se añadieron 25 μ L de una solución de lisozima (10 mg/mL). Se hirvió la muestra 40 s y se centrifugó a 4 °C, 10 min a 14000 rpm. Los restos celulares se retiraron con un palillo. Se añadieron 250 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1) al sobrenadante. El tubo se agitó por inversión 3 veces. Se centrifugó el vial 5 min a 4 °C, 14000 rpm y se transfirieron aproximadamente 200 μ L de la fase superior a un vial con un volumen igual de isopropanol. Se mezcló invirtiendo el tubo y se incubó la mezcla 30 min a – 20 °C. Se centrifugó el vial 30 min a 4 °C y 14000 rpm. Se vació el sobrenadante y se aireó el vial para eliminar los restos de alcohol. Por último, se resuspendió el DNA precipitado en agua con RNasa (20 μ g/mL) y se dejó actuar 1 h a 37 °C (Birnboim y Doly, 1979).

6.7.2. Extracción del DNA plasmídico usando el kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen)

Este protocolo está diseñado para purificar más de 20 μ g de DNA plasmídico multicopia a partir de cultivos de 1-4 mL de *E. coli*.

El precipitado se resuspendió en 250 μL de tampón P1 (Qiagen) y se transfirió a un vial eppendorf. Se añadieron 250 μL de tampón P2 (Qiagen) y se invirtió el vial 5 veces para mezclar las soluciones. Se añadieron 350 μL de tampón N3 (Qiagen) y se agitó el tubo otras 5 veces. Se centrifugó 10 min y se aplicó el sobrenadante a una Qiaprep Spin Column (Qiagen) por decantación. Se centrifugó la minicolumna dentro de un vial 50 s y se descartó el tubo colector. Se realizó un primer lavado de la minicolumna añadiendo 0.5 mL de tampón PB (Qiagen) y se centrifugó otros 50 s. Se realizó un segundo lavado con 0.75 mL de tampón PE (Qiagen) y se centrifugó durante 1 min para eliminar cualquier resto de solución de lavado. Se introdujo la minicolumna en un tubo colector nuevo y se añadieron 50 μL de agua mQ estéril. Tras 1 min, se centrifugó 1 min y se recogió el DNA eluído en el vial colector. Todas estas soluciones fueron proporcionadas en el kit.

6.7.3. Extracción de DNA plasmídico empleando el kit Miniprep Express Matrix (Qbiogene)

Las células cultivadas toda la noche se resuspendieron en 300 μL de tampón STET (proporcionado en el kit). Se añadieron 25 μL de una solución de lisozima (10 mg/mL). Se hirvió la muestra 40 s y se centrifugó a 4 °C, 10 min a 14000 rpm. Los restos celulares se retiraron con un palillo. Se añadieron 400 μL de Miniprep Express Matrix (Qbiogene) y se mezcló por inversión. Se centrifugó 10 s a 12000 rpm y eliminó el sobrenadante por aspiración con una bomba de vacío. Se lavó la resina con el DNA retenido con 500 μL de etanol 80% resuspendiendo la resina con la micropipeta. Se centrifugó y se eliminó el etanol por aspiración. La resina se resuspendió en 75 μL de agua mQ y se centrifugó. Se retiró el

sobrenadante que contenía el DNA plasmídico.

6.7.4. Extracción de DNA plasmídico empleando el kit Plasmid Midiprep (Qiagen)

Este protocolo está diseñado para purificar más de 100 μg de DNA plasmídico multicopia a partir de cultivos de 100 mL de *E. coli*. Las células procedentes de 100 mL de cultivo se resuspendieron en 4 mL de tampón P1 (Qiagen). Se añadieron 4 mL de tampón P2 (Qiagen), se invirtió el vial de 4-6 veces para mezclar las soluciones y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 4 mL de tampón P3 (Qiagen) pre-enfriado y se agitó el tubo de 4-6 veces y se incubó en hielo 15 min. Se centrifugó 30 min a 12000 rpm y se aplicó el sobrenadante a una Qiagen-tip 100 (Qiagen) por decantación. Se lavó la columna con Buffer QC (Qiagen) con dos lavados de 10 mL. El DNA se eluyó con 5 mL de Buffer QF (Qiagen) y se precipitó con isopropanol. Se centrifugó 30 min a 9500 rpm. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70%. Se volvió a centrifugar y se resuspendió el DNA en agua.

6.8. Ligación vector-inserto

Se mezclaron moléculas de inserto y de plásmido en una relación molar determinada, teniendo en cuenta la concentración de DNA estimada y el tamaño de las moléculas.

Así, partiendo de 100 ng de plásmido, se añadió una cantidad determinada de inserto de forma que se combinaron ambas moléculas en las relaciones molares; 1:1, 1:2 y 1:3. Se empleó 1 μL de T4 DNA ligasa (3 U/ μL , Promega) para cada reacción de ligación y 1 μL de tampón de la ligasa para un volumen final de 10 μL . Las ligaciones se realizaron

normalmente a 16 °C toda la noche aunque, en alguna ocasión, se dejaron a temperatura ambiente durante menos tiempo o a 4 °C toda la noche.

Se realizó un control, incubando 100 ng de plásmido sin digerir en presencia de ligasa. Así, se halló el grado de competencia de las células preparadas (Nº de colonias obtenidas por μg de DNA plasmídico). Además, se realizaron dos pruebas control, una con 100 ng de plásmido linealizado y defosforilado y otra con 100 ng de plásmido linealizado sin defosforilar, con el objeto de controlar la correcta defosforilación del plásmido en caso de que esta fuese necesaria. Se comparó el número de colonias obtenidas en un caso y en otro y se halló el tanto por ciento de plásmido defosforilado.

Para el caso de la ligación empleando el kit de clonación Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen), se mezclaron el producto de PCR y el vector pCR-Blunt II-TOPO con agua y sales, tal como se indica en las instrucciones del kit. La mezcla se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente.

6.9. Técnicas de clonación de fragmentos de DNA

6.9.1. Clonación del inserto en el vector pCR Blunt II TOPO.

Se empleó el protocolo descrito en las instrucciones del kit de clonación Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen) para llevar a cabo la ligación del DNA en el vector pCR Blunt II TOPO (Fig. 18).

Así, se preparó la reacción de clonación con un máximo de 4 μL del producto obtenido mediante PCR usando una polimerasa que deja extremos romos, 1 μL de solución de sales y agua estéril hasta un volumen final de 11 μL y 1 μL de vector ya preparado para la ligación. El vector y las sales fueron suministrados en el kit. Se mezcló e incubó 30 min a temperatura ambiente.

Se añadieron 5 μL de la reacción de clonación a un vial de células ultracompetentes comerciales de *E. coli* "One Shot" TOP10 (Invitrogen), previamente descongeladas en hielo. Se revolvió con una pipeta y se incubó en hielo 30 min. Se realizó un choque térmico a 42 $^{\circ}$ C, 30 s y se volvió a incubar en hielo. Se añadieron 250 μL de medio SOC, suministrado en el kit, y la mezcla se incubó a 37 $^{\circ}$ C en un tubo de 10 mL colocado en posición horizontal en un agitador orbital a 200 rpm.

Después de 1 h se sembraron alícuotas del cultivo en placas de LB con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las placas se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ hasta la aparición de colonias.

Para comprobar la presencia del inserto del tamaño adecuado se procedió a la digestión de los plásmidos obtenidos a partir de las colonias recombinantes. El enzima elegido para realizar esta digestión fue *EcoRI* (Promega) que corta el plásmido en dos puntos liberando el inserto.

Se mezclaron a 37 $^{\circ}$ C, durante 1-2 h, aproximadamente 5 μg de DNA plasmídico con 2 unidades de enzima, en presencia del tampón específico del enzima.

6.9.2. Clonación en el vector pET30a

Para hacer esta clonación se realizó una inserción generando los extremos compatibles utilizando el enzima de restricción *EcoRI* (Promega) a partir de la construcción anterior en el pCR Blunt II TOPO. El vector pET30a fue digerido con el mismo enzima. Esta digestión fue llevada a cabo en tampón específico del enzima. Insertos y vector se ligaron empleando T4 DNA ligasa. Se determinó la orientación de la inserción mediante digestión con *HindIII*.

Con el objeto de conseguir la clonación directa en el vector pET30a de la proteasa sin el péptido señal, se diseñaron oligonucleótidos descritos en la sección 6.2.1 que contenían dianas para el enzima *EcoRI*.

Para realizar la técnica de PCR se utilizó como molde el inserto previamente liberado con *EcoRI* a partir del vector pCR Blunt II TOPO y los oligonucleótidos anteriormente descritos. Para realizar esta amplificación se empleó el enzima Accuzyme DNA Polymerase (Bioline).

Tanto los productos de PCR obtenidos como el vector pET30a fueron digeridos con el enzima *EcoRI* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El vector pET30a digerido con *EcoRI* se sometió a defosforilación para evitar su religación. Se utilizó “*Shrimp Alkaline Phosphatase*” (SAP, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron sometidas a electroforesis de DNA y se purificaron del gel de agarosa, del modo anteriormente descrito.

Para determinar la orientación del inserto en el vector la construcción fue sometida a digestión empleando el enzima *HindIII* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.9.3. Clonación en pHIL-S1 α

Para llevar a cabo esta clonación se realizó una inserción en un punto del vector usando el enzima de restricción *EcoRI* (Takara) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Así, el vector pHIL-S1 y las construcciones realizadas en el vector pCR Blunt II TOPO fueron digeridas con el enzima *EcoRI*. El vector pHIL-S1 una vez digerido fue defosforilado con el enzima SAP siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para determinar la orientación del inserto en el vector, la construcción fue sometida a digestión empleando el enzima *Pst*I siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.10. Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en un servicio externo; Sistemas Genómicos (Valencia) o Secugen (Madrid).

Para secuenciar los insertos clonados en el vector pCR Blunt II TOPO, se envió a secuenciar el plásmido obtenido tras una extracción realizada con el Plasmid Midi kit (Qiagen) y se emplearon los oligonucleótidos universales SP6 y T7.

En el caso de las construcciones realizadas en el vector pET30a se emplearon los oligonucleótidos T7 promotor 5'-AATACGACTCACTATAGG-3' y T7 terminator 5'-TATGCTAGTTATTGCTCAG-3'.

En el caso de las construcciones realizadas en el vector pHIL-S1 se emplearon los oligonucleótidos 5'AOX' 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' y 3'AOX 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC- 3'.

7. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN

7.1. Transformación de *E. coli*.

7.1.1. Preparación de células competentes de *E. coli*.

Para ello, se utilizó un protocolo empleando Cl₂Rb. Se inocularon matraces de LB con *E. coli*. Se cultivó a 37 °C hasta que alcanzó la fase estacionaria. Al día siguiente, se transfirieron entre 2-3 mL de este cultivo a un matraz con 100 mL de LB. Se cultivó durante 2-3 h a 37 °C y 200 rpm hasta que la D.O. a 550 nm alcanzó un valor de 0.3 - 0.4. El cultivo se enfrió 5 min en hielo. Se centrifugó a 8000 rpm, a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 30

mL de TfbI estéril frío. Se centrifugó de nuevo a 8000 rpm, durante 10 min a 4 °C. El nuevo sedimento se resuspendió en 4 mL de TfbII estéril. Se repartió la suspensión en viales con alícuotas de 100 μ L que se congelaron inmediatamente con N₂ líquido y se guardaron a – 80 °C. A continuación se describen las soluciones empleadas;

- **TfbI**

1.47 g de CH₃COOK

4.95 g de MnCl₂

6.05 de Cl₂Rb

0.74 g de CaCl₂.6.H₂O

75 mL de glicerol

Se ajustó el pH a 5.8 con ácido acético glacial 0.2 M, se enrasó a 500 mL con agua destilada, se filtró a través de membranas de 0.22 μ m y se guardó a 4 °C.

- **TfbII**

10 mL de stock de MOPS 100 mM, pH 7

1.6 g de CaCl₂.6.H₂O

0.12 g de Cl₂Rb

18 mL de glicerol

Se enrasó a 100 mL con agua destilada, se filtró a través de membranas de 0.22 μ m y se guardó a 4 °C en oscuridad.

- **Stock de MOPS (100 mM, pH 7)**

2.09 g de MOPS

0.34 g de CH₃COONa

0.18 g de EDTA

Se ajustó el pH a 7, se enrasó hasta 100 mL con agua destilada y se filtró a través de membranas de 0.22 μm .

7.1.2. Transformación por choque térmico

Se descongelaron los viales de células competentes en hielo. Se añadió el DNA plasmídico o la mezcla de ligación y se mezcló con la punta de la pipeta. Se mantuvo el vial en hielo durante 30 min. Se realizó un choque térmico, sumergiendo el vial en un baño a 42 °C durante 45 s. El vial se incubó en hielo 2 min y se añadió 1 mL de LB. Se transfirió la mezcla a un tubo de 10 mL y se incubó de forma horizontal en un agitador orbital a 37 °C, 200 rpm durante 1 h.

Las células de *E. coli* transformadas se sembraron en LB suplementado con el antibiótico apropiado. Se empleó kanamicina cuando se introdujeron los vectores pET30a o pCR Blunt II TOPO y ampicilina cuando se empleó el vector pHIL-S1.

7.2. Transformación de *P. pastoris*.

7.2.1. Preparación de células electrocompetentes de *P. pastoris*

P. pastoris se cultivó en 5 mL de YPD toda la noche a 30 °C. Con este cultivo se inocularon 500 mL de YPD en un matraz de 2 L y se cultivó hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 1.3-1.5. Una vez alcanzada esta densidad celular se centrifugó el cultivo a 1500 g 5 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 500 mL de agua destilada fría estéril. Se volvió a centrifugar y se resuspendió en 250 mL de agua destilada fría estéril. Tras otra centrifugación se resuspendieron las células en 20 mL de 1 M sorbitol frío. Para terminar, se centrifugó por última vez y se resuspendió en 1.5 mL de 1 M sorbitol frío. Se distribuyó en alícuotas de 80 μL .

7.2.2. Transformación

En primer lugar, se linealizaron las construcciones plasmídicas en el pHIL-S1 empleando el enzima de restricción *SaI* (Promega). Se realizó una electroforesis para comprobar que las construcciones estuviesen completamente digeridas. A continuación, se inactivó el enzima de restricción 20 min a 65 °C. Las construcciones ya completamente linealizadas se purificaron con fenol cloroformo y se concentraron mediante precipitación etanólica para obtener una concentración de 1 µg/µL.

Se mezclaron 80 µL de las células electrocompetentes con 10 µL de las construcciones linealizadas (1 µg/µL) y se transfirió esta mezcla a una cubeta de electroporación de 0.2 cm previamente enfriada en hielo. La cubeta con la mezcla se incubó en hielo durante 5 min. Se sometió la mezcla a un pulso eléctrico de 1500 V, 200 Ω y 25 µF. Inmediatamente se añadió 1 mL de sorbitol 1 M frío y se transfirió el contenido de la cubeta a un tubo estéril de 15 mL. Este tubo se incubó 2 h a 30 °C sin agitación. Las células fueron sembradas en placas con el medio adecuado.

7.3. Análisis de los transformantes de *P. pastoris*

Se empleó la técnica de PCR utilizando como DNA molde células enteras de *P. pastoris* y el reactivo Lyse-N-Go PCR Reagent (Pierce). Las células procedentes de una colonia de *P. pastoris* se lavaron previamente con Tris-HCl 10 mM, pH 8. Se resuspendieron en 10 µL de reactivo Lyse-N-Go PCR Reagent (Pierce), se centrifugaron y se volvieron a resuspender de la misma manera en el mismo reactivo. A la suspensión celular se le aplicó el programa descrito por el fabricante con el fin de romper las células.

Por último, se mantuvo la suspensión celular a 80 °C hasta que se añadieron 50 µL de la siguiente mezcla;

- 10 µL de tampón de la polimerasa 10X.
- 1.5 µL de Cl₂Mg 50 mM.
- 1 µL de una mezcla de los cuatro dNTPs (10 mM).
- 1 µL del oligonucleótido forward (Tabla 7).
- 1 µL del oligonucleótido reverse (Tabla 7).
- 0.4 µL de BSA 10 mg/mL
- 0.4 µL de polimerasa BioTaq (5 U/µL, Bioline).
- agua mQ estéril hasta 50 µL.

A la mezcla de reacción de PCR se le aplicó el programa; un ciclo de 95°C, 10 min; 40 ciclos de 94 °C, 30 s, 55 °C, 30 s y 72 °C, 2 min y, por último, un ciclo de 72°C, 5 min.

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para seleccionar los transformantes de *P. pastoris*.

Vector	Oligonucleótidos	Secuencia
pHIL-S1	5'AOX'(forward)	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
	3'AOX' (reverse)	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

Se realizaron controles negativos empleando células de la levadura sin transformar y células de levadura con plásmido sin inserto.

Se realizó un análisis de fenotipo en las transformaciones realizadas con el vector pHIL-S1.

7.4. Selección de los transformantes Mut + y Mut s en *P. pastoris*.

En las construcciones realizadas con el vector pHIL-S1 fue preciso realizar una nueva selección de transformantes en función de la velocidad en el metabolismo del metanol empleado como única fuente de carbono.

Los clones obtenidos tras transformación se sembraron en placas de MM y MD por este orden. Se incubaron estas placas durante dos días. Al pasar el tiempo de incubación los clones Mut⁺ crecieron bien tanto en la placa de MD como en la placa de MM. Al contrario, los Mut^s crecieron bien en la placa MD y difícilmente en la placa MM. Se realizó una estimación de la velocidad de crecimiento de las colonias mediante comparación gráfica de las colonias con el programa Photoshop CS3.

8. Expresión de proteínas recombinantes

8.1. Expresión en *E. coli* BL21 (DE3)

Se inoculó una colonia recombinante en tubos con 3 mL de medio LB suplementado con kanamicina (Kan). Se cultivó durante 16 h a 37°C y 180 rpm. 1 mL de este cultivo se utilizó para inocular un matraz de 100 mL de medio LB suplementado con Kan. La bacteria se cultivó 8 h hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Este proceso se realizó con las diferentes cepas utilizadas, incluyendo una cepa control con vector sin inserto. Se inoculó un matraz de 100 mL con un criovial con células. Se cultivó durante 16 h a 37°C y 180 rpm. A partir de ese cultivo, se inoculó un matraz de 100 mL de LB con kan, se mantuvo a 37°C y 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6. Se retiró 1 mL de muestra previa a la inducción, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min, se guardó el sobrenadante congelándolo a -20°C hasta su posterior análisis. El precipitado se lavó con tampón 20 mM Tris HCl pH8. Las células se resuspendieron y se centrifugaron nuevamente, eliminando el sobrenadante. El precipitado se congeló a -80°C hasta su utilización.

Se indujo la expresión del vector añadiendo IPTG al cultivo hasta alcanzar una concentración final de 1 mM a partir de un stock congelado de 1 M.

Se cultivaron las células durante 3 h, sacando muestras cada hora, a 24, 30 y 37° C según fue necesario. Finalmente, el cultivo fue centrifugado a 7000 rpm durante 10 min, se guardaron sobrenadante y precipitado hasta su posterior estudio.

Para someter las muestras a electroforesis de proteínas, el precipitado obtenido en el cultivo se resuspendió en 70 μ L de tampón de lisis (50 mM de Tris-HCl pH 7.5; 5% de glicerol; 5 mM DTT) y 10 μ L de PMSF (100 mM). Se añadieron 25 μ L de tampón de carga Laemmli (Sambrook *et al.*, 1989). Se hirvieron las muestras durante 5 min en un baño con agua o en un Thermomixer confort (Eppendorf). Se pasó la muestra por una aguja hipodérmica para homogeneizar. Se centrifugó 1 min a 14000 rpm. La fase soluble se utilizó para separación por electroforesis de proteínas.

8.1.1. Obtención de proteínas del Interior celular

Para la obtención de muestras proteicas procedentes del citoplasma se siguieron diferentes protocolos, siendo los más habituales por disrupción mecánica.

8.1.1.1. Rotura por disrupción mecánica:

-Por sonicación:

Se centrifugaron 40 mL de cultivo a 10.000 rpm en un rotor JA-20 (Beckman) durante 10 min a 4° C. Se decantó el sobrenadante, eliminando todo el líquido posible por secado. Se resuspendió el precipitado bacteriano en 1 mL de 20 mM Tris HCl, pH 7.5. Se lisaron las células con

una lanza de sonicación Sonifier II W 450 (Branson) en hielo, dando pulsos de 10 s con descansos de 30 s. Se centrifugó el lisado celular a 14.000 rpm durante 10 min a 4º C. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se utilizó el precipitado para la purificación de la fase insoluble.

Para la obtención de proteína a partir de los cuerpos de inclusión, se resuspendió el precipitado obtenido en pasos anteriores con 750 µL de 20 mM Tris HCl, pH 7. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min a 4º C. Se retiró el sobrenadante y se repitió el proceso de nuevo. Finalmente se resuspendió el precipitado en 1.5 mL de SDS al 1% calentando a 60ºC durante 30 min y mezclando vigorosamente. La muestra fue sometida a sonicación cuando fue necesario para su solubilización.

-Con perlas de vidrio.

El precipitado obtenido por centrifugación fue resuspendido en un tampón de lisis (50 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 5 mM DTT) y perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro. Las células se trataron a 4000 rpm durante 3 min empleando un homogeneizador enfriado con CO₂ (Braun MSK, Melsungen, Alemania). Los restos celulares fueron retirados por centrifugación a 8000 rpm.

8.1.1.2. Rotura por tratamiento enzimático:

Las células se resuspendieron a temperatura ambiente en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM NaCl y 5 % glicerol). Se emplearon aproximadamente 7 mL de tampón por cada g de células. A esta suspensión celular se le añadieron 7.5 kU de lisozima por mL de tampón de lisis. Se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 20 min y se centrifugó a velocidad máxima para eliminar los restos celulares.

8.1.1.3. Protocolo de rotura mecánico-enzimático.

Este protocolo permite la rotura total de las células con tratamientos mecánicos menos agresivos.

Se centrifugaron 100 mL de cultivo a 10.000 rpm empleando un rotor JA-20 (Beckman) durante 10 min a 4° C. Se resuspendió cada gramo de células en 1 mL de tampón de lisis frío (50 mM de Tris-HCl pH 7.5; 100 mM de NaCl; 5% de glicerol; 5 mM DTT).

A la suspensión celular se le añadió lisozima, alcanzando una concentración final de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La reacción se incubó 4 h a 4 °C. Posteriormente, se añadieron 5 μL de MgCl_2 (1 M) y 1 μL de DNasa (1 mg/mL) por mL de suspensión. Se incubó durante 30 min a 4 °C. La muestra se sometió a una disrupción por sonicación en hielo con 10 pulsos de 10 s, seguidos de intervalos de 30 s de enfriamiento.

Con el fin de eliminar los restos celulares se sometió la muestra a un proceso de clarificación. Para ello, la muestra obtenida en pasos anteriores se centrifugó a 13.500 rpm durante 1 h en un rotor JA20 (Beckman) a 4° C.

Para eliminar los restos asociados a los cuerpos de inclusión se procedió al lavado de la muestra. Para ello, se resuspendió el precipitado en 4 mL de tampón de lavado (100 mM de Tris-HCl, pH 7; 5 mM EDTA; 5 mM DTT; 2 M Urea; 2% Triton X-100) por cada gramo de células hasta la completa solubilización del mismo, utilizando un homogeneizador Ultraturrax (IKA® Werke Staufen) cuando fue necesario.

Se centrifugó nuevamente durante 30 min a 13.500 rpm en un rotor (Beckman) JA 20 a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso de lavado 2 veces. Se lavó el precipitado nuevamente con el

tampón de lavado sin Triton X-100 ni urea. Para ello, se resuspendió nuevamente el precipitado en 4 mL de tampón por cada g de células. Se centrifugó durante 30 min a 13.500 rpm a 4 °C en un rotor JA 20 (Beckman) y se descartó el sobrenadante. Por último se resuspendió el precipitado en 2 mL de buffer de solubilización (20 mM Tris-HCl pH 8; 8 M Urea; 50 mM DTT; 300 mM NaCl) por cada g de células en origen.

8.1.2. Renaturalización de proteínas

Se probaron dos métodos para provocar el replegamiento de la proteína desnaturalizada obtenida a partir de los cuerpos de inclusión;

-mediante diálisis:

Se sometió a la muestra a diálisis frente a tampón 50 mM fosfato potásico pH 7.5 (Tabla 8), durante 24 h a 4º C. Las muestras se congelaron hasta su posterior análisis.

-mediante disolución rápida:

Se probaron diferentes tampones de renaturalización, variando las concentraciones cloruro cálcico (Tabla 8).

Se añadieron 1500 µL de tampón a 75 µL de muestra, para llegar a una dilución de 20:1. La muestra se incubó a 4º C durante 30 h.

Tabla 8. Tampones utilizados en los experimentos de replegamiento.

Tampón Base		Calcio (mM)		
50 mM fosfato potásico, pH 7.5	0	-	-	-
100 mM fosfato potásico, pH 7.5	0	-	-	-
100 mM Tris-HCl, pH 7.5	0	5	10	20
200 mM Tris-HCl, pH 7.5	0	5	10	20

8.1.3. Activación enzimática

Con el fin de observar el mecanismo de activación de la proteasa recombinante obtenida, se incubó la muestra renaturalizada en presencia de diferentes concentraciones de CaCl₂ en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37° C previa la medición de la actividad *k*-caseinolítica por el método anteriormente descrito (Ageitos *et al.*, 2006).

8.2. Expresión en *P. pastoris*

Para identificar los clones recombinantes de *P. pastoris* capaces de expresar el enzima se realizó un cultivo a pequeña escala. Se inoculó una única colonia en un matraz de 100 mL con 10 mL de medio de cultivo MGY. Se cultivó hasta que alcanzó una D.O. 600 nm de entre 4 y 6. Se centrifugó el cultivo a 5000 g durante 5 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 1.0 en MM (40-80 mL) para comenzar la inducción. Los cultivos se realizaron en matraces de 500 mL. A cada matraz se le añadió metanol hasta una concentración del 0.5 % cada 24 h para mantener la inducción. Se extrajo muestra del sobrenadante a las 0, 6, 16, 30, 54, 78, y 102 h para realizar ensayos de enzimáticos.

El sobrenadante del cultivo se concentró de 20 veces utilizando una célula de concentración Amicon y una membrana de tamaño de poro de 10 kDa.

Para evaluar la actividad enzimática a nivel intracelular se resuspendió el precipitado de un cultivo de 25 mL previamente lavado en 1 mL de buffer de lisis (10 mM fosfato potásico pH 6, 1 % DMSO, y 1 µg/mL DTT). A esta mezcla se le añadió la mitad de volumen de perlas de vidrio de 0.45 mm

(Glasperlen, B. Braun Biotech International) y se agitó en el vórtex hasta que las células de *P. pastoris* se rompieron completamente. La mezcla fue centrifugada 30 min a 45000 rpm y el sobrenadante se utilizó para realizar ensayos enzimáticos.

9. Modelización informática

Para la búsqueda de moldes a partir de las secuencias proteicas se utilizó el servicio “Swiss Model Workspace” (Arnold, *et al.*, 2006), el Phyre 2.0 (Protein Homology/analogy Recognition Engine) del Grupo de Bioinformática estructural del “Imperial College of London” (Kelley y Stenberg, 2009), para la caracterización de la secuencia se utilizó el servicio de predicción del CBS (Center for Biological Sequence Analysis) de la universidad técnica de Dinamarca, la base de datos de peptidasas MEROPS (Rawlings *et al.*, 2008) y la base de datos de enzimas BRENDA (Chang *et al.*, 2009). Se utilizó el programa Swiss-PdbViewer/DeepView v4.0 para realizar las representaciones tridimensionales de las proteínas.

El mismo programa fue utilizado para el alineamiento estructural y modelado de las secuencias sobre los moldes utilizados. Los modelos fueron ajustados manualmente, realizando minimizaciones de energía y rotaciones para ajustarse a los moldes. Se comprobaron y midieron las distancias moleculares con el programa 3D-Mol Viewer de la suite Vector NTI 10.3.1 Advance (Invitrogen).

Los modelos obtenidos fueron evaluados con la herramienta web Qmean desarrollada por el grupo de bioinformática estructural de proteínas del “Swiss Institute of Bioinformatics” y el Biozentrum de la universidad de

Basel. También se utilizó el programa Verify3D de la UCLA (Bowie *et al.*, 1992; Lüthy *et al.*, 1992).

10. Análisis estadísticos

Para determinar si los datos seguían una distribución normal, se calcularon los valores de kurtosis estándar y de asimetría a partir de una medición realizada veinte veces. La comparación de las varianzas se realizó mediante el estadístico F. Finalmente, se realizó un estudio de contraste de hipótesis, mediante tests *t* de Student de una y dos colas (Samuels y Witmer, 2003). Para los análisis estadísticos se empleó el programa Statgraphics Plus 5.1 (StatPoint, Inc., Rendón, VA).

11. Comparación de secuencias

Para el estudio de las secuencias se empleó la aplicación Blast 2.0 de la página web del NCBI, el programa informático SPDBviewer y el programa informático Vector NTI (Invitrogen).

1. Caracterización parcial de la cepa *B. licheniformis* USC-13

La cepa *B. licheniformis* USC13 fue aislada en este laboratorio en un muestreo rutinario para aislamiento de bacterias coagulantes de la leche. Las células de la cepa USC-13 de *B. licheniformis* tienen forma de bastón. Se presentan solas, en parejas o en cadenas. Son Gram positivo y tras 24 h de crecimiento producen esporas elipsoidales subterminales que distienden las células vegetativas. El flagelo se inserta en posición subpolar. Las colonias exhiben una forma irregular, y vesículas de gas (Fig. 23 A y B). En placas de LB agar suplementado con leche presentan halos de hidrólisis (Fig. 23 b y C)

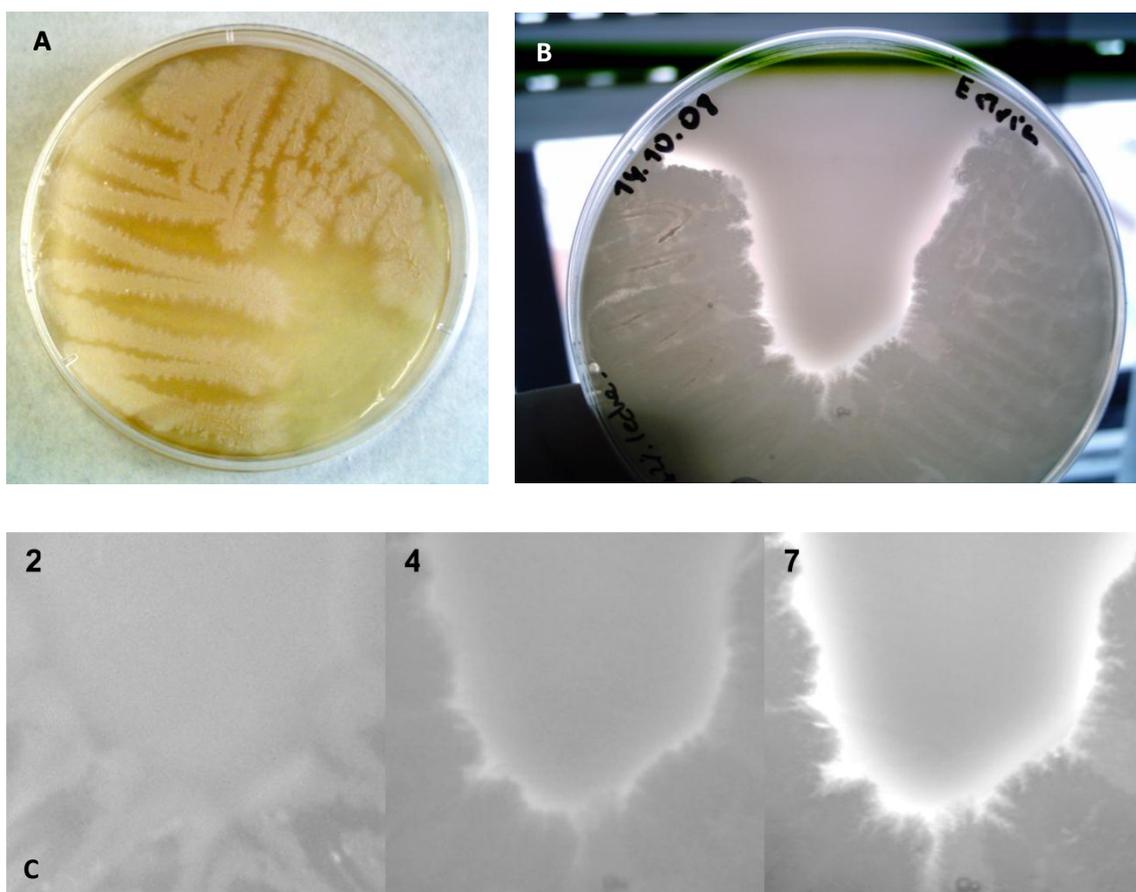


Figura 23: A. Placa de LB con *B. licheniformis* USC-13. B: Placa de LB con de leche con *B. licheiformis* USC-13. C: Hidrólisis de *B. licheniformis* USC-13 sobre LB con leche tras 2, 4 y 7 días de crecimiento.



Figura 24: *B. licheniformis* USC-13 en placa de agar con LB+FeSO₄ 0.4 g/L tras 24 h a 37° C.

B. licheniformis USC-13 se sembró en presencia de sales de hierro y tras 24 h se observó que las colonias se tiñeron de rojo-marrón en placas de 0.4 g/L de FeSO₄, y no en placas de 0.2 g/L de FeSO₄ (Fig. 24).

2. Desarrollo del método FTC-k-caseína

2.1. Estandarización del método FTC-k-caseína

La recta que relaciona la fluorescencia con la cantidad de FTC-k-caseína degradada (Fig. 25) permitió establecer una relación lineal entre los valores de fluorescencia obtenidos y las unidades enzimáticas. Se ha observado que los valores de fluorescencia residual siguen una relación lineal con la cantidad de sustrato. Para estandarizar el método, el valor obtenido en los controles (fluorescencia residual) se sustrajo de las mediciones. Es importante destacar que las concentraciones de las muestras enzimáticas y de los sustratos fueron las mismas en ambos ensayos, a pesar de que el número de uniones de FTC por molécula y gramo de sustrato es cuatro veces más alto en el caso del sustrato

comercial (FTC-caseína de Sigma-Aldrich, USA). De hecho, en la definición de unidad enzimática se tiene en cuenta la relación entre la fluorescencia y los valores de proteína.

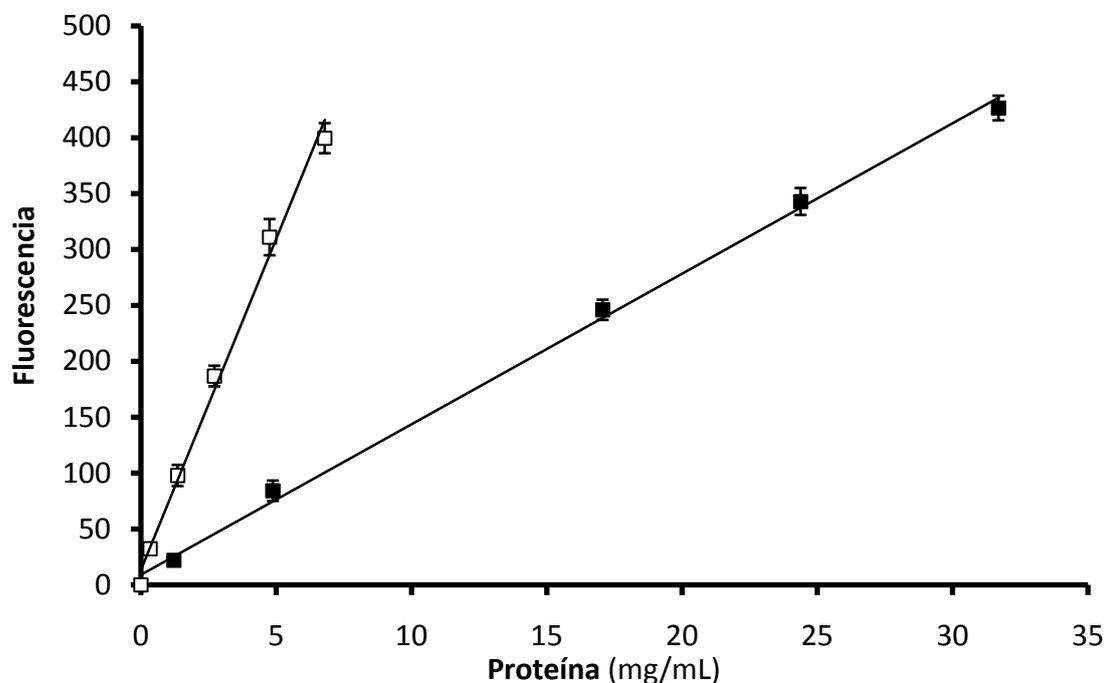


Figura 25. Recta de calibrado que relaciona la fluorescencia con la cantidad de (□) FTC-caseína degradada ($Y = 59.232X + 13.64$; $R^2 = 0.993$) y (■) FTC-k-caseína ($Y = 13.464X + 9.0912$; $R^2 = 0.996$). X se refiere a mg de proteína /mL e Y se refiere a los valores de fluorescencia. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados.

2.2. Validación del método FTC-k-caseína

Con el objetivo de validar el método FTC-k-caseína, se midió la actividad de muestras de enzimas de diferente origen (*R. miehei*, *E. coli* recombinante, *C. cardunculus*, *B. licheniformis* y *B. arnee bubalis*) de conocida actividad coagulante sobre la leche.

2.2.1. Linealidad del método

Se realizó una representación de la actividad específica empleando tres de las muestras enzimáticas (Fig. 26), donde se relacionaron los valores de la cantidad de proteína con los valores de unidad enzimática.

2.2.2. Estabilidad y sensibilidad del método

Para observar la estabilidad y sensibilidad del método, se midió la actividad de distintas diluciones del enzima procedente de *R. miehei*, manteniendo la reacción durante un tiempo que varió entre 15 y 185 min (Fig. 27).

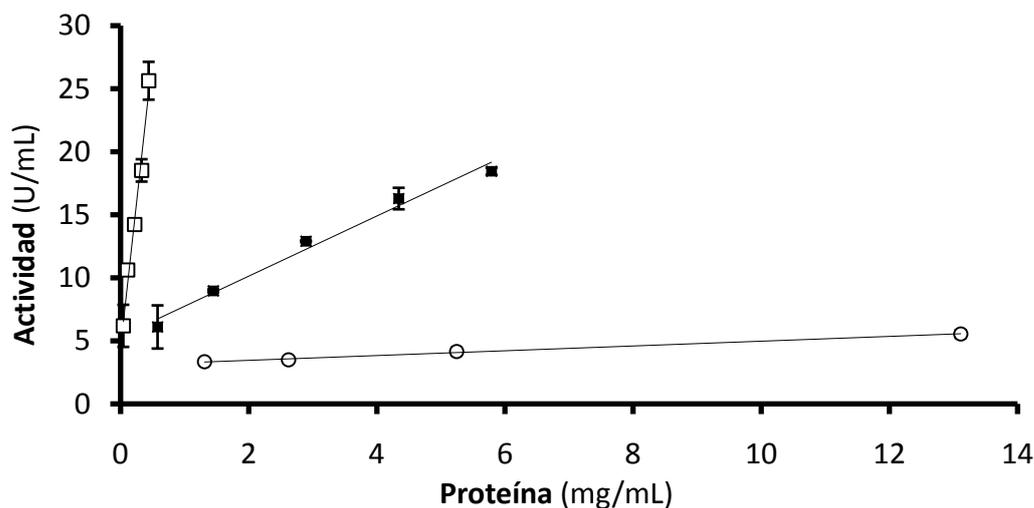


Figura 26. Actividad específica de las proteasas coagulantes de la leche procedentes de (□) *R. miehei* ($Y = 46.093X + 4.497$; $R^2 = 0.984$), (■) *B. licheniformis* ($Y = 2.386X + 5.359$; $R^2 = 0.984$) el extracto de cuajar de (○) *B. arnee bubalis* ($Y = 0.190X + 3.079$; $R^2 = 0.996$). X se refiere a mg de proteína /mL e Y se refiere a los valores de actividad (U/mL). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados.

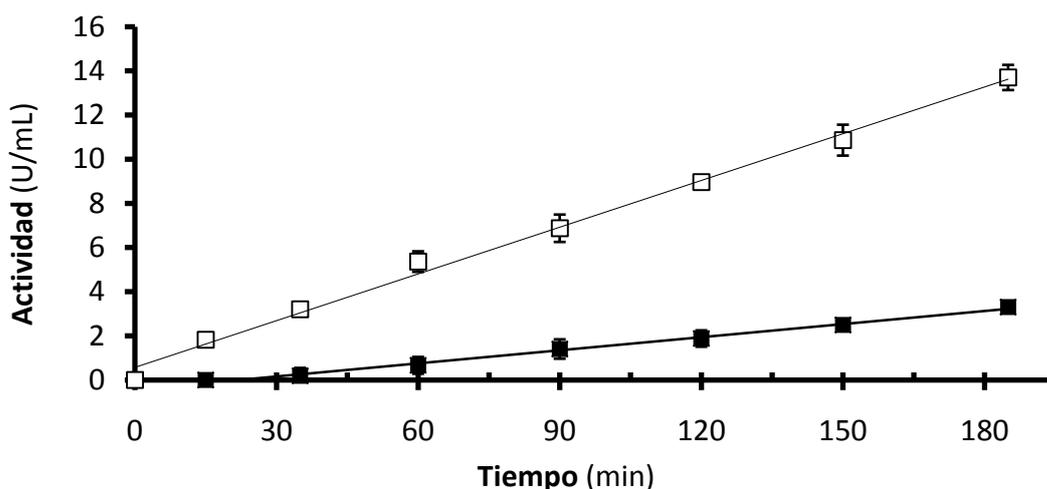


Figura 27. Efecto del tiempo de incubación y el factor de dilución sobre la actividad enzimática de la proteasa procedente de *R. miehei*. (□) 1/1.000 ($Y = 0.071X + 0.574$; $R^2 = 0.995$) y (■) 1/10.000 ($Y = 0.020X - 0.431$; $R^2 = 0.995$). X se refiere al tiempo e Y se refiere a

los valores de actividad (U/mL). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados.

2.3. Determinación de los parámetros cinéticos

Se estudiaron los parámetros cinéticos de cuatro muestras enzimáticas de diferente origen – *B. arnee bubalis*, *R. miehei*, *C. cardunculus* y quimosina recombinante (Chymax)- para evaluar la precisión del método FTC-*k*-caseína descrito en el presente trabajo. Como se puede observar en la Figura 28 la actividad de las cuatro muestras fue medida en presencia de concentraciones crecientes de sustrato. Los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de los cuatro enzimas estudiados se obtuvieron empleando el método de Lineweaver-Burk (Dixon y Web, 1979) (Fig. 29). El método FTC-*k*-caseína, permitió establecer los valores de los parámetros cinéticos (Tabla 9) de los cuatro enzimas coagulantes.

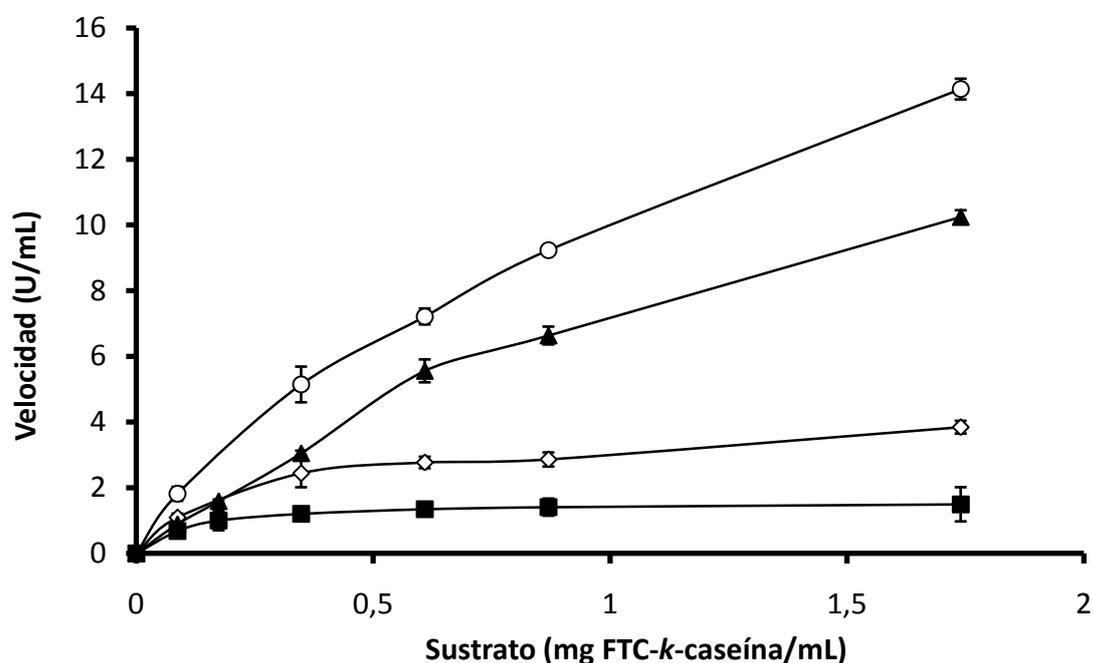


Figura 28. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de; (■) Chymax®, (o) *R. miehei*, *B. arnee bubalis* (▲) y (◇) *C. cardunculus*. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados.

Tabla 9. Valores de unidad enzimática por mL, actividad específica, concentración de proteína, $V_{m\acute{a}x}$ y K_m de todas los enzimas coagulantes probados.

Muestra enzimática	$V_{m\acute{a}x}$	K_m	U*/mL	mg proteína/mL	Actividad específica
<i>B. arnee bubalis</i>	22.124	2.108	10.243 ± 0.21	0.164 ± 0.02	62.46
<i>C. cardunculus</i>	3.912	0.225	3.841 ± 0.21	0.013 ± 0.03	295.48
<i>R. miehei</i>	16.611	0.714	14.139 ± 0.05	0.013 ± 0.02	1.087.63
Chymax®	0.328	2.280	1.492 ± 0.52	0.005 ± 0.01	331.66

* Se definió una unidad enzimática (U) como la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 μ g de FTC-k-caseína en 1 h a 37 ° C.

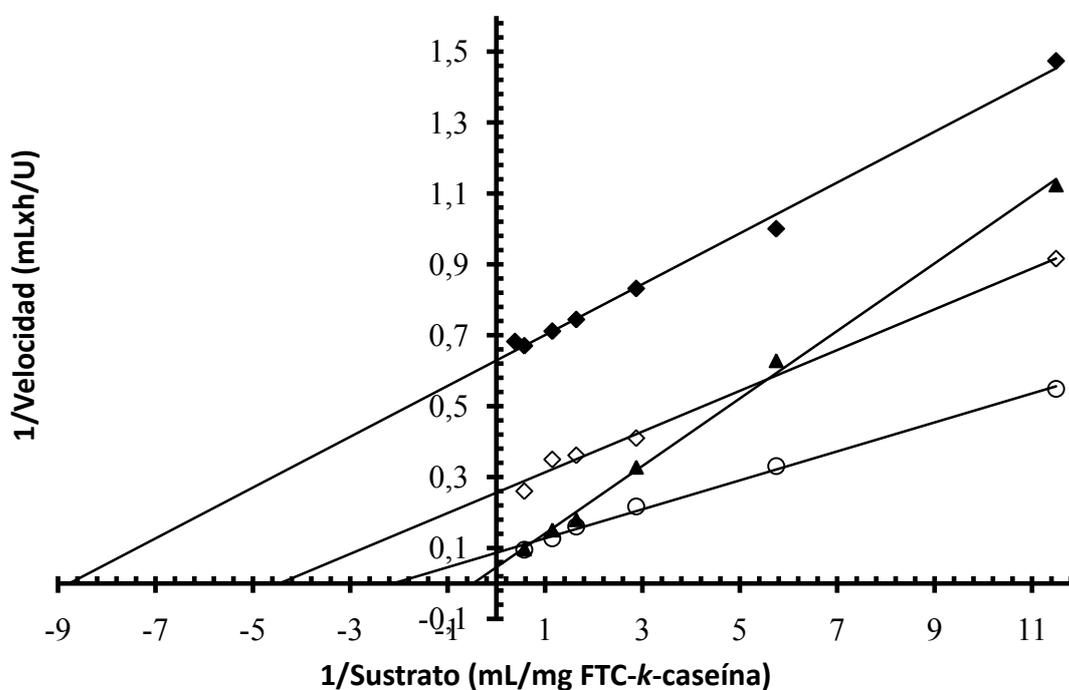


Figura 29. Representación de Lineweaver-Burk de la actividad enzimática de; (■) Chymax® ($Y = 0.072X + 0.629$; $R^2 = 0.995$), (o) *R. miehei* ($Y = 0.041x + 0.087$; $R^2 = 0.996$), (▲) *B. arnee bubalis* ($Y = 0.095X + 0.045$; $R^2 = 0.997$), y (◇) *C. cardunculus* ($Y = 0.058x + 0.256$; $R^2 = 0.993$).

2.4. Ensayos de inhibición

Los ensayos de inhibición realizados empleando el método FTC-k-caseína con las muestras procedentes de *B. licheniformis* y *B. arnee bubalis*,

originaron los valores que se pueden apreciar en la Tabla 10. La proteasa producida por *B. licheniformis* fue inhibida en presencia de PMSF. Por otro lado, la quimosina de *B. arnee bubalis* fue inhibida en presencia de pepstatina A.

Tabla 10. Efecto de los inhibidores en la actividad enzimática de las muestras procedentes de *Bacillus licheniformis* y *Bubalus arnee bubalis*.

Muestras enzimáticas	Inhibidor*	Concentración	Actividad residual %
<i>B. licheniformis</i>	Control	0	100 ± 0.45
	Control con etanol	10 µL/mL	95.62 ± 0.49
	PMSF	1 mM	0 ± 0.54
	DTT	1 mM	109.02 ± 0.72
	EDTA	1 mM	93.60 ± 0.91
	Pepstatina A	1 µg/mL	99.73 ± 0.61
<i>B. arnee bubalis</i>	Control	0	100 ± 2.74
	Control con etanol	10 µL/mL	96.74 ± 2.58
	PMSF	1 mM	100.55 ± 7.24
	DTT	1 mM	99.45 ± 4.19
	EDTA	1 mM	105.22 ± 4.63
	Pepstatina A	1 µg/mL	43.42 ± 1.03

*Inhibidores: PMSF = Fenilmetilsulfonilfluoruro, DTT = Ditioneitol y EDTA = Ácido etilendiaminotetraacético.

2.5. Especificidad del ensayo FTC-k-caseína para la medición de la degradación de la k-caseína

Una vez establecida la estandarización y validación del método descrito y, con intención de determinar la especificidad de la medición de la degradación de la k-caseína, se realizó una comparación estadística entre el método aquí descrito y el descrito por Twining (1984) tal como se

describe en el apartado 10 de materiales y métodos. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 11.

Cuando se analizó la distribución de los datos, se encontró que los valores de kurtosis estándar y de asimetría estándar fueron de 0.895 y -1.430, respectivamente. Estos valores demostraron que los datos siguen una distribución normal ya que están incluidos en el intervalo -2 a 2.

Tabla 11. Unidades enzimáticas/mL de la tripsina (1 $\mu\text{g/mL}$) y de la proteasa de *Rhizomucor miehei* (5 $\mu\text{g/mL}$) usando el ensayo FTC-caseína y el ensayo FTC-k-caseína

Muestra	Ensayo		F test		t test de Student	
	FTC-caseína	FTC- k-caseína	Valor F	Valor P	Valor T	Valor P
Tripsina	28.28 \pm 0.53	28.22 \pm 0.31	2.822	0.523	0.113	0.542 ^a 0.916 ^b
R. miehei	4.68 \pm 0.41	12.41 \pm 0.32	1.595	0.771	-14.829	0.602 10 ^{-4a} 1.204 10 ^{-4b}

^a P valor obtenido en el test t de Student de una cola. ^b P valor obtenido en el test t de Student de dos colas.

Ya que los datos presentaron una distribución normal, se pudo realizar la comparación de las varianzas, estableciéndose las siguientes hipótesis:

$$H_0: S_{\text{Ensayo FTC-caseína}} = S_{\text{Ensayo FTC-k-caseína}}$$

$$H_1: S_{\text{Ensayo FTC-caseína}} \neq S_{\text{Ensayo FTC-k-caseína}}$$

Tal como se puede observar en la Tabla 11, en ambos casos el valor P obtenido es mayor que 0.05, por lo que la hipótesis H_0 no puede ser rechazada, lo que indica que no hay diferencias entre las varianzas de los métodos.

Los datos estadísticos obtenidos indicaron que no existen diferencias significativas entre las varianzas, lo cual permitió establecer que ambos métodos son comparables. Por ello, se realizó una comparación de las medias, entre los valores de actividad obtenidos empleando tripsina y la proteasa de *R. miehei*, empleando ambos métodos, y mediante un test *t* de Student de una cola y un test *t* de Student de dos colas.

El test *t* de dos colas se realizó de acuerdo con la siguiente hipótesis:

H_0 : Ensayo FTC-caseína = Ensayo FTC-*k*-caseína.

H_1 : Ensayo FTC-caseína \neq Ensayo FTC-*k*-caseína.

Tal como se aprecia en la Tabla 11, en el caso de la tripsina el valor P es mayor de 0.05, demostrando que la hipótesis nula no puede ser rechazada, y, por tanto, que no hay diferencias significativas entre las mediciones por ambos métodos. En el caso de la medición de *R. miehei* el valor P es menor de 0.01, lo que indica que hay diferencias altamente significativas entre las mediciones realizadas con métodos diferentes.

Para comprobar estadísticamente en cuál de los métodos se obtienen unos valores más elevados, y por tanto más sensible, se realizó un test *t* de dos colas, estableciendo las siguientes hipótesis:

H_0 : Ensayo FTC-caseína = Ensayo FTC-*k*-caseína.

H_1 : Ensayo FTC-caseína < Ensayo FTC-*k*-caseína.

El valor P de la tripsina (Tabla 11) fue mayor de 0.05, indicando que la H_0 no puede ser rechazada. Finalmente, en el caso de los datos de *R. miehei*, el valor P fue más pequeño de 0.01, rechazando la hipótesis nula y aceptando la hipótesis alternativa.

2.6. Análisis de los sustratos FTC-caseína y FTC-k-caseína

Para comparar la naturaleza de los sustratos empleados en ambos métodos, estos se sometieron a electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida. Tal como se puede apreciar en la Figura 30. La muestra de FTC-caseína mostró el bandeo típico de las caseínas, apareciendo las formas α , β y k de las caseínas. La muestra de FTC- k -caseína no mostró el mismo patrón de bandas, aunque se puede intuir la presencia de las bandas de las otras caseínas, la banda que se corresponde a la k -caseína es la mayoritaria.

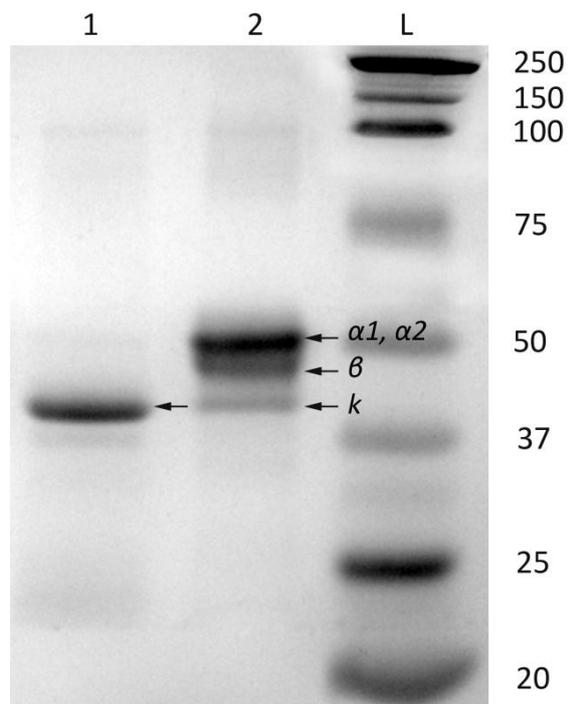


Figura 30: Gel de electroforesis de proteínas SDS-PAGE de los sustratos FTC- k -caseína (Calle 1) y FTC-caseína (Calle 2). L: marcador de pesos moleculares. α) α -caseína. β) β -caseína. k) k -caseína

3. Crecimiento microbiano y producción de enzima

La cepa USC-13 presentó actividad coagulante de leche cuando se cultivó en medio LB. En placas de LB con leche se apreció un halo de proteólisis transparente y un halo opaco (Fig. 23 B y C). No se encontró actividad coagulante cuando la cepa se cultivó en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono. Por tanto, la producción de enzima se realizó en medio LB. La producción máxima del enzima se produjo a las 50 h de crecimiento (Fig. 31A) y el pH del medio fue aumentando con el tiempo de cultivo.

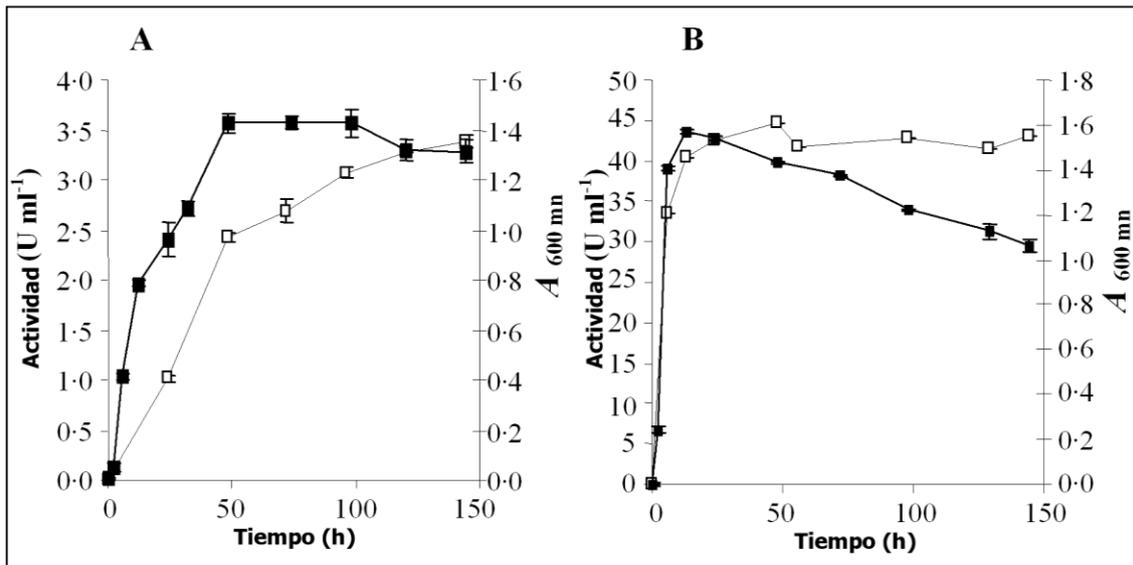


Figura 31: Curvas de crecimiento y producción de *B. licheniformis* USC-13 cultivado en matraz (A) y en un fermentador (B). Actividad enzimática (□) y densidad óptica del cultivo (●). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados.

3.1. Producción del enzima en un fermentador de 30L

La cepa se cultivó en medio LB en un fermentador de 30 L. La máxima actividad se obtuvo tras 48 h de crecimiento en el fermentador (Fig. 31B).

4. Determinación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$

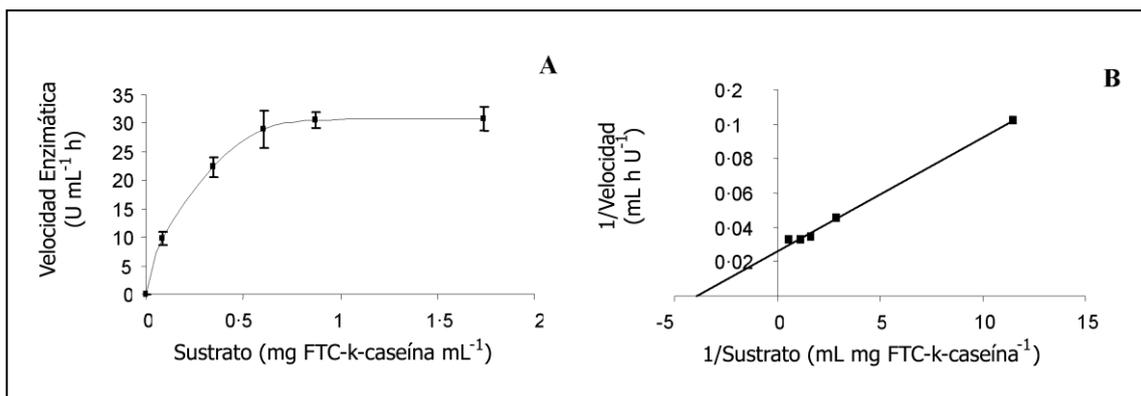


Figura 32: A. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. B. Representación de Lineweaver-Burk de las muestras enzimáticas de *B. licheniformis* USC-13. ($Y = 0.007X + 0.026$; $R^2 = 0.996$). Las barras de error se corresponden con la desviación estándar de las muestras.

Tal como se muestra en la Figura 32A, la actividad de la muestra enzimática se midió en presencia de concentraciones crecientes de sustrato. Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m fueron 38.61 U/mL y 0.26 mg de FTC-caseína/mL, respectivamente (Fig. 32B).

5. Purificación del enzima

Tal como se esperaba, la muestra enzimática secretada por *B. licheniformis* USC-13 concentrada presentó un incremento de la actividad proteolítica. Sin embargo, la concentración de la muestra incrementó la acumulación de productos secundarios de la fermentación que produjeron mal olor y aspecto desagradable de dichas masas queseras. La muestra presentaba capacidad de coagular la leche pero, posteriormente, la masa quesera se degradaba (Fig. 33C). Con el fin de eliminar esta actividad degradativa de las muestras enzimáticas, se realizó una semipurificación de la proteasa coagulante de leche. La purificación del enzima se empezó mediante precipitación con sulfato amónico; la máxima actividad enzimática obtenida de los precipitados se encontró a 60% de saturación. Este sustrato se utilizó como base para posteriores pasos de purificación. Así este precipitado perdió la mayor parte de las impurezas que se obtuvieron durante la concentración, y la coagulación de la leche dejó de estar acompañada de la degradación de las masas queseras (Fig. 33 B).

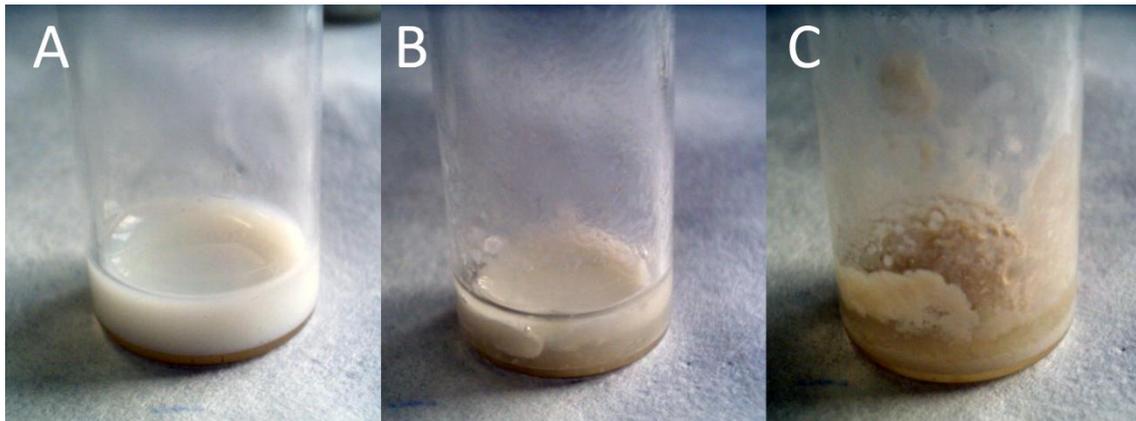


Figura 33: Ensayos de coagulación de los extractos de *B. licheniformis* USC-13 sobre leche en polvo reconstituida. A. Control negativo. B. Muestra semipurificada. C. Muestra total concentrada.

Tras someter la muestra enzimática semipurificada a isoelectroenfoque, se encontró una fracción activa con un pI de 9.2. Esta muestra activa que presentaba actividad *k*-caseinolítica fue sometida a SDS-PAGE, observándose una banda de 62 kDa (Fig. 34 A. Calle 5). Cuando la muestra procedente de la precipitación de sulfato de amonio se sometió a cromatografía de intercambio catiónico se obtuvo una fracción activa.

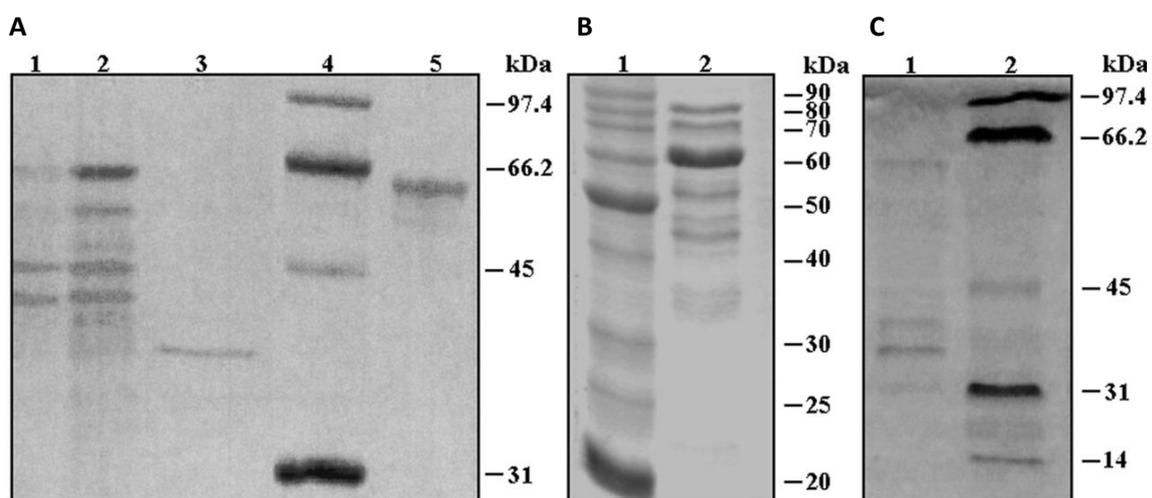


Figura 34: SDS-PAGE de las diferentes muestras enzimáticas de *B. licheniformis* USC-13. Calle 1. Muestra concentrada de sobrenadante de cultivo. Calle 2: Muestra enzimática del sobrenadante de cultivo semipurificada con sulfato de amonio. Calle 3. Muestra enzimática procedente de la fracción activa de 35 kDa de la cromatografía de exclusión molecular. Calle 4. Marcador de pesos moleculares. Calle 5: Muestra enzimática

procedente de la fracción pI 9.2 del isoelectroenfoque. **B. Calle 1:** Marcador de peso molecular. **Calle 2:** Muestra enzimática procedente de la cromatografía de intercambio catiónico. **C. Calle 1:** Muestra enzimática procedente de la fracción activa de 60 kDa de la cromatografía de exclusión molecular. **Calle 2:** Marcador de peso molecular.

Esta fracción activa presentó varias bandas en SDS-PAGE, siendo una banda de 62 kDa la mayoritaria (Fig. 34 A. Calle 4). Esta fracción activa obtenida a partir de la cromatografía de intercambio catiónico (Fig. 34 B. Calle 2) se sometió a cromatografía de exclusión molecular. Se obtuvo actividad en dos picos, aproximadamente de 60 kDa y 35 kDa. Cuando la muestra de 60 kDa fue analizada por SDS-PAGE se obtuvo una banda de 62 kDa, tal como se esperaba, pero se encontraron bandas de inferior tamaño, incluyendo una de 34 kDa, que era la mayoritaria (Fig. 34 C. Calle 1). El pico activo de aproximadamente 35 kDa fue analizado por SDS-PAGE encontrándose una banda de 34 kDa (Fig. 34. A. Calle 3).

6. Localización celular del enzima

Tal como se puede observar en la Figura 35, el 85 % de la actividad *k*-caseinolítica total de la célula se puede encontrar en el exterior de la membrana plasmática, apareciendo la menor parte en el interior celular.

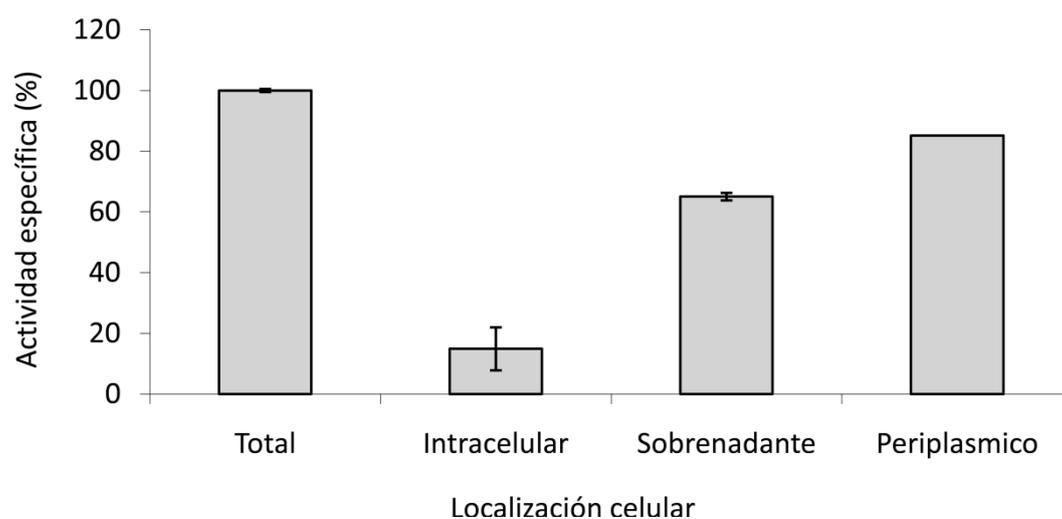


Figura 35: Localización celular de la actividad *k*-caseinolítica de *B. licheniformis* USC-13. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar de las muestras.

La cepa USC-13 produce una sustancia mucilaginosa con tendencia a la precipitación y la obturación de filtros que dificulta la purificación del enzima. Se observó que los crudos enzimáticos aumentaron su actividad tras el almacenamiento a 4º C.

7. Temperatura y pH óptimos

La mayor actividad de la proteasa de 62 kDa se obtuvo a pH 7.5 y 37ºC. La proteasa de 34 kDa mostró unos valores de actividad máxima a pH 6 y 30º C (Fig. 36).

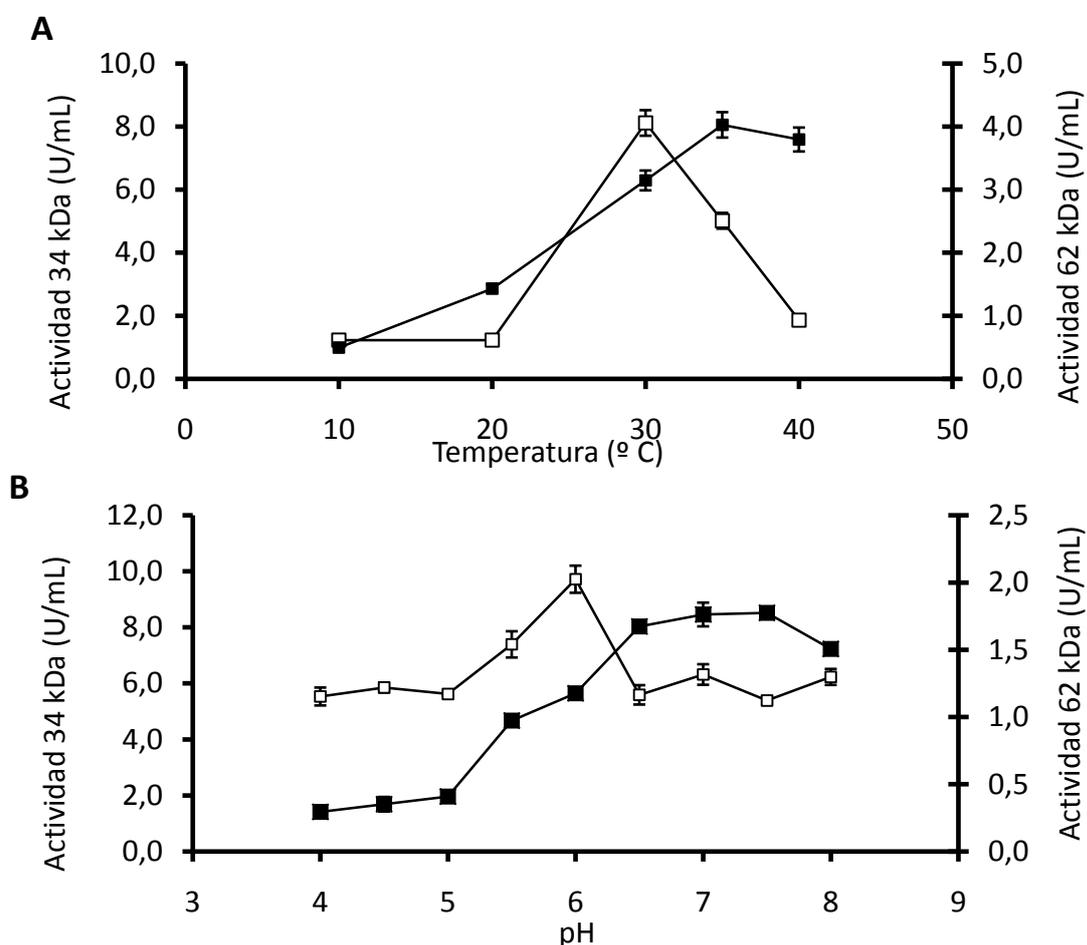


Figura 36: **A.** Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las muestras enzimáticas de *B. licheniformis* USC-13. ■ Actividad de la muestra de 62 kDa. □ Actividad de la muestra de 34 kDa. **B.** Efecto del pH sobre la actividad enzimática de las muestras enzimáticas de *B. licheniformis* USC-13. ■ Actividad de la muestra de 62 kDa. □ Actividad de la muestra de 34 kDa. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de las muestras.

8. Elaboración y análisis de masas queseras

Los crudos enzimáticos concentrados produjeron masas queseras semidegradadas de color marrón, con un olor desagradable, cuyo análisis posterior fue imposible por su falta de consistencia (Fig. 33 C). La muestra enzimática semipurificada con sulfato de amonio, enriquecida en la banda de 62 kDa, produjo masas queseras blancas, firmes y sin olores extraños (Fig. 37A, B y C).

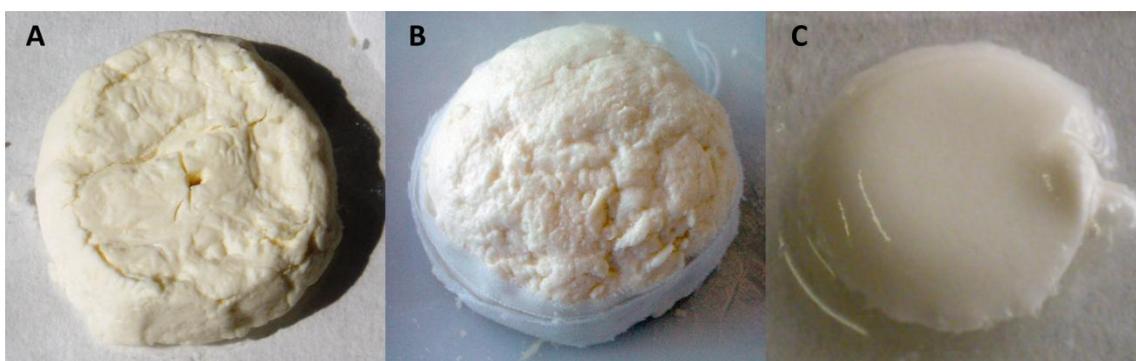


Figura 37: Masas queseras elaboradas con la muestra enzimática semipurificada con sulfato amónico. **A:** Leche de vaca. **B:** Leche de búfala. **C:** Leche en polvo desnatada reconstituida.

Con el fin de determinar la estabilidad de las masas queseras, estas se mantuvieron en presencia de su propio suero lácteo durante 72 h. Se observó que las masas queseras elaboradas con el enzima semipurificado se mantenían tan firmes como al principio.

Las masas queseras de leche de búfala y de leche desnatada en polvo presentaron valores de contenido en agua inferiores a las que presentó el control (enzima comercial de *R. miehei*) (Test estadístico: $\alpha = 0.05$; t -value = - 4.33 and p -value = $6.16 \cdot 10^{-3}$; t -value = - 2.28 and p -value = 0.04; respectivamente) (Tabla 12). Las masas queseras producidas con leche en polvo desnatada reconstituida presentaron valores superiores de dureza

(1.95 veces) y de materia seca (1.24 veces mayor) con respecto al control (Test estadístico: $\alpha = 0.05$; t -value = 44.52 and p -value = $7.61 \cdot 10^{-7}$. t -value = 7.46 y p -value = $8.62 \cdot 10^{-4}$, respectivamente). Este fenómeno se repitió en todas las masas queseras realizadas con el enzima semipurificada, a excepción de la masa obtenida a partir de leche de búfala. En este caso se obtuvo un incremento en el contenido graso, lo que produjo una reducción del índice de dureza. En el caso de las masas queseras obtenidas a partir de leche de vaca se obtuvo un menor contenido graso y una dureza superior a la del control (9.2 veces más, test estadístico: $\alpha = 0.05$; t -value = -12.32 y p -value = $1.24 \cdot 10^{-4}$).

Tabla 12: Análisis reológico de las masas queseras obtenidas a partir del sobrenadante de cultivo de *B. licheniformis* USC-13 precipitado con sulfato de amonio y el control (coagulante microbiano comercial de *R. miehei*).

	Leche de vaca		Leche en polvo desnatada		Leche de búfala	
	USC-13	Control	USC-13	Control	USC-13	Control
DM (%)	43.2 ± 1.3	43.5 ± 1.8	33.7 ± 1.1	26.2 ± 1.3	58.4 ± 2.2	47.9 ± 2.4
M (%)	56.8 ± 3.9	56.5b ± 3.3	66.3 ± 4.0	73.8 ± 4.0	41.6 ± 2.7	52.2 ± 3.3
FC (%)	19.7 ± 0.3	28.7 ± 1.2	0.00	0.00	35.1 ± 0.9	29.5 ± 1.0
FC/DM	45.6 ± 2.3	66.0 ± 3.9	-	-	60.1 ± 3.4	61.8 ± 4.3
pH	4.7 ± 0.1	6.0 ± 0.2	4.7 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.1 ± 0.1	5.4 ± 0.1
MNF (%)	70.7 ± 2.2	94.6 ± 4.8	66.3 ± 3.2	73.8 ± 2.9	75.4 ± 4.0	94.4 ± 4.3
F _{máx} (N)	486.1 ± 15.2	52.8 ± 2.4	102.8 ± 3.7	8.3 ± 0.3	134.7 ± 5.8	225 ± 11.3

DM: Materia seca. M: % de humedad. FC: Contenido graso. MNF: Contenido no graso. F_{máx}: Fuerza máxima de compresión (N).

Los pH de las masas queseras elaboradas con leche de vaca y leche desnatada en polvo reconstituida (Test estadístico: $\alpha = 0.05$; t -value = -9.86 and p -value = $2.97 \cdot 10^{-4}$, t -value = -12.25 and p -value = $1.28 \cdot 10^{-4}$, respectivamente) fueron inferiores a los obtenidos en el control.

9. Clonación del gen la proteasa Epr.

A partir de la secuencia depositada en el Genbank Ne006270.3 se diseñaron oligonucleótidos específicos para aislar por PCR la secuencia de la proteasa Epr a partir del DNA genómico de *B. licheniformis* USC-13. Se empleó el enzima Accuzyme (Bioline) para producir fragmentos romos (Fig. 38). La temperatura óptima de amplificación fue de 56° C. El producto se secuenció y la secuencia no presentó diferencias con la descrita en las bases de datos. Se utilizó el vector pCR-Blunt II Topo (Invitrogen) como lanzadera para su posterior movilización a otros vectores. Se utilizó la cepa de *E. coli* OneShot TOP10 para la selección de transformantes en kan.

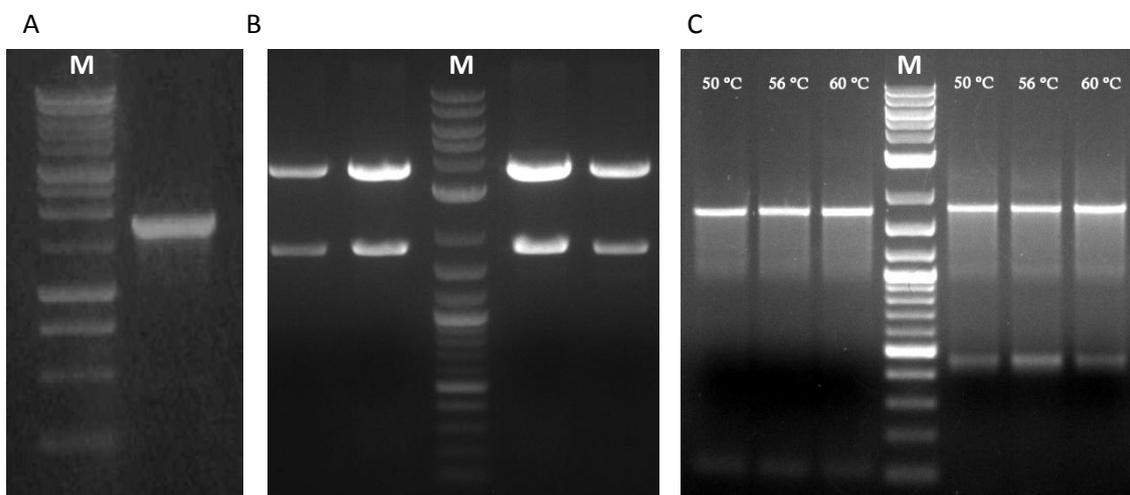


Figura 38: Electroforesis de DNA. A: Amplificación del gen de la proteasa *epr*. B: Patrón de bandeado del vector pCR-BluntII TOPO con el gen *epr* digerido con *EcoRI*. C: Amplificación del gen de la proteasa *epr* con dianas a diferentes temperaturas. M: Marcador de peso molecular.

El vector pCRBluntIITOPO con el gen *epr* fue digerido con *EcoRI* Tras la digestión, se purificó el fragmento resultante, de 1794 pb que se

correspondió con la preproEpr. Se procedió a la digestión del vector de expresión pET30a con *EcoRI* y se desfosforiló para evitar su recirculación.

Tras el análisis de la secuencia y localización del péptido señal con el programa SignalP 3.1. Se diseñaron unos oligonucleótidos que contenían dianas de *EcoRI* para amplificar el gen de *epr* con y sin péptido señal (preproEpr y proEpr) El amplicón fue purificado de gel y digerido con *EcoRI*. El vector pET30a fue linealizado y desfosforilado tal como se describió anteriormente.

10. Expresión de la proteasa Epr en *E. coli*.

Se utilizaron diferentes relaciones molares (1:1; 1.5:1; 2:1) para la ligación de los insertos (preproEpr y proEpr) y el vector (pET30a). Se transformó con este producto la cepa de *E. coli* OneShot. Se extrajo el DNA plasmídico de los transformantes y se digirió con el enzima *HindIII* para observar la orientación del inserto.

Las construcciones plasmídicas obtenidas (preproEpr y proEpr) se emplearon para transformar la cepa BL21(DE3).

Se realizaron experimentos de inducción con IPTG con ambas construcciones. Se tomaron muestras previas a la inducción y tras 1 y 3 h. La inducción se realizó a 24 y 37 ° C con y sin kanamicina.

Se separaron fracciones de proteína total, extracto soluble de la célula y el sobrenadante del cultivo. Se cuantificó la actividad enzimática, la cantidad total de proteína y se sometieron las muestras a SDS-PAGE al 7.5 % (Fig. 39, 40 y 41).

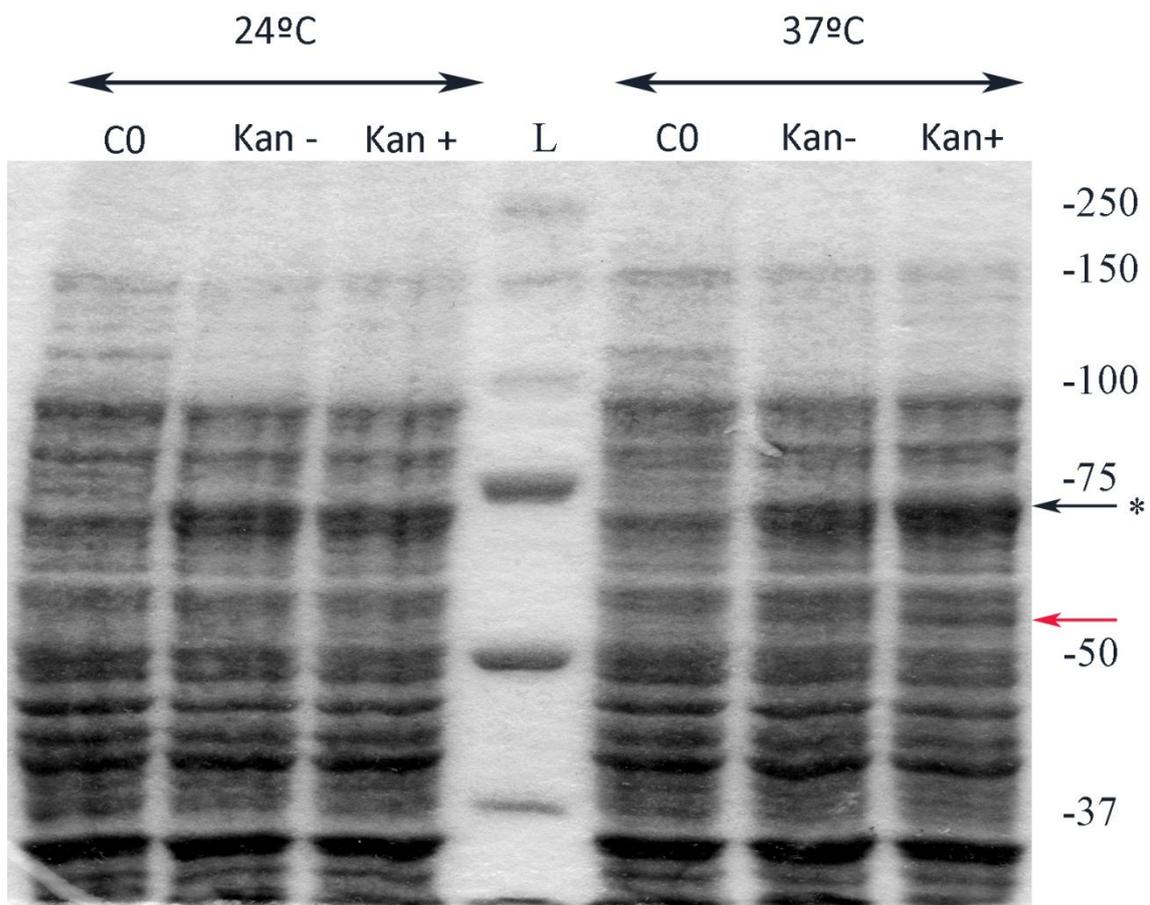


Figura 39: SDS-PAGE del extracto total de *E. coli* BL21(DE3) con pET30a proEpr tras 1 hora post inducción a diferentes temperaturas. CO: Control negativo. Kan-/Kan+: sin y con kanamicina. *Banda del tamaño teórico de la preproEpr. L: Marcador de peso molecular.

Se obtuvo una fuerte sobreexpresión de la proteína de interés en todas las condiciones ensayadas (Fig. 39, 40). No se encontraron diferencias de expresión entre las construcciones con y sin péptido señal. La expresión a 37°C produjo una mayor cantidad de proteína, pero ésta se encontró totalmente en cuerpos de inclusión, solo observándose en extractos totales y no en fase soluble.

Tras 3 horas de inducción, la producción de proteína se hizo más evidente. En los experimentos realizados con 24 h de inducción no se observó un incremento de la banda de interés; la mayor producción parece tener lugar en las primeras 3 h de inducción.

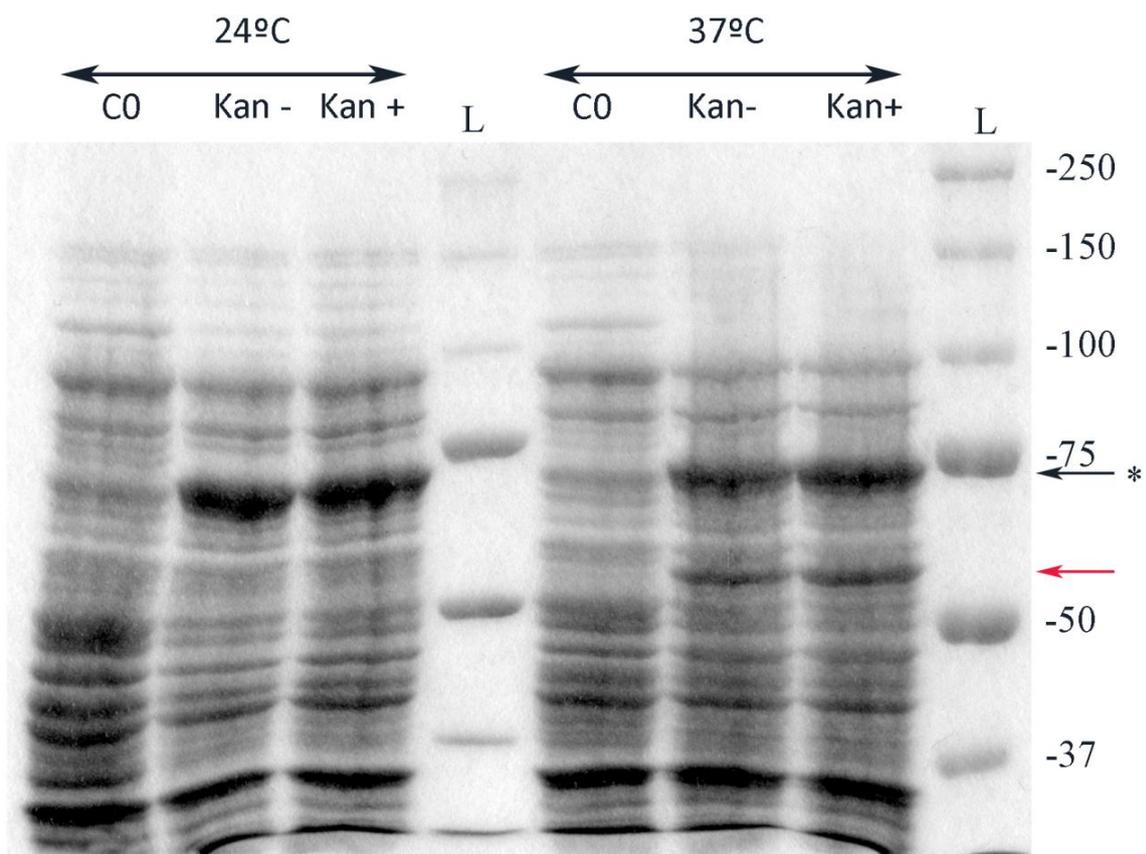


Figura 40: SDS-PAGE del extracto total de *E. coli* BL21(DE3) con pET30a proEpr tras 3 h de inducción a diferentes temperaturas. CO: Control negativo. Kan-/Kan+: Expresión sin y con kanamicina. *Banda de tamaño teórico de la preproEpr. L: Marcador de pesos moleculares.

A 37° C se observó la aparición de una nueva banda de tamaño inferior a la deseada (Fig. 39 y 40). Esta banda se puede apreciar tras 1 h de inducción, aumentando a las 3 h de inducción.

En cuanto a las muestras del extracto soluble (fase soluble del interior celular), solo se encontró la banda de interés en las muestras inducidas a 24°C (Fig. 41). Estas muestras no mostraron actividad enzimática, siendo inferiores a las que mostró la cepa control (Fig. 42). Ninguna de las muestras ensayadas produjo la coagulación de la leche. Se realizaron pruebas de inducción a 4 y 18 ° C durante 24 h para incrementar la cantidad de banda soluble y evitar la formación de cuerpos de inclusión, pero no se encontró actividad.

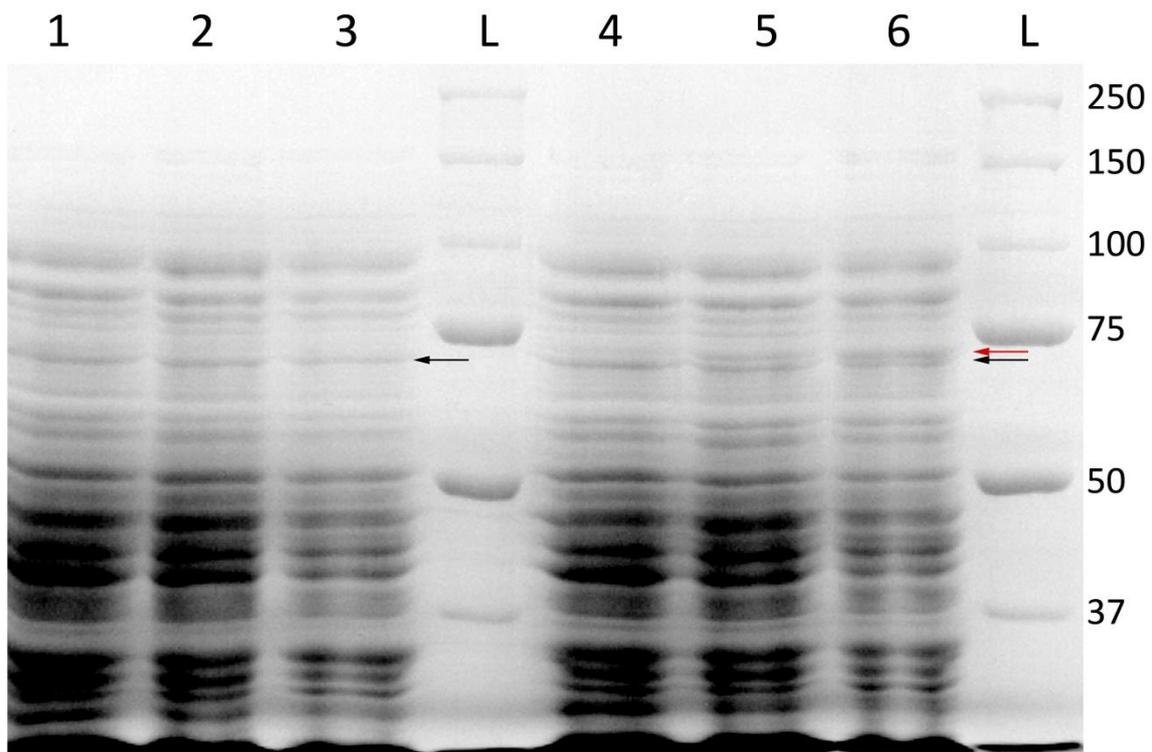


Figura 41: SDS-PAGE de la fase soluble total de las células *E. coli* BL21(DE3) con pET30a proEpr tras 3 h de inducción a 24° C. Calles 1, 2 y 3: Cepa control. Calle 1: Tiempo 0. Calle 2: 1 h de inducción. Calle 3: 3 h de inducción. Calle 4: Marcador de peso molecular. Calles 5, 6 y 7: Cepa portadora del vector. Calle 5: Tiempo 0. Calle 6: 1 h de inducción. Calle 7: 3 h de inducción. Flecha negra: Banda proteica control de *E. coli*. Flecha roja: Banda del peso teórico de la preproEpr.

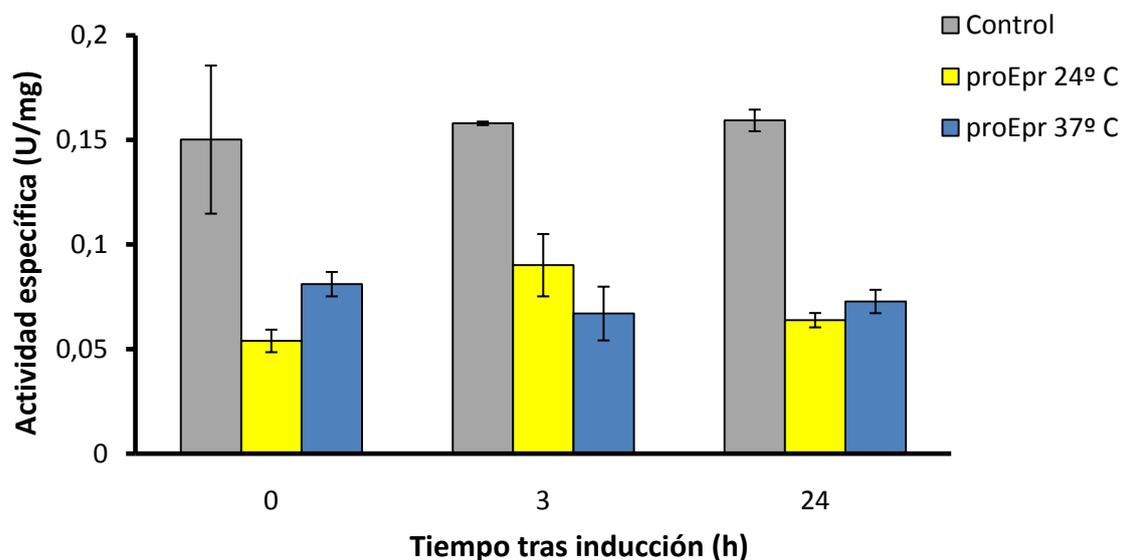


Figura 42: Actividad enzimática específica de la fracción soluble de *E. coli* BL21(DE3) con pET30a + preproEpr a 24° C y 37° C. Control: Cepa con vector sin inserto. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de los triplicados.

11. Modelización de la proteasa.

A partir de las búsquedas en las bases de datos se encontró una alta homología estructural de la proteasa de estudio con la tk-subilisina 2e1p de *Thermococcus kodakarensis*, utilizándose esta proteasa como molde para la modelización. El servidor Phyre 2.0 fue el que mejores resultados de homología encontró. La Epr madura de *B. licheniformis* USC-13 tiene una alta homología con la Subtilisina 1GCI de *Bacillus lentus*, a partir de esta secuencia se modeló la proteasa madura. El programa Swiss-PdbViewer/DeepView v4.0 permitió el manejo de las estructuras de un modo sencillo e intuitivo. Los modelos tridimensionales obtenidos (Fig. 43 y 44) mostraron unos valores Qmean superiores a modelo tomado como origen, no ocurriendo lo mismo con la proteasa madura, dado que la estructura 1GCI tiene una exactitud muy superior a la media (resolución 0.78 Å, Z-score superior a 0) tal como se puede observar en la Tabla 13.

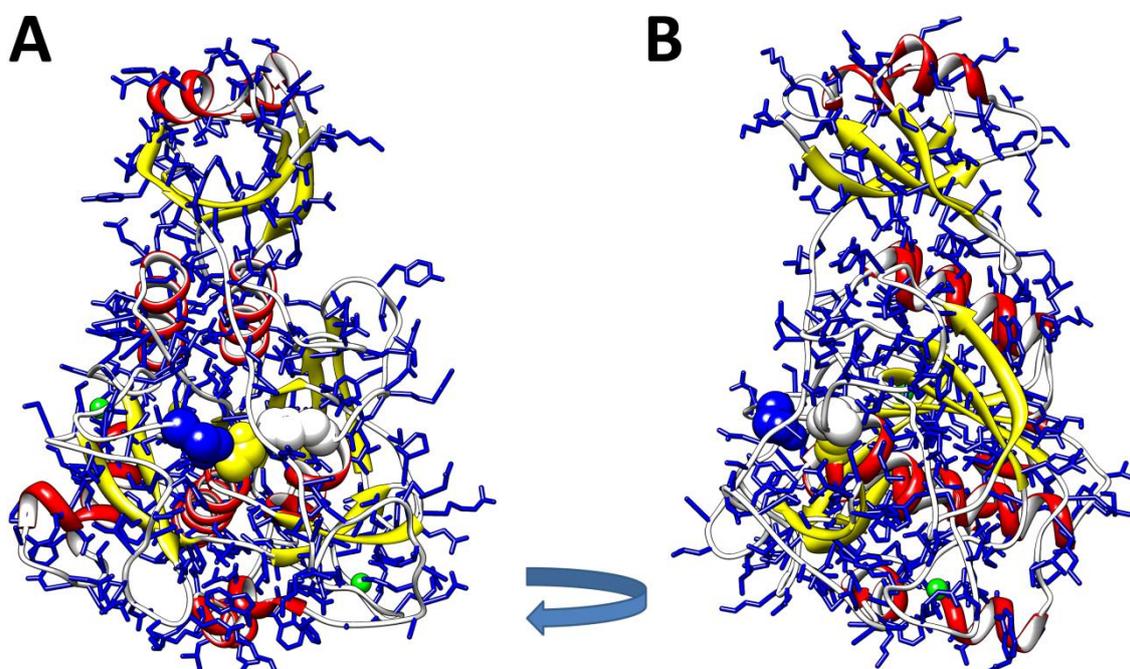


Figura 43: Modelización informática de la estructura tridimensional de la proEpr. Destacando los aminoácidos del centro activo. A: vista frontal. B: Vista lateral.

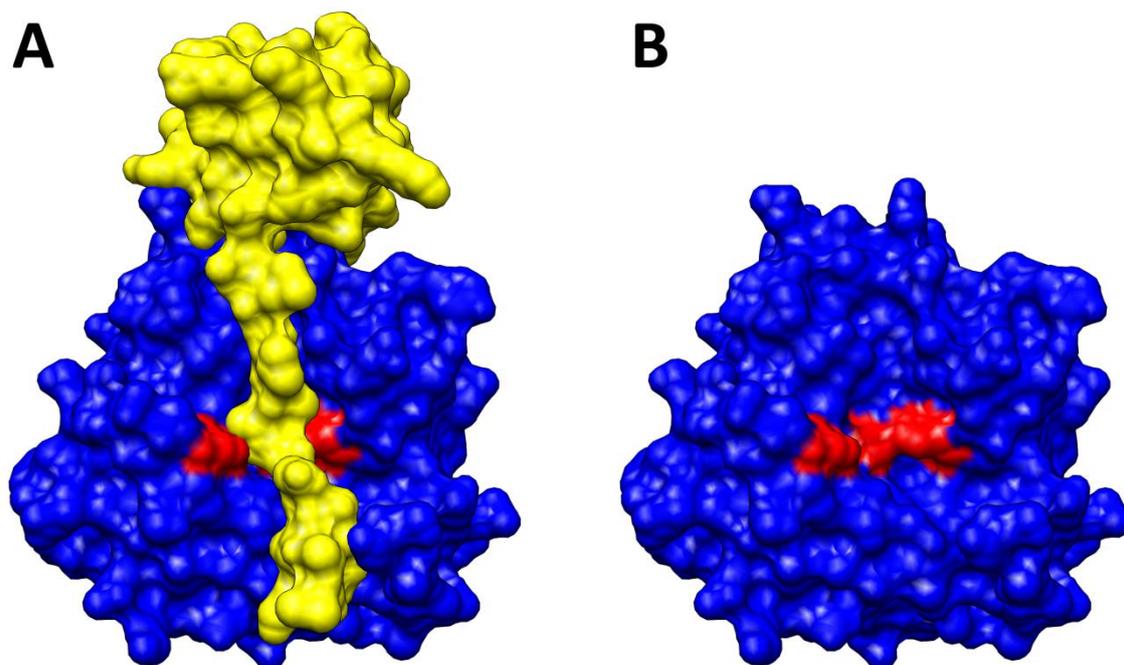


Figura 44: Modelización informática de la superficie atómica de la proEpr y su forma activa, destacándose en rojo los aminoácidos del centro activo y en amarillo la sección inhibitoria I9. A: propéptido. B: Estructura de la proteasa madura activa Epr.

A partir de los modelos informáticos se pudo observar cómo el dominio inhibitorio I9 se encuentra bloqueando el centro activo (Fig. 44). Se comprobaron los valores Qmean y Z-score de los modelos. El valor Qmean mide los errores de modelo comparándolo con los modelos no redundantes del mismo tamaño, estimando su fiabilidad entre 0-1 (0-100%). El Z-score medio de un modelo de Rayos X de alta resolución es de 0.

Tabla 13: Valores de la modelización informática y de los modelos de referencia.

Modelo	Qmean	Z-score	Resolución Å	Referencia
proEpr	0.693	-0.62	-	-
Epr madura	0.71	-0.36	-	-
2E1P	0.637	-1.16	2.3	Tanaka <i>et al.</i> , 2007
1R6V	0.622	-1.14	1.7	Kim <i>et al.</i> , 2004
1GCI	0.894	1.49	0.78	Kuhn <i>et al.</i> , 1998

Los datos obtenidos a partir de los modelos teóricos (Tabla 13, Fig. 45 y 46) demuestran que se encuentran a unos niveles parecidos a los de los modelos obtenidos por cristalografía.

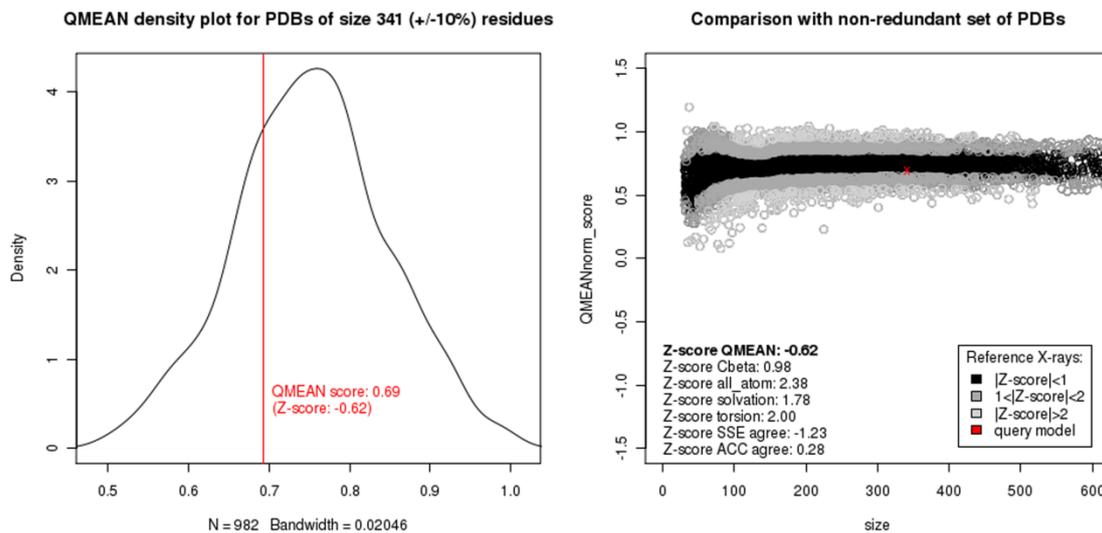


Figura: 45: Representación gráfica de los Qmean para un tamaño de 341 (+/- 10 %) aminoácidos. Comparación de la proEpr con modelos no redundantes del Protein data bank.

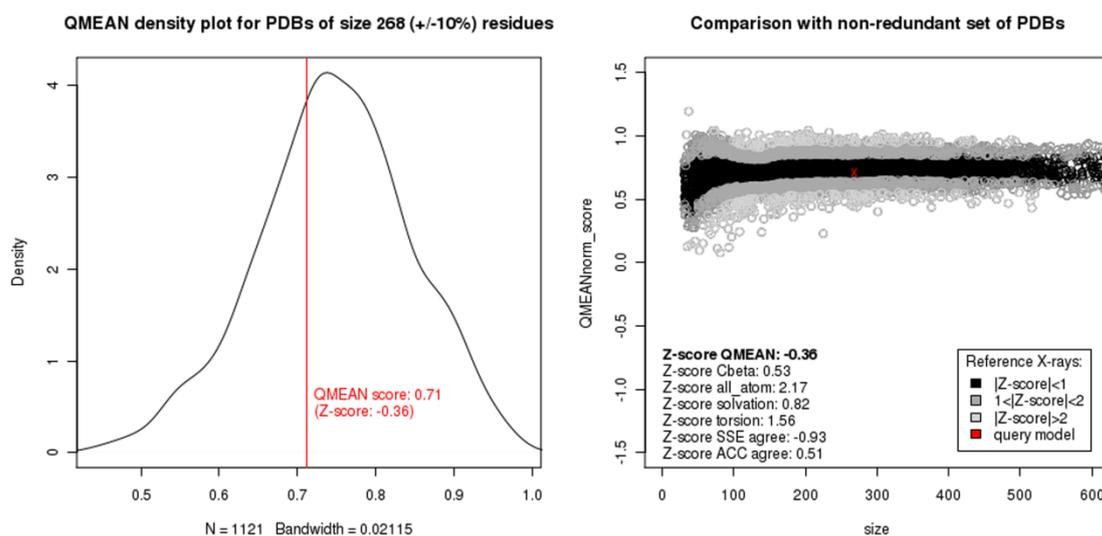


Figura: 46: Representación gráfica de Qmean para un tamaño de 265 (+/- 10 %) aminoácidos. Comparación de la Epr madura con modelos no redundantes del Protein data bank.

12. Experimentos de plegamiento y activación de la proteasa.

Con el fin de observar si el calcio que se encuentra en las estructuras modelo es necesario para el plegado y/o activación de la proteasa se procedió a realizar experimentos de plegado según lo descrito en el apartado 8.1.2 de materiales y métodos (Fig. 47). Así, se utilizaron diferentes concentraciones de calcio (Fig. 48). La técnica de dilución rápida (apartado 8.1.2 de materiales y métodos) se mostró más eficaz que la de diálisis para el plegamiento. Cuando se trató de replegar muestras con alto contenido proteico se observó la aparición de agregados parcialmente insolubles.

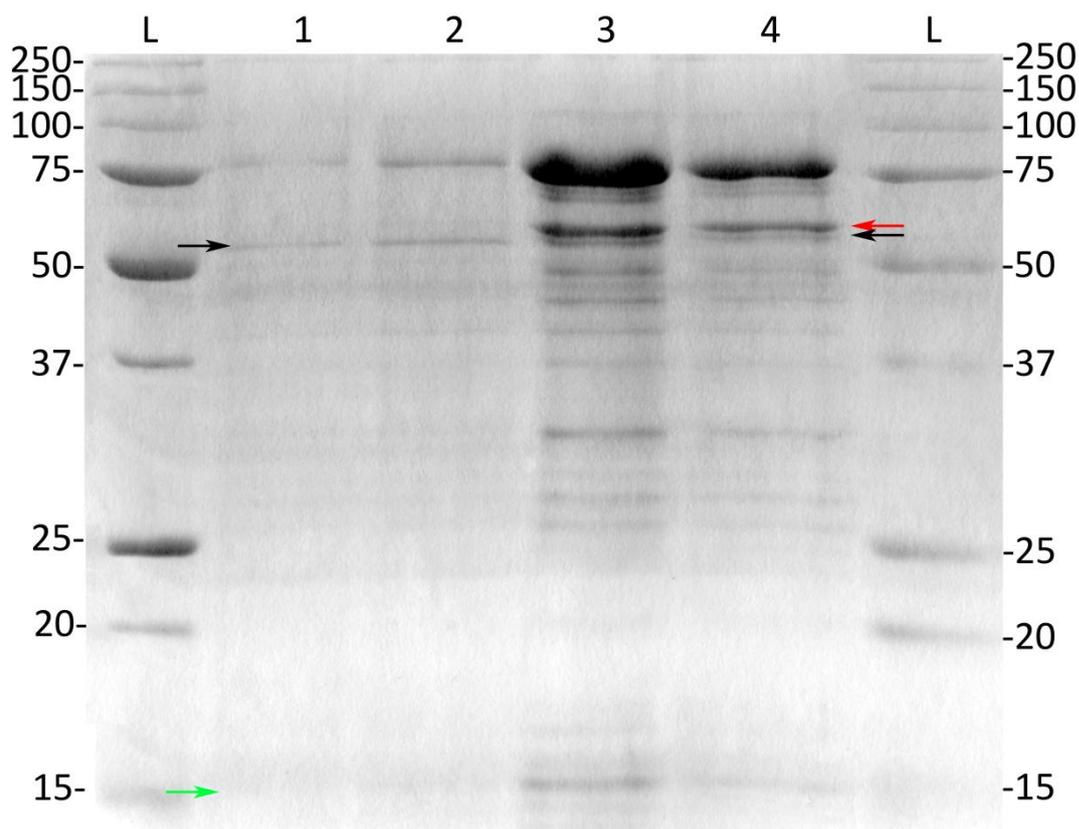


Figura 47: SDS-PAGE de cuerpos de inclusión renaturalizados y plegados en tampón 20 mM Ca^{2+} , 200 mM Tris-HCl, pH 7.5 expresados en células *E. coli* BL21(DE3) con pET30a preproEpr a diferentes concentraciones. Calles 1 y 2: Expresión a 24° C. Calles 3 y 4: 37° C. L: Marcador de peso molecular. **Flecha roja:** banda de proteólisis. **Flecha Negra:** tamaño de la Epr activada. **Flecha verde:** tamaño del propéptido desprendido.

Del mismo modo, se consiguieron mejores resultados en la solubilización y activación con el tampón 200 mM (Fig. 49).

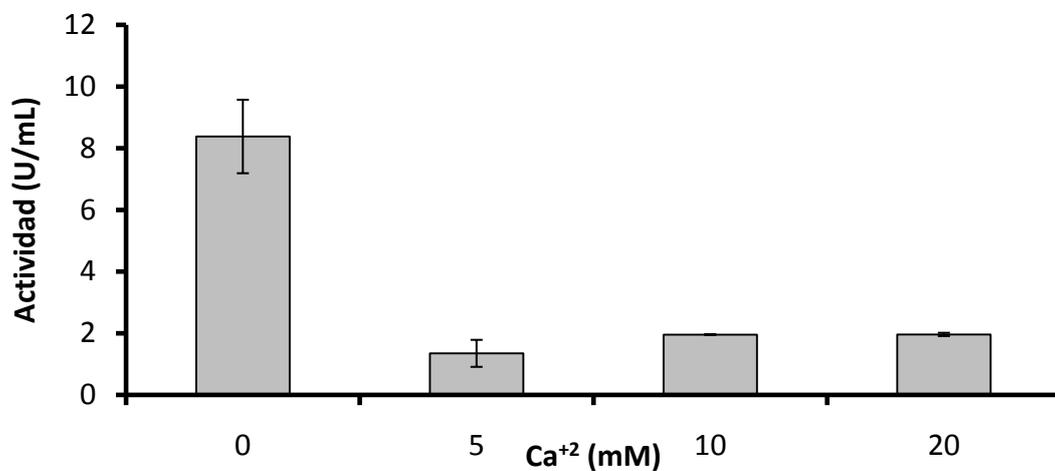


Figura 48: Efecto de la concentración de calcio durante el plegado de la preproEpr en 200 mM Tris-HCl, pH 7.5. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de los triplicados.

De los tampones ensayados para el plegamiento de los cuerpos de inclusión, el 200 mM Tris-HCl pH 7.5 se mostró el más adecuado, no siendo necesario el calcio para la solubilización ni el replegado (Fig. 48 y 49).

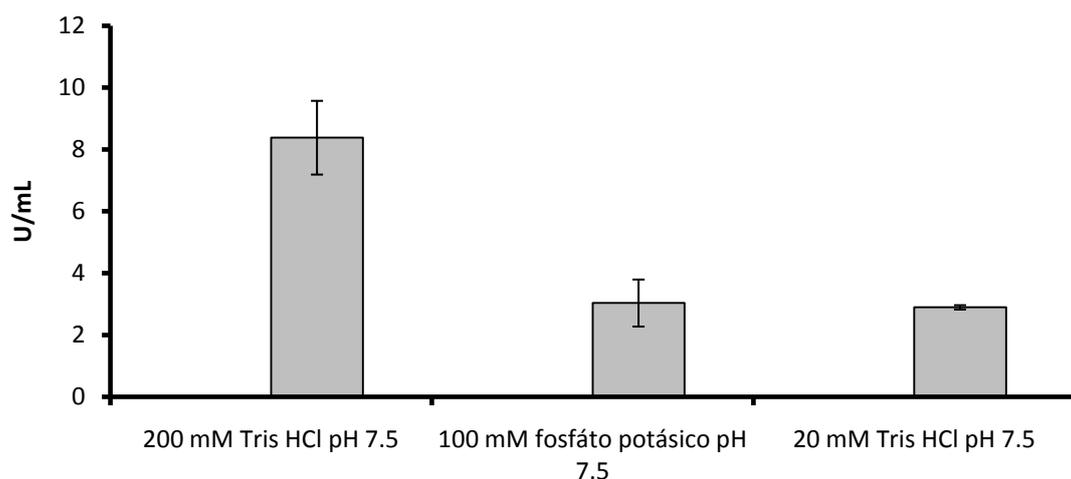


Figura 49: Efecto del tampón sobre la activación de la preproEpr. Muestra 4 h, 24°C. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de los triplicados.

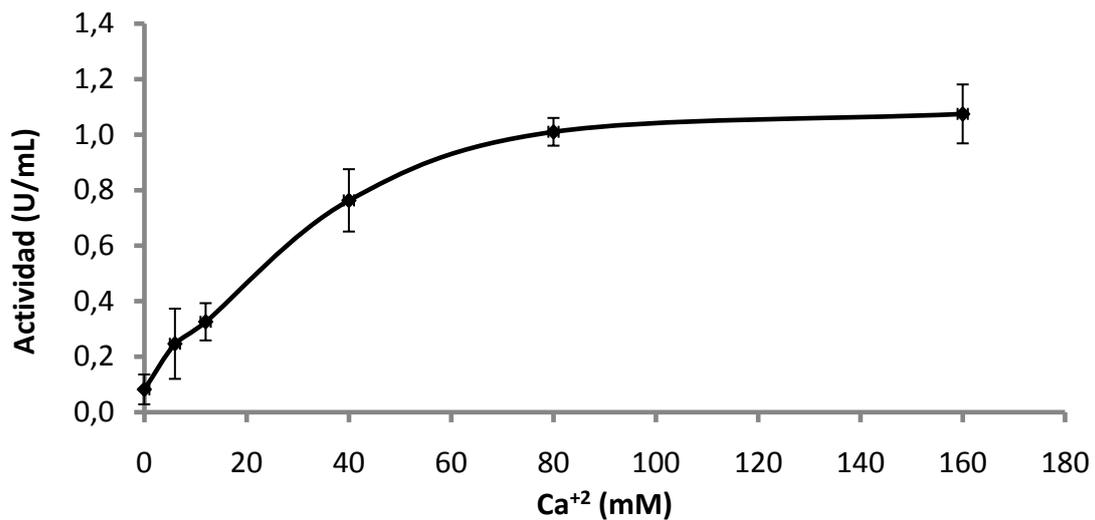


Figura 50: Efecto de la concentración de calcio sobre la activación de la preproEpr, 4 h, 24°C en tampón 200 mM Tris-HCl, pH 7.5. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de los triplicados.

Las muestras plegadas con calcio (Fig. 47) mostraron una baja capacidad de activación (Fig. 48). Sin embargo, cuando se realizó el experimento de activación con calcio se observó que este catión es necesario para la activación de la proteína (Fig. 50), tal como indicaba el modelado informático (Fig. 43).

Se observó que las muestras de proteasa perdieron su capacidad de activación con las consecutivas descongelaciones (Fig. 51).

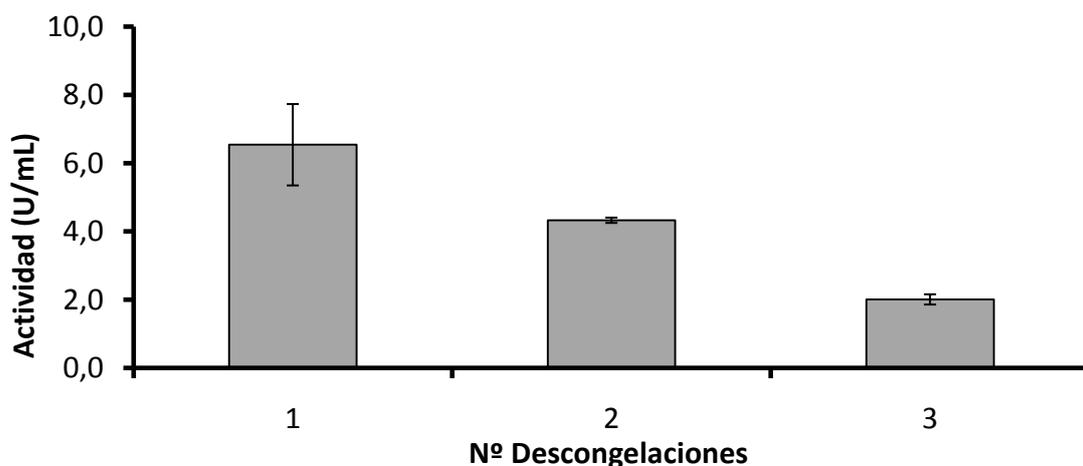


Figura 51: Efecto de la congelación y la activación de la preproEpr a 4 h, 24°C y en tampón 200 mM Tris-HCl, pH 7.5. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de los triplicados.

13. Expresión de la proteasa Epr en *E. coli* BL21(DE3) en fermentador a escala piloto

La cepa se cultivó en medio FLB con glucosa en un fermentador de 30 L. La densidad óptica máxima se alcanzó a las 26 h de crecimiento. (Fig. 52), consiguiéndose alcanzar un crecimiento en alta densidad añadiendo glucosa de forma continua durante las primeras 22 h de crecimiento. Tras la inducción con lactosa la densidad óptica sufrió un leve ascenso diáuxico al coexistir las dos fuentes de carbono.

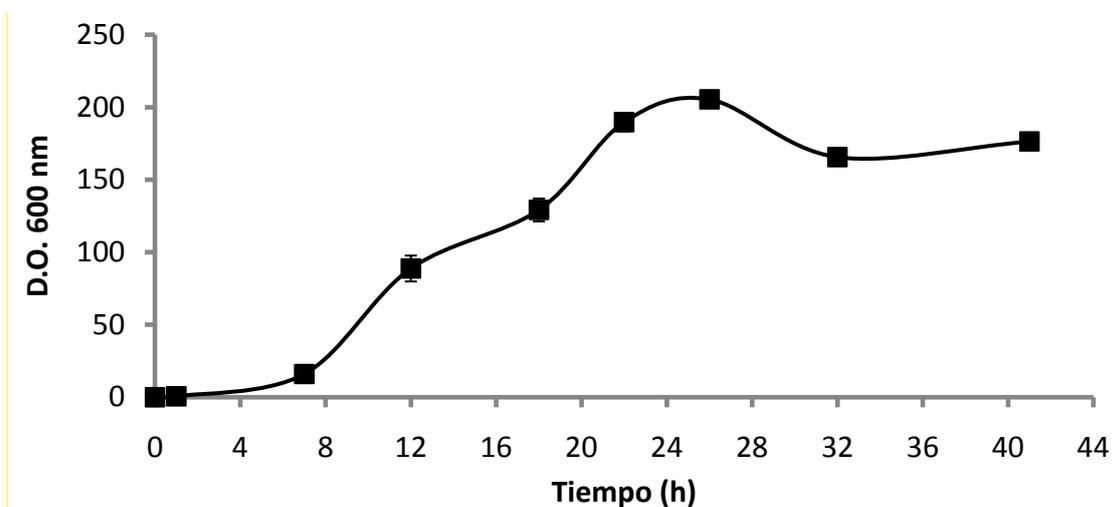


Figura 52: Curva de crecimiento en fermentador de la cepa *E. coli* BL21(DE3) pET30preproEpr. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de los triplicados.

Tras la centrifugación del medio de cultivo se obtuvieron 250 g de células, que fueron utilizadas para purificar los cuerpos de inclusión del modo previamente descrito, escalándolo a las nuevas condiciones.

La muestra obtenida se sometió a pruebas de coagulación (Fig. 53). Se observó la coagulación de la leche cuando se añadió calcio a la muestra, el proceso de coagulación fue, en todos los casos, lento y dependiente del pH, solo coagulando en el rango cercano a pH 7.

Las masas queseras obtenidas fueron sometidas a análisis nutricionales (Tabla 14).

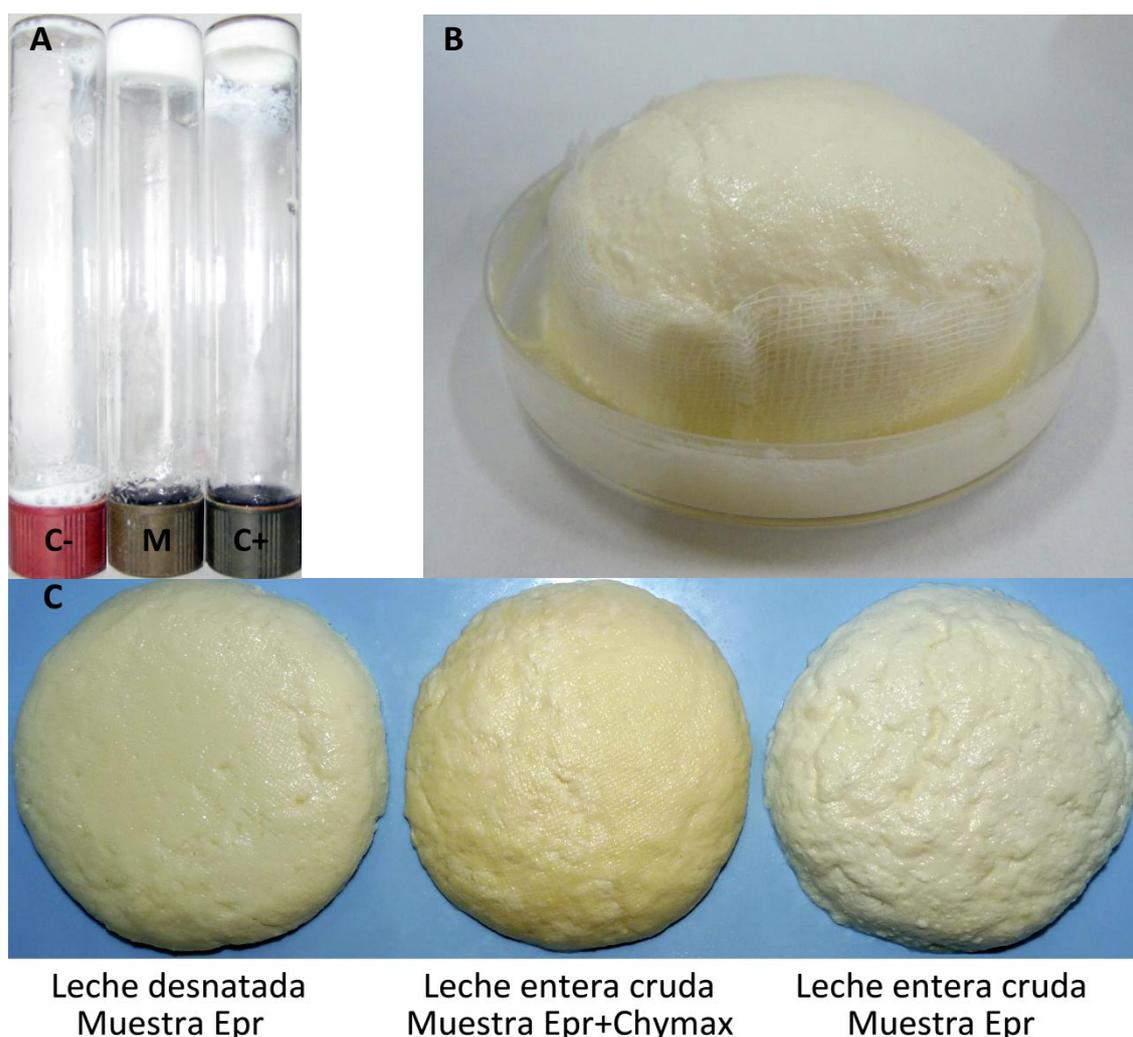


Figura 53: A. Ensayo de coagulación sobre leche desnatada en polvo reconstituida. **C-**: Control negativo tampón con 200 mM de CaCl_2 . **M**: Cuerpos de inclusión renaturalizados con 200 mM de CaCl_2 . **C+**: Control positivo con enzima comercial de *R. miehei* con 200 mM de CaCl_2 . **B**. Masa quesera de leche entera reconstituida. **C**: Masa quesera de leche desnatada reconstituida. Masa quesera de leche entera cruda con Chymax y Epr. Masa quesera de leche entera cruda.

Tabla 14: Análisis nutricionales de las masas queseras obtenidas por acción de la proteasa Epr extraída de cuerpos de inclusión.

Muestra	DM (%)	Proteína (%)	FC (%)	Cenizas (%)	FC/DM (%)	MNF (%)
Epr LER	36.4	15.0	11.7	2.2	31.4	72.1
C+ LER	32.1	11.0	13.4	1.2	41.6	78.0
Epr LDR	32.7	20.8	0.0	5.0	-	67.3
C+ LDR	29.2	17.6	0.0	3.1	-	70.8
Epr LEC	27.8	15.6	7.2	2.8	25.9	77.9
Epr y C+ LEC	46.0	20.5	23.6	0.9	51.4	71.0
C+ LEC	36.6	16.2	18.0	1.8	49.1	70.7

LER: Leche entera reconstituida. LDR: Leche desnatada reconstituida. LEC. Leche entera cruda. DM: Extracto seco. FC: Contenido graso. MNF: Humedad del queso desgrasado.

14. Temperatura y pH óptimos del enzima recombinante

Se sometió el enzima renaturalizado a partir de cuerpos de inclusión a diferentes pHs para observar el patrón de actividad que presentaba.

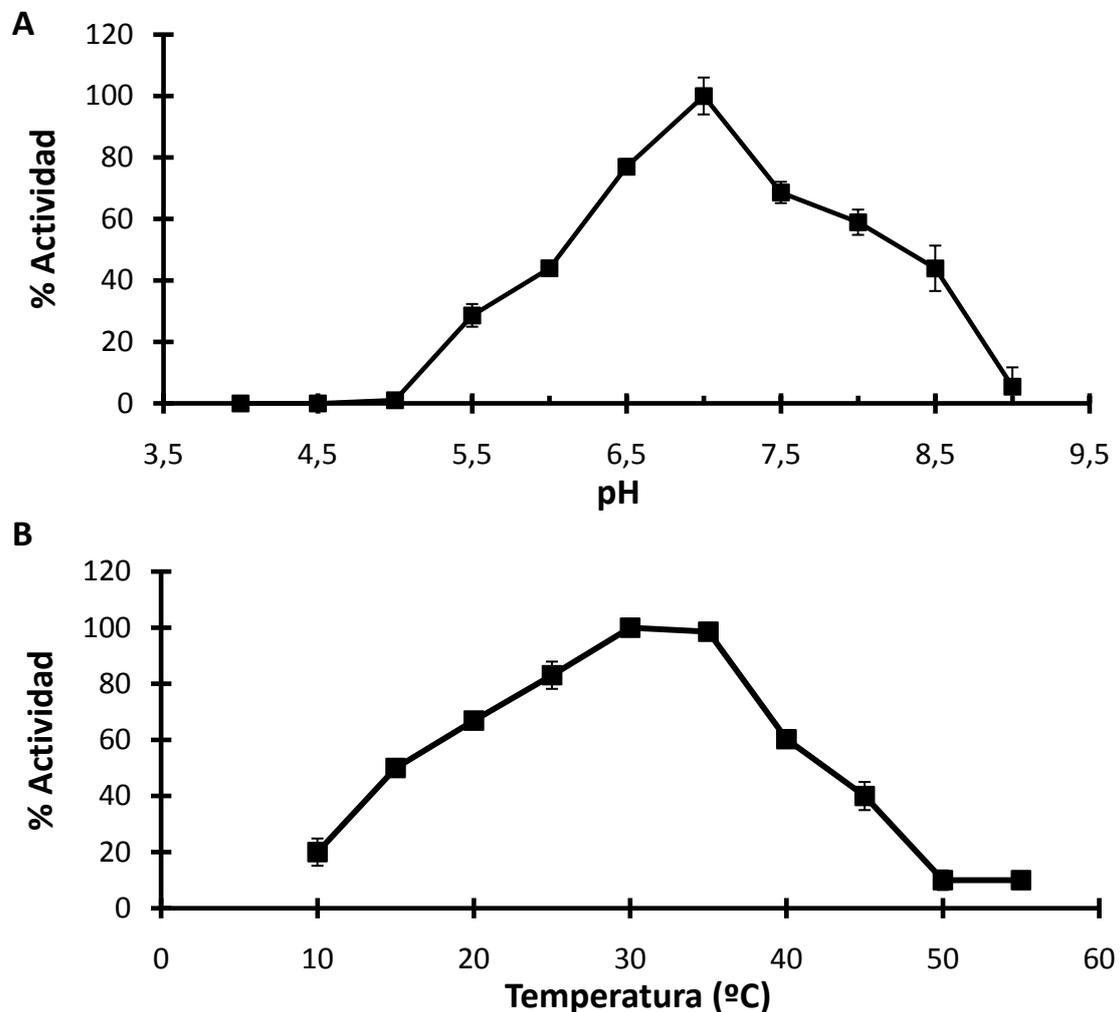


Figura 54: A. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la preproEpr renaturalizada a partir de cuerpos de inclusión. B: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la preproEpr renaturalizada a partir de cuerpos de inclusión. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar de las muestras.

El patrón de respuesta al pH fue muy similar al que presentó el enzima natural (Fig. 36), encontrándose una actividad máxima a pH 7. A pH 6.5 el enzima conservó el 80 % de su actividad. El patrón de respuesta a temperatura fue también similar al del enzima natural, pero el óptimo se vió desplazado hacia el rango 30 - 35 ° C.

15. Expresión en *P. pastoris*

Se obtuvieron transformantes portadores del gen de la proteasa *epr* clonada en el vector pHILS1 inducible por metanol. Se aislaron mutantes Mut⁺ y Mut⁻ (Fig. 55). Se realizaron experimentos de expresión.

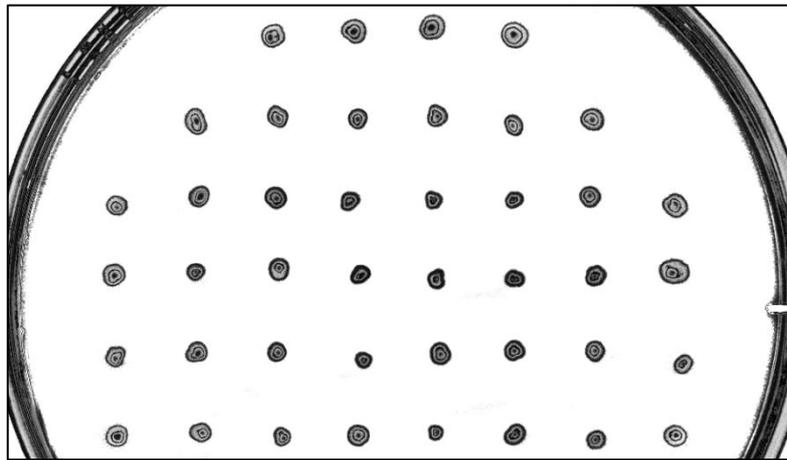


Figura 55: Imagen resultante de la comparación de crecimiento de las colonias de *P. pastoris* recombinantes en medio MM para la búsqueda de colonias Mut⁺ y Mut^S.

Se seleccionaron una colonia Mut⁺ y una Mut^S para comprobar la expresión de la proteasa (Fig. 55) y una cepa portadora de la construcción sin inserto, como control negativo.

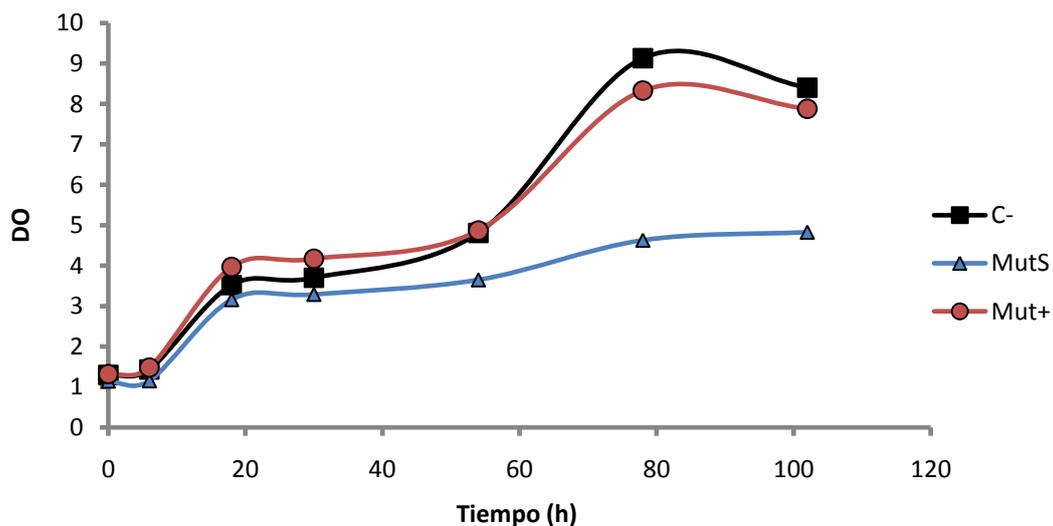


Figura 56: Curva de crecimiento de *P. pastoris* Mut S y Mut⁺ con el vector pHILS1 + preproEpr inducida con metanol. C-: Cepa portadora de vector sin inserto.

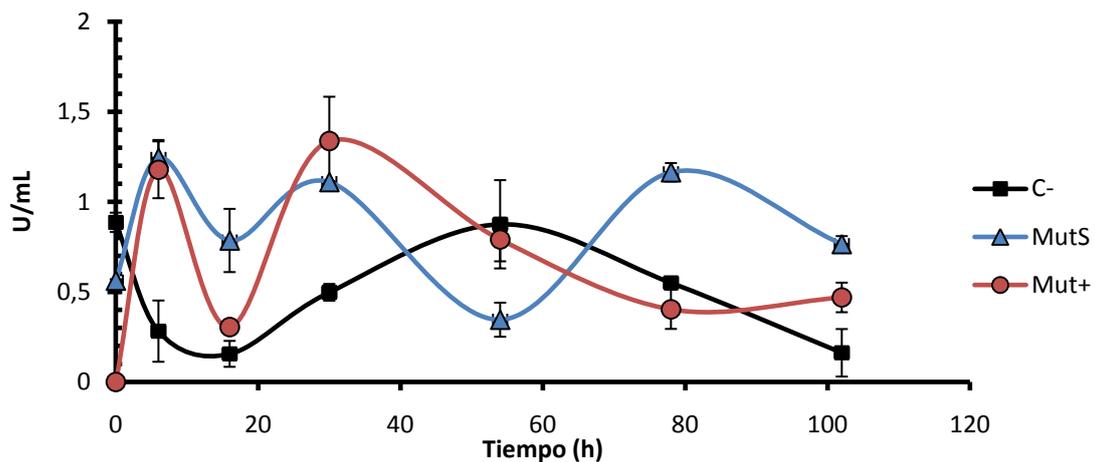


Figura 57: Curva de producción de enzima de los clones *P. pastoris* Mut S y Mut+ con el vector pHILS1 + preproEpr. C-: Cepa control portadora de vector sin inserto. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de las muestras.

El clon MutS mostró un crecimiento más lento que la cepa control y que el clon Mut+ (Fig. 56). Los niveles de producción de enzima todas las cepas fueron muy bajos (Fig. 57), siendo apenas inferiores a la actividad de la cepa que no portaba la construcción. Se pudo apreciar actividad de coagulación en los picos señalados en las Fig. 57 y 58, pero la estabilidad del enzima fue muy baja, ya que se observó como dicha actividad decae con el tiempo. Sólo se observó un segundo repunte de actividad en el clon MutS.

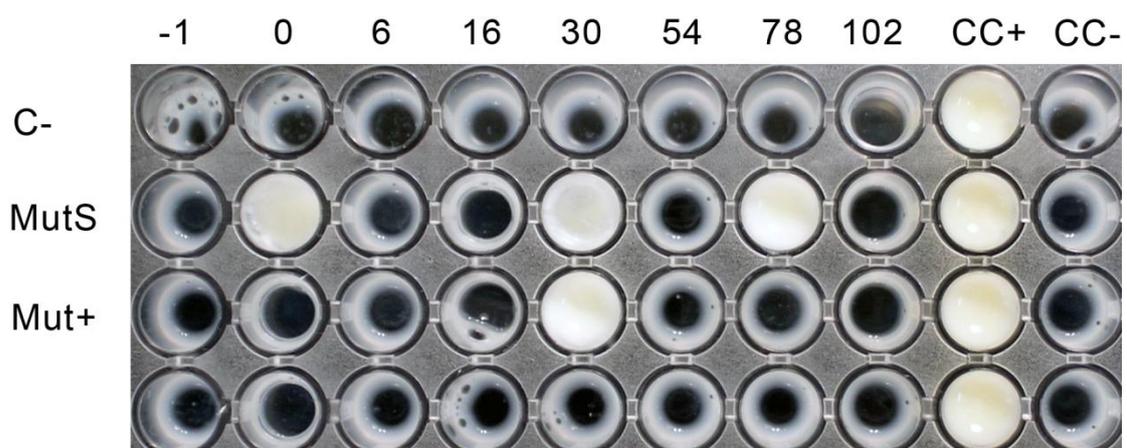


Figura 58: Prueba de coagulación de leche con los sobrenadantes de los clones de *P. pastoris* portadores de la construcción pHILS1-preproEpr. C-: Cepa control portadora de vector sin inserto. CC+: Control positivo de coagulación con enzima comercial. CC-: Control negativo de coagulación (leche+tampón).

La cepa de *Bacillus licheniformis* que se estudió en este trabajo, produce naturalmente una proteasa de interés industrial dado que tiene la capacidad de producir masas queseras. El bacilo fue aislado tras un test rutinario orientado hacia la búsqueda de proteasas coagulantes de la leche.

Las características de las células y las colonias de la cepa USC-13 aislada se corresponden con las descritas por Holt *et al.* (1994) para *Bacillus licheniformis*. En la descripción del *B. licheniformis* se hace referencia a que algunas cepas producen un pigmento rojo en presencia de sales de hierro. Se realizó este experimento para comprobar si la cepa de *B. licheniformis* USC-13 cumplía lo descrito en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Un test de pigmentación sobre placas de LB con FeSO_4 demostró que el *Bacillus* de estudio era capaz de sintetizar un pigmento rojo posiblemente pulquerrimina.

Cuando se realizaron los ensayos de crecimiento y producción se probó la capacidad de producción de enzima en un medio estándar (LB) y en un medio mínimo mineral. El sobrenadante de cultivo de *B. licheniformis* cepa USC-13 no mostró actividad coagulante sobre la leche cuando se cultivó en medio mínimo, sin fuente de proteína, y con glucosa como única fuente de carbono, lo que sugiere una represión catabólica por glucosa.

Los niveles de producción de enzima de este microorganismo son bastante bajos, dificultando mucho la caracterización del enzima y la determinación del punto de producción máxima. El método clásico de medición de actividad coagulante sobre leche presenta grandes inconvenientes para la medición de enzimas de baja capacidad coagulante o que se encuentran en bajas concentraciones. Por ello, se decidió desarrollar un método que

permitiera la medición de cantidades muy pequeñas de enzima, y que no se vea tan afectado por las condiciones del medio como el ensayo clásico. El ensayo clásico es fundamentalmente cualitativo, dado que el punto en el que la leche empieza a cuajar y el momento en que se forma el coágulo son muy difíciles de delimitar. En los ensayos de obtención del pH óptimo, los valores ácidos originan una coagulación ácida sin que intervenga el enzima. Se ha observado que el simple hecho de comprobar si el proceso está concluido, altera la velocidad de reacción. Por otro lado, en este ensayo es necesario utilizar una gran cantidad de enzima y la muestra debe ser concentrada. Los tiempos de espera elevados producen una coagulación espontánea debida a la temperatura incluso en los controles negativos, con lo que no es posible medir muestras con poca actividad. El método desarrollado, FTC-*k*-caseína, está basado en la medición de la fluorescencia liberada por acción de las proteasas sobre el sustrato específico de los enzimas coagulantes, la *k*-caseína. Este método está basado en el método de Twinning (1984).

En el método FTC-*k*-caseína, tal como describió Twining (1984), parte del fluorocromo puede ser liberado cuando el sustrato se descongela. En la metodología descrita se resta el valor residual de cada medición, con lo que se minimiza este hecho. Esto permitió observar variaciones entre diferentes lotes de sustrato, estandarizando las medidas. El incremento en el índice de marcaje del fluorocromo permite aumentar la sensibilidad del método, pero produce mayores errores en las mediciones, perdiéndose precisión.

Para determinar la eficacia del método desarrollado, se realizaron ensayos con diferentes enzimas, y se comparó con el método de partida. Es

importante remarcar que los experimentos realizados por Twining (1984) se llevaron a cabo con diluciones de enzima puro, mientras que en este trabajo se han utilizado enzimas industriales parcialmente purificados o enzimas procedentes de cultivos de bacterias o tejidos animales o tejidos vegetales, que distan de ser puros.

Todas la proteasas utilizadas produjeron la coagulación de la leche cuando se realizó el método clásico de coagulación. El método clásico para medir la coagulación es sólo cualitativo, ya que permite observar la aparición del coágulo de leche, determinar cuál de los enzimas utilizados fue el más activo o el que produce una coagulación más rápida. Por ello, es difícil comparar los datos obtenidos mediante el método clásico con los datos obtenidos mediante el método FTC-*k*-caseína. Sin embargo, hay una relación entre la actividad coagulante medida por ambos métodos. Todos los enzimas coagulantes tienen actividad *k*-caseinolítica, pero no todos los enzimas que tienen actividad *k*-caseinolítica producen la coagulación de la leche.

Tal como se esperaba, la degradación de sustrato marcado presenta una relación lineal con la cantidad de enzima, si bien la linealidad se pierde en concentraciones muy elevadas por agotamiento del sustrato. La relación lineal observada demuestra que el método actúa de un modo preciso.

El método permitió la determinación de las unidades enzimáticas y la actividad específica de estos enzimas. De los enzimas ensayados, la muestra comercial de *R. miehei* tiene un valor mayor de actividad específica que las muestras procedentes de *B. licheniformis* o *B. arnee*

bubalis, las cuales se comportan como extractos crudos. Debido a su elevada actividad específica, el enzima procedente de *R. miehei* se utilizó para llevar a cabo otros experimentos de actividad para comprobar la eficacia del método.

Los resultados demuestran que la linealidad descrita para el método de Twining (1984) es aplicable a muestras muy diluidas, tal como se ha mencionado anteriormente. Además, analizando los resultados obtenidos se ha llegado a la conclusión que es posible detectar actividad en muestras de enzima procedente de *R. miehei* cuando la concentración de proteína es de sólo 2.6 ng en la reacción, cuando esta se mantiene 1 h. El método FTC-*k*-caseína muestra, por tanto, una gran sensibilidad y estabilidad cuando las reacciones se prolongan en el tiempo.

Las representaciones de los parámetros cinéticos además muestran que las reacciones siguen una cinética de Michaelis-Menten, la misma cinética que sigue el primer paso de la coagulación de la leche; la hidrólisis de la *k*-caseína (Carlson *et al.*, 1987c). No se ha apreciado un efecto de inhibición por sustrato incluso a niveles altos de concentración de sustrato en las condiciones descritas.

El ensayo clásico de coagulación de la leche no permite la determinación de parámetros cinéticos dado que, cuando las concentraciones de sustrato son muy bajas, no se produce la agregación de las micelas para la coagulación, tal como se produce en los experimentos de Michaelis-Menten.

La muestra con mayor actividad total y mayor actividad específica fue la procedente de *R. miehei*, dato coherente con las pruebas de coagulación

ya que demostró ser el enzima más rápido en coagular la leche de los analizados, y con el mayor grado de pureza descrito por el fabricante. La muestra de *B. arnee bubalis* se comportó como un sustrato crudo, con una alta actividad pero con una actividad específica baja.

Del mismo modo, los valores K_m de las muestras de quimosina recombinante Chymax® y la quimosina natural son muy parecidas, dato que era de esperar ya que la quimosina de vaca y la de búfalo son muy parecidas (97 % de homología en su secuencia).

Por otro lado, el valor de K_m de la proteasa de *R. miehei* fue inferior al hallado para la quimosina de *B. arnee bubalis*, dato que se corresponde con lo descrito por Rawlings *et al.*, (2006). El índice de marcaje del sustrato puede interferir con las mediciones de actividad cinética. Si el marcaje es excesivo se aprecia un desplazamiento de las curvas, esto puede achacarse a que parte del fluorocromo se ancla cerca del punto de corte de las proteasas. Este efecto fue más evidente en las proteasas más específicas.

Se realizaron ensayos de inhibición para observar si el método permite este tipo de determinaciones. Los datos de inhibición demostraron que ambos tipos de proteasas –aspárticas y serín proteasas- pueden ser detectadas por el método FTC-*k*-caseína, dado que ambas proteasas producen la degradación de la *k*-caseína, primer paso de la coagulación de la leche, aún siendo, posiblemente, su acción sobre la *k*-caseína, diferente. Ante concentraciones elevadas de etanol se aprecia una disminución de las mediciones, esto puede deberse a que el patrón de emisión de la fluoresceína se altera ante concentraciones elevadas de etanol. Los resultados nos permitieron concluir que es preferible utilizar

concentraciones bajas de enzima y por ende, concentraciones bajas de inhibidor y etanol.

Los datos estadísticos de los test *t* de Student indican que los valores de actividad de la proteasa de *R. miehei* obtenidos mediante el ensayo FTC-*k*-caseína son significativamente mayores (2.648 veces) que los obtenidos mediante el método FTC-caseína. Sin embargo, para el caso de la tripsina no se pueden apreciar diferencias significativas entre los valores obtenidos por los dos métodos.

Finalmente, se concluyó que el método descrito en este trabajo fue capaz de detectar actividad *k*-caseinolítica de un modo más específico que el método descrito por Twining (1984). Teniendo en cuenta todos los datos, es posible constatar que el método FTC-*k*-caseína es capaz de detectar específicamente los enzimas *k*-caseinolíticos de un modo más eficaz (2.648 veces mejor) que el método anteriormente descrito por Twining, (1984). Sin embargo, los valores de actividad de la proteasa con una actividad menos específica, la tripsina, fueron similares empleando ambos métodos. La quimosina de *R. miehei* sólo actúa sobre la *k*-caseína, así que la diferencia se puede achacar a la diferencia de concentración de *k*-caseína que hay en los sustratos.

Cuando se analizó el sustrato de FTC-caseína por SDS-PAGE se encontró que la banda de *k*-caseína es la que está en menor concentración. Estos datos explican la actividad detectada en la proteasa de *R. miehei*, que no siendo capaz de cortar otras caseínas producía actividad cuando se midió su reacción frente a dicho sustrato. De igual modo, se puede apreciar que

a misma concentración final de proteína, el sustrato FTC-*k*-caseína se encuentra mucho más enriquecido en la fracción de *k*-caseína que en el sustrato de FTC-caseína, aunque se puede apreciar la presencia de otras bandas proteicas. Estos resultados se corresponden a lo descrito por el fabricante; la *k*-caseína comercial muestra un 80 % de pureza. Dado que se aprecia una banda por debajo de la *k*-caseína, se podría aumentar la especificidad *k*-caseinolítica de los enzimas empleando un sustrato que fuese 100 % *k*-caseína.

La diferencia de concentración de la *k*-caseína no parece proporcional a la diferencia de actividad mostrada entre los dos métodos (2.648 veces mayor). Este dato puede explicarse dado que en las condiciones de tiempo de incubación y de cantidad de sustrato a las que se sometió la muestra de *R. miehei*, no se produce la total consumición del mismo. La diferencia mostrada en la medición de actividad entre ambos sustratos podría, por tanto, ser mayor en el caso de aumentar el tiempo incubación o la cantidad de enzima.

El método nos permitió la medición de la actividad de la proteasa de *B. licheniformis* USC-13, con lo que se realizaron curvas de crecimiento y producción.

En los estudios de producción sobre medio LB, la cepa mostró la máxima actividad tras 6 días de crecimiento. El valor de pH se incrementó durante el tiempo que duró la fermentación, debido a la liberación de amonio causada por la proteólisis (Kumar & Takagi, 1999).

Voigt *et al.* (2006) describieron que muchas de las proteasas de *B. licheniformis* se secretan a niveles bajos durante la fase exponencial, induciéndose su secreción durante la fase estacionaria; los niveles de

secreción de proteasas son a su vez mayores en medios complejos si se compara con células cultivadas en medio mínimo. La curva de crecimiento en el fermentador fue parecida a la que se obtuvo en los experimentos de crecimiento en matraz, a excepción de que se adelanta la fase estacionaria tres veces, adelantándose por consiguiente la producción de enzima.

En los ensayos de inhibición para caracterizar la proteasa se observa que esta pierde su actividad por acción de PMSF, lo que sugiere que pertenece al grupo de serín proteasas. Estos datos concuerdan con la bibliografía estudiada, dado que no se encuentra descrita ninguna proteasa aspártica típica en el genoma de *B. licheniformis* (Rey *et al.*, 2004; Veith *et al.*, 2004).

Debido a que la agregación micelar durante el proceso de coagulación es cooperativa (Silva y Macata, 2005), los ensayos de coagulación clásicos no funcionan bien para la determinación de los parámetros cinéticos (Ageitos *et al.*, 2006), cuando más baja es la concentración de sustrato más difícil es que se produzca la aparición del coágulo (Carlson *et al.*, 1987b).

Los datos obtenidos de las pruebas cinéticas demuestran que la proteasa producida por *B. licheniformis* USC-13 sigue una cinética clásica de un enzima coagulante. No se apreció inhibición por exceso de sustrato en ninguno de los rangos ensayados. El valor de K_m obtenido demuestra que la proteasa tiene alta afinidad por el FTC-*k*-caseína, al igual que ocurre con otras proteasas microbianas coagulantes, tal como la de *Rhizomucor miehei* (Ageitos *et al.*, 2006). El valor de $V_{m\acute{a}x}$ demuestra que si bien tiene una actividad *k*-caseinolítica elevada, ésta no se observa del mismo modo en los ensayos de coagulación, ocurriendo éstos más lentamente. Ello

puede deberse a que en este tipo de proteasas no se produce una adificación simultánea, como sí ocurre con las proteasas aspárticas (Rao *et al.*, 1998). Se puede concluir que la proteasas de *B. licheniformis* USC-13 debería ser utilizada como coadyuvante, con el objetivo de conseguir masas queseras diferentes.

Los datos obtenidos del análisis de las masas queseras indican que la proteasa de *B. licheniformis* facilita la formación del corte y la liberación del suero. Se utilizaron muestras de leches de diferente naturaleza para observar si las diferencias en el pH, contenido proteico y graso afectaban al rendimiento final (Ahmad *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que los valores de pH de la leche de vaca y la leche desnatada fueron inferiores a los obtenidos en el control, se puede concluir que se ha producido una coagulación mixta debida al crecimiento microbiano. Estos resultados se confirman cuando se observa que los valores de materia seca son muy superiores a los que se producen simplemente por bajada de pH. Los índices de dureza fueron superiores a los de los controles, a excepción de la masa quesera de leche de búfala que, al tener un contenido en grasa superior al control, es menos firme. Las pruebas de olor y sabor llevadas a cabo en nuestro laboratorio demostraron que, aún siendo una serín proteasa, no origina sabores u olores anómalos o desagradables. La proteasa de *B. licheniformis* produce unas masas queseras diferentes a las originadas con una quimosina convencional. Las muestras de *B. licheniformis* no producen la contracción de las masas queseras, al contrario de la quimosina bovina. El tipo de coagulación que produce nuestra proteasa es similar a la que produce la proteasa de *R. miehei*. El corte que originan las quimosinas bovinas cambia el momento dipolar de la *k*-caseína, lo que produce que las micelas tengan mayor capacidad de

agregación, que coagulen mejor y que las masas queseras se retraigan (Kappeler *et al.*, 2006).

Los datos obtenidos del isoelectroenfoque, SDS-PAGE y cromatografía apuntan a que *B. licheniformis* USC-13 produce una proteasa de 62 kDa que sufre un procesamiento, originándose productos de diferentes pesos moleculares, tal como describe Sloma *et al.*, (1998) para la serín proteasa Epr producida por *Bacillus subtilis*.

El *B. licheniformis* se parece al *B. subtilis*, tienen una homología en su genoma mayor al 84% (Rey *et al.*, 2005) y del mismo modo se parecen las proteasas de ambas especies. Se conocen dos tipos de proteasas extracelulares en *B. subtilis* (Choi *et al.*, 2005): un grupo de 4 serín proteasas (Bpf, Epr, Vpr y Wpr) y otro grupo de metaloproteasas neutras (NpdrB y PepT). Estudios sobre la secuencia de *B. licheniformis* han identificado como serín proteasas a las siguientes: Epr, Vpr, HtrA, ISpA, YutA, ClpPs y YyX.

Los datos obtenidos sugieren que la proteasa coagulante de la leche se puede corresponder con las proteasas Vpr o Epr anteriormente descritas. La proteasa Vpr de *B. subtilis* es una serín proteasa que durante su procesamiento varía de un tamaño de 94 a 65 kDa, encontrándose formas de 28 kDa (Sloma *et al.*, 1991). La banda de 62 kDa obtenida en el presente estudio podría ser la forma madura de la Vpr, pero los valores de punto isoeléctrico descritos no se corresponden con los obtenidos (Choi *et al.*, 2005). El PMF obtenido de la banda de 62 kDa aquí descrita no se corresponde con los PMF descritos por Kho *et al.*, (2005) u otro PMF de las bases de datos consultadas. Lo mismo ocurre con la banda de 34 kDa aquí descrita.

En *B. licheniformis* la proteasa Epr tiene una masa teórica calculada de 62 kDa, la misma proteína en *B. subtilis* tiene un peso molecular de 69.7 kDa y baja hasta 40.3 kDa tras su procesamiento (Sloma *et al.*, 1988, Choi *et al.*, 2005). Los análisis de la secuencia de *B. licheniformis* ATCC 14580 sugieren que la banda de 62 kDa descrita aquí puede ser una forma no procesada de la proteasa Epr, con una masa calculada de 62.8 kDa y un punto isoeléctrico de 10.2. El punto isoeléctrico de la proteasa puede variar según el número de fosforilaciones que tiene la proteína, llegando hasta 9.02, cuando tiene 13 fosforilaciones. Voigt *et al.* (2006) no encontraron la banda de 62 kDa cuando se cultivó el microorganismo en medio LB. Esto puede deberse al procesado de la banda de 62 kDa, lo que se corresponde con los datos obtenidos en *B. licheniformis* USC-13. Estudios de expresión en *E. coli* produjeron bandas de 69, 38 y 34 kDa (Sloma *et al.*, 1988) aunque no se encontró actividad enzimática. Es un hecho reconocido que las preproteasas tienen actividad catalítica en *B. subtilis* (Kho *et al.*, 2005), con lo que se puede concluir que la banda de 62 kDa se puede corresponder a una forma proEpr liberada durante el proceso de esporulación, y la banda de 34 kDa a la forma madura de la proteasa Epr (Ageitos *et al.*, 2007). Se ha descrito que *B. subtilis* tiene un espacio similar al periplasma, parecido al que se encuentra en bacterias Gram negativo (Merchante *et al.*, 1995) con lo que se puede asumir que *B. licheniformis* tendrá las mismas características. Muchas de las proteasas de *B. licheniformis* han sido descritas como enzimas extracelulares. Dado que la proteasa Epr se expresa con una señal Sec (Voigt *et al.*, 2006), la localización celular se puede corresponder con los datos obtenidos en este trabajo.

Con el fin de comprobar que la proteasa Epr de *B. licheniformis* es la que produce el efecto coagulante se procedió a la clonación y expresión en *E. coli* y *P. pastoris*.

Se obtuvieron clones de *E. coli* que produjeron una fuerte producción heteróloga de la proteasa, pero, en ninguno de los casos estudiados se consiguió un incremento de la actividad proteolítica ni coagulante de leche.

Se consiguió la sobre expresión de la proteasa, sin que se apreciase diferencia por el uso de antibiótico en el medio de expresión. Sin embargo, se observó que a 37° C la banda correspondiente a la proteasa se desdobra, posiblemente por degradación. La banda resultante no se corresponde con los tamaños previstos, ni con lo descrito en la bibliografía, sin embargo, podría corresponder con el fragmento de la Epr activada no madura (aprox. 55 kDa). La aparición de este bandeo se puede observar tras la primera hora de inducción sin embargo no ocurre a 24 ° C, ni tras 3 h de inducción. Esta banda no aparece en la fracción soluble, ni aparece un incremento de la actividad *k*-caseinolítica así que, aunque el enzima pudiese estar activado, no se encuentra disponible, parece que la bacteria lo envía a cuerpos de inclusión.

El sistema de secreción Sec, utilizado por la proteasa Epr, consigue que las proteínas se envíen al espacio matricial (similar al periplasma) de los bacilos. Para una célula es fundamental mantener el control de la actividad de las proteasas, con lo que debe evitar que estas se activen de modo inespecífico en el interior celular. La proteasa Epr tiene un dominio inhibitorio que impide que esta se encuentre activa, por lo que nos

referiremos a ella como proEpr, siendo la preproEpr la secuencia que porta el péptido señal.

A pesar de conseguir la sobreexpresión del enzima no se pudo obtener una actividad proteolítica superior a la presente en el control. Esto indica que la proteína no es activa, bien porque se encuentra en cuerpos de inclusión o porque las colas de histidina presentes en la construcción dificultan el plegado de la misma. Tampoco se encontró actividad en la construcción con la proteasa sin péptido señal.

La expresión a baja temperatura permitió incrementar la cantidad de proteasa en la fase soluble celular, sin embargo, no se encontró actividad.

La recuperación de la proteína por resina de afinidad en la fase soluble consiguió la obtención de proteasa, pero esta no se encontró activa. Si bien el imidazol tiene la capacidad de inhibir proteasas, tales como la tripsina. Como este enzima sufre varios procesos proteolíticos que pueden hacerles perder el principio o el final. La incorporación de colas de histidina puede hacerle perder parte de su efectividad teórica.

La mayor parte de los protocolos de recuperación de proteínas heterólogas en *E. coli* suelen incluir la utilización de PMSF. En el caso de la proteasa Epr, al ser una serín proteasa, no es posible la utilización de este inhibidor, con lo que las proteasas propias de *E. coli* representarán un problema habitual, produciendo la degradación de las bandas. Estas proteasas se encuentran mayoritariamente en la fase soluble, con lo que la proteína en los cuerpos de inclusión se encontraría a salvo de ese efecto no deseado.

Los intentos de recuperación de proteína de los cuerpos de inclusión fueron satisfactorios, dado que la proteína tiende a formar glomérulos insolubles cuando se utilizan concentraciones elevadas de proteína, este efecto se hace más palpable durante la diálisis. La dilución rápida se mostró más efectiva para conseguir proteasa soluble.

Los experimentos de expresión en levadura consiguieron una actividad enzimática baja. Se observaron picos de actividad tras la inducción con metanol, pero la actividad proteolítica desciende sin que se consiga la acumulación del enzima. La actividad coagulante sólo se observa en los momentos en los que hay picos de actividad proteolítica, no observándose coagulación en la cepa control, a pesar de llegar a niveles de actividad proteolítica similares. El comportamiento de las cepas MutS y Mut+ fue parecido. Sin embargo la cepa MutS tarda más en metabolizar el metanol y se produce una actividad superior, si bien el crecimiento es inferior.

La modelización de la proEpr nos permitió la obtención de muchos datos de interés. La sección final de la proteasa no pudo ser modelada, al no encontrarse ninguna proteína con homología a esa secuencia. Esta última región no es necesaria para la función proteolítica, con lo que los datos del modelo pueden ser igualmente esclarecedores. Esta región puede modelarse de forma separada, encontrando homología con la tropomiosina, pero esto no concierne a lo que se discute en este momento ya que no es necesaria para la actividad proteolítica. Los valores de Q_{mean} demuestran que el modelo teórico está en un rango de confianza de errores similar al de modelos experimentales, siendo en muchos casos mejor que estos. La estructura presenta dos átomos de calcio. El calcio que estabiliza la estructura del modelo de la proteasa

produce que la región I9 se adentre en el centro activo de la proteasa durante la minimización del modelo. Se podría considerar que el modelo representa a la proEpr en el momento de la activación, puesto que la región I9 se encuentra dentro del centro activo, con lo que tendería a cortarse. El calcio representaría un nuevo nivel de control para la activación de este enzima, no encontrándose cantidades tan elevadas de calcio más que en la región “periplásmica”, estando controlada por los niveles de ácido dipiólico, un quelante natural del calcio.

Es difícil determinar *a priori* si el calcio presente en el modelo es necesario para el correcto plegamiento de la proteasa o sólo para su activación. Por ello, se realizaron experimentos de plegamiento con diferentes concentraciones de calcio. Los datos demostraron que los mejores resultados se obtienen con tampones de elevada fuerza iónica y sin la presencia de calcio, al menos en lo que se refiere a su posterior activación. El proceso de activación es claramente dependiente de calcio. Por otro lado, parece que si la proteasa se activa sin la presencia de algún sustrato, parece tener la tendencia a degradarse o a impedir su posterior activación. Esto podría explicar los bajos resultados que se obtienen en el replegado del enzima en la presencia de calcio, dado que no se apreció que la concentración de calcio disminuyese la solubilidad de la proteína.

La capacidad de activación de la muestra disminuye cuando se producen varios descongelamientos sucesivos, con lo que el plegado de la proteasa parece ser bastante inestable, pudiendo perder la capacidad de activación con facilidad. La proteasa se activó correctamente a pesar de presentar colas de histidina al comienzo. La construcción que arrojó los mejores resultados fue aquella que portaba la señal Sec y un trozo del vector pCR-

Blunt II Topo, posiblemente con esto se evite la interferencia de las colas durante el plegado. Se realizó la expresión de la proteasa entera para comprobar si las hipótesis que arrojaron los resultados de purificación eran correctas. La banda de alto peso molecular obtenida durante la purificación se corresponde con la proEpr, el calcio presente en la leche produce la activación de la misma y, por ende, el proceso de coagulación. La proteasa presenta una coagulación lenta, puesto que el calcio presente en la leche tiende a liberarse al bajar el pH y a diferencia de las proteasas aspárticas, las serín proteasas tienden hacia la alcalinidad. Este hecho explica los resultados obtenidos en la pruebas con las masas queseras, ya que es necesaria una coagulación mixta, ácido-enzimática, a menos que se encuentre presente calcio soluble. En los extractos enzimáticos purificados suelen encontrarse las formas inactiva y activa de la proteasa. Según lo descrito, la proteasa Epr se autoprocasa aunque no haya calcio disponible. Una activación previa de la proteasa durante un tiempo prolongado presenta un problema, dado que tiende a perder su actividad si no se encuentra otro sustrato sobre el que actuar. Ese parece ser uno de los principales problemas de la expresión en levaduras, la activación de la proteasa de un modo prematuro puede que cause su degradación. Al expresarse la proteasa en *P. pastoris* la preproEpr debe perder parte del dominio inhibitorio, este mismo efecto se ha encontrado en la expresión de la quimosina de búfalo (Vallejo *et al.*, 2008). Lo que *a priori* se podría considerar un beneficio para otros enzimas no lo es para la Epr. Se expresó la forma preproEpr en vez de la proEpr para evitar este efecto, pero la activación se produce incluso con el péptido señal y la sección de vector pCR-BluntII TOPO que porta la construcción. Para la expresión en *P. pastoris* se eligió el vector pHIL-S1 por ser inducible y porque permite el

crecimiento sin glucosa. *P. pastoris* produce una bajada del pH muy elevada cuando se cultiva en esas condiciones, pudiendo llegar a pH 3. Los cultivos en presencia metanol como fuente de carbono no producen este efecto, que reduciría la viabilidad de un enzima alcalino como la Epr. Los mejores resultados se obtuvieron a partir de la renaturalización a partir de los cuerpos de inclusión y la activación de la proteasa previa a su uso, manteniéndose así protegida durante todo el proceso. El escalado en fermentador permitió la obtención de gran cantidad de enzima, lo que permitió elaborar masas queseras obtenidas a partir del enzima recombinante. La inducción con lactosa, a pesar de no ser tan fuerte como con IPTG, permite la obtención del enzima con un menor coste. Los valores de temperatura y pH óptimo son similares a los que presenta el enzima natural. El cambio en temperatura y pH óptimo puede deberse a diferencias en los patrones de expresión o a que la estructura replegada no es tan estable como la que produce el bacilo de forma natural.

El enzima Epr produce la coagulación de leche en polvo reconstituida, desnatada y entera, y de leche cruda. Las masas queseras obtenidas con el enzima recombinante tienen unos patrones de proteína y grasa diferentes a las que presentan los enzimas comerciales y similares a las que presenta el enzima natural, si bien el proceso de coagulación sigue siendo lento. Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar el enzima Epr y quimosina, siendo, en todos los aspectos, superiores a los controles y a la masas queseras obtenidas exclusivamente con el enzima recombinante. Con este uso combinado se obtienen unas masas queseras con unas mejores características y con una coagulación rápida. En un proceso industrial se debería incubar previamente la leche con la proteasa Epr y utilizar la quimosina como coagulante final.

CONCLUSIONES

1. La proteasa responsable de la coagulación de la leche de la cepa *B. licheniformis* USC-13 es la proteasa menor extracelular Epr.
2. El método FTC-*k*-caseína desarrollado permite medición de la actividad enzimática de un modo más sensible y preciso que otros métodos descritos, permitiendo la obtención de parámetros cinéticos y la caracterización de proteasas coagulantes.
3. Se ha obtenido la proteasa Epr de *B. licheniformis* cepa USC-13 de modo heterólogo en diferentes fondos genéticos, siendo necesario calcio para su activación.
4. La proteasa Epr recombinante permite la obtención de masas queseras con unas características similares a las obtenidas con el enzima natural y diferentes a las masas queseras tradicionales elaboradas con quimosina.
5. La proteasa Epr produce una coagulación lenta que dificultaría su uso industrial, por lo que debería ser usada como coadyuvante de la quimosina.

BIBLIOGRAFÍA

-
- Ageitos J.M., Vallejo V.A., Poza M. y Villa T.G. **2006**. Fluorescein Thiocarbamoyl-*Kappa*-Casein Assay for the Specific Testing of Milk-Clotting Proteases. *J. Dairy Sci.* 89:3770–3777.
 - Ageitos J.M., Vallejo V.A., Sestelo A.B.F., Poza M. y Villa T.G. **2007**. Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13. *J. Appl. Microbiol.* 103:2205–2213.
 - Ahmad S., Gaucher I., Rousseau F., Beaucher E., Piot M., Grongnet J.F., Gaucheron F. **2008**. Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. *Food. Chem.* 106: 11-17.
 - Arnold K., Bordoli L., Kopp J. y Schwede T. **2006**. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.*22:195-201.
 - Banet J.F. **2001**. Aislamiento e identificación de una nueva subespecie de *Bacillus licheniformis* con utilización en la industria quesera. Memoria presentada para optar al Diploma de Estudios Avanzados. USC.
 - Baneyx F. **1999**. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:411-421.

-
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. **2009**. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 37:D26-31.
 - Birnboim H. C. y Doly J. **1979**. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
 - Bott R, Ultsch M, Kossiakoff A, Graycar T, Katz B, Power S. **1988**. The three-dimensional structure of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin at 1.8 Å and an analysis of the structural consequences of peroxide inactivation. *J Biol Chem.* 263:7895-906.
 - Bowie J.U, Lüthy R., Eisenberg D. **1991**. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science.* 253:164-70.
 - Bradford M. M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
 - Bryan, P.N., Gallagher, D.T., Ruan, B., Smith, N. **2010**. Substrate Complex of Fluoride-sensitive Engineered Subtilisin. SUBT_BACAM. DOI:10.2210/pdb3co0/pdb.
 - Carlson A., Hill Jr. C.G. y Olson N. F. **1987a**. Kinetics of Milk Coagulation: I. The Kinetics of *Kappa* Casein hydrolysis in the presence of Enzyme Deactivation. *Biotechnol. Bioeng.* 29:582-589.

- Carlson A., Hill Jr. C.G. y Olson N. F. **1987b**. Kinetics of Milk Coagulation: II. Kinetics of the Secondary Phase: Micelle Flocculation. *Biotechnol. Bioeng.* 29:590-600.
- Carlson A., Hill Jr. C.G. y Olson N. F. **1987c**. Kinetics of Milk Coagulation: III. Mathematical Modeling of the Kinetics of Curt Formation Following Enzymatic Hydrolysis of *k*-Casein-Parameter Estimation. *Biotechnol. Bioeng.* 29:601-611.j
- Carroll T. M. y Setlow P. **2005**. Site-directed mutagenesis and structural studies suggest that the germination protease, GPR, in spores of *Bacillus* species is an atypical aspartic acid protease. *J. Bacteriol.* 187: 7119-7125.
- Chang A., Scheer M., Grote A., Schomburg I., Schomburg D. **2009**. BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res.* (Database issue): D588-D59.
- Choi J.H., Keum K.C., Lee S.Y. **2006**. Production of recombinant proteins by hight cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem. Eng. Sci.* 61:876-885.

-
- Choi N.-S., Chung D.-M., Ryu C. H., Yoon K.-S., Maeng P. J., y Kim S.-H. **2005**. Identification of three extracellular proteases from *Bacillus subtilis* KCTC 3014. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:456-464.
 - Christen G. L. **1987**. A rapid method for measuring protease activity in milk using radiolabeled casein. *J. Dairy Sci.* 70:1807-1814.
 - Claus and Berkeley, **1986**. D. Claus and R.C.W. Berkeley. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, Editors, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. II*, Williams and Wilkins, Baltimore, USA . 1104
 - Cohn F. **1875**: Untersuchungen über Bacterien. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen.* 1:127-222.
 - Colomer-Pallas A., Pereira Y., Petit-Glatron M., Chambert R. **2003**. Calcium triggers the refolding of *Bacillus subtilis* chitosanase. *Biochem. J.*, 369:731-738.
 - Croux C., Paquet V., Goma G., Soucaille P. **1990**. Purification and Characterization of Acidolysin, an Acidic Metalloprotease Produced by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3634-3642.
 - Dalgleish D. G. **1998**. Casein Micelles as Colloids: Surface Structures and Stabilities. *J. Dairy Sci.* 81:3013-3018.

-
- Dixit, M., Murudkar, C.S., and Rao, K.K. **2002**. *epr* is transcribed from a σ^D promoter and is involved in swarming of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184: 596–599.
 - Dixon M. y Webb E. C. **1979**. *Enzymes*. 3rd edition. Academic Press, New York.
 - Donohue T J y Bernlohr R W. **1978**. Effect of cultural conditions on the concentrations of metabolic intermediates during growth and sporulation of *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol.* 135:363–372.
 - Drohse H. B. y Foltmann B. **1989**. Specificity of milk-clotting enzymes towards bovine κ -casein. *Bioch. Biophys. Acta.* 995:221-224.
 - E. coli genotypes. (**2010**, November 9). OpenWetWare. Retrieved 17:46, November 29, 2010.
http://openwetware.org/index.php?title=E._coli_genotypes&oldid=471250.
 - Edberg, S.C. **1992**. US EPA human health assessment: *Bacillus licheniformis*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
 - Errington J. **1993**. *Bacillus subtilis* Sporulation: Regulation of Gene Expression and Control of Morphogenesis. *Microbiol. Rev.* 1-33
 - Esteves C. L. C., Lucey J. A., Wang T., y Pires E. M. V. **2003**. Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *J. Dairy Sci.* 86:2558–2567.

-
- Eyles J. E., Williamson E. D., Flick-Smith H. C., Water E. L., Walter N. J., Baillie L. W., Miller J. **2006**. Pharmaceutical microparticles for single-stranded RN. *PCT Int. Appl.* WO 2006092607 A1 20060908.
 - Farrell H.M. Jr., Malin E.L., Brown E.M., and Mora-Gutierrez A. **2009**. Review of the Chemistry of *Alpha*-S₂-Casein and the Generation of a Homologous Molecular Model to Explain its Properties. *J. Dairy Sci.* 92:1338:1353.
 - Feijoo-Siota L., Villa T.G. **2010**. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food Bioprocess Tech.* 1-23. doi:10.1007/s11947-010-0431-4
 - Gupta M. and Rao K.K. **2009**. Epr plays a key role in DegU-mediated swarming motility of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 295:187–194
 - Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. **2002**. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:15–32.
 - Hall T.A. **1999**. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
 - Holt J.C. **1992**. Structure and stability of bovine casein micelles. *Adv. Protein Chem.* 43:63-51.

-
- Holt J.C., Krieg N.R., Snear P.H.A., Staley J. T., Williams S. T. **1994**. Bergey manual of systematic bacteriology. Williams and Williams Co., Baltimore, MD.
 - Horne D.S. **1998**. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Internat. Dairy J.* 8:171-177.
 - Hull M. E. **1947**. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of proteins in milk. *J. Dairy Sci.* 30:881-884.
 - Jain SC, Shinde U, Li Y, Inouye M, Berman HM. **1998**. The crystal structure of an autoprocessed Ser221Cys-subtilisin E-propeptide complex at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 284:137-44.
 - Kappeler SR, van den Brink HM, Rahbek-Nielsen H, Farah Z, Puhan Z, Hansen EB, Johansen E. **2006**. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342:647-654.
 - Kelley L.A. y Sternberg M.J.E. **2009**. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4:363-371.
 - Kibbe W.A. **2007**. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 35 (suppl 2): W43-W46.

- Kim J.S., Kluskens L.D., de Vos W.M., Huber R. y van der Oost, J. **2004**. Crystal structure of fervidolysin from *Fervidobacterium pennivorans*, a keratinolytic enzyme related to subtilisin. *J. Mol. Biol.* 335: 787-797.
- Kho C.W., Park S.G., Cho S., Lee D.H., Myung P.K., Park B. C. **2005**. Confirmation of Vpr as fibrinolytic enzyme present in extracellular proteins of *Bacillus subtilis*. *Protein. Expres. Purif.* 39:1-7.
- Knaysi G. **1948**. The endospore of bacteria. *Bacteriol. Rev.* 12: 19–77.
- Kobayashi H. **2004**. Polyporoepsin. Pages 113-115 in Handbook of proteolytic Enzymes. 2nd ed. A. J. Barrett, N. D. Rawlings and J. F. Woessner, ed. Elsevier, London, UK.
- Kodgire P., Dixit M., Rao K.K. **2006**. ScoC and SinR negatively regulate epr by corepression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188(17): 6425–6428.
- Kojima S, Minagawa T, Miura K. **1997**. The propeptide of subtilisin BPN' as a temporary inhibitor and effect of an amino acid replacement on its inhibitory activity. *FEBS Lett.* 411:128-132.
- Kuhn P., Knapp M., Soltis S.M., Ganshaw G., Thoene M. y Bott R. **1998**. The 0.78 Å Structure of a Serine Protease: *Bacillus lentus* Subtilisin. *Biochemistry.* 37:13446-13452.
- Kumar G.G., Takagi H. **1999**. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* 7:561-94.

-
- Kumosinski T.F., Brown E.M., y Farrell, H.M. Jr. **1993**. Three-Dimensional Molecular Modeling of Bovine Caseins: A Refined, Energy-Minimized Kappa-Casein Structure. *J. Dairy Sci.* 76:2507-2520.
 - Kumosinski T.F., Brown E.M., y Farrell, H.M. Jr. **1993**. Three-Dimensional Molecular Modeling of Bovine Caseins: An Energy-Minimized Beta-Casein Structure. *J. Dairy Sci.* 76:931-945
 - Kumosinski T.F., Brown, E.M., y Farrell H.M. **2009**. Predicted Energy-Minimized Alpha-S1-Casein Working Model in Molecular Modeling: From Virtual Tools to Real Problems, Kumosinski, T. F. and Liebman M. N., Eds. ACS Symposium Series 576, American Chemical Society, Washington, DC 1994, pp 368-390
 - Laemmli U.K. **1970**. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227; 680-695.
 - Lazazzera B.A., Palmer T, Quisel J y Grossman A.D. **1999**. Cell density control of gene expression and development in *B. subtilis*. En Cell-Cell signaling in Bacillus. Dummy G.M y Winans S.C. Eds. American Society for Microbiology.
 - Li Y, Hu Z, Jordan F, Inouye M; **1995**. Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein

- folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants. *J. Biol. Chem.* 270:25127-25132.
- Lucey J.A. **2002**. ADSA Foundation Scholar Award Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *J. Dairy Sci.* 85:281–294.
 - Lucey J.A., Jhonson M.E., y Horne D.S. **2003**. Invited Review: Perspectives on the basis of the reology and texture properties of cheese. *J. Dairy Sci.* 86:2725-2743.
 - Lüthy R., Bowie J.U., Eisenberg D. **1992**. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature.* 356:83-5.
 - Merchante R., Pooley H.M., and Kamatara D. **1995**. A periplasm in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177:6176-6183.
 - Nilson U.K., Weréem P.O. **2002**. Cheese and cheese-making. *Bioscience explained.* 1:1-8.
 - Oberg K., Chrnyk B.A., Wetzal, R., Fink, A. L. **1994**. Native-like Secondary Structure in Interleukin-1 β Inclusion Bodies by Attenuated Total Reflectance FTIR. *Biochemistry* 33:2628-34.
 - Palmer I. y Wingfield P.T. **1995**. Preparation and extraction of inclusion bodies- 6.3.1-6.3.15. En *Current Protocols in Protein Science*, 2002. John E. Coligan, Ben M. Dunn, David W. Speicher, and Paul T. Wingfield, Hidde L. Ploegh. Eds. John Wiley & Sons, Inc.

- Perez-Castor J.E. **2007**. Multicellularity and social behavior in *Bacillus subtilis*. En *Bacillus: cellular and molecular biology*. Peter Graumann Ed. Caister press.
- Peternel Š., Bele M., Gaberc-Porekar V. y Komel R. **2008**. Inclusion Bodies Contraction with Implications in Biotechnology. *Acta Chim. Slov.* 55:608–612.
- Phadungath C. **2005**. Casein micelle structure: a concise review. Songklanakarin J. *Sci. Technol.*, 27:201-212.
- Poza M., de Miguel T., Vallejo J. A., Ageitos J. M. y Villa T. G. **2006**. Microbial proteases; industrial applications and engineering. In; Hot Spots in Applied Microbiology. Research Signpost 37/ 661 (2). M. Poza Domínguez and T. González Villa ed. Fort P. O. Trivandrium-695023, Kerala, India. In press.
- Poza M., Sieiro C., Carreira L., Barros-Velázquez J., Villa T. G. **2003**.. Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 422. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:691-698.
- Priest FG. **1977**. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* 41:711–753

-
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. **1998**. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:597-635.
 - Rawlings N.D., Morton F.R. y Barrett A.J. **2006**. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 34:270-272.
 - Rawlings N.D., Morton F.R., Kok, C.Y., Kong, J. & Barrett A.J. **2008**. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 36:320-325.
 - Rey M.W., Ramaiya P., Nelson B.A., Brody-Karpin S.D., Zaretsky E.J, Tang M., Lopez de Leon A., Xiang H., Gusti V., Clausen I.G., Olsen P.B., Rasmussen M.D., Andersen J. T., Jørgensen P. L., Larsen T. S., Sorokin A., Bolotin A., Lapidus A., Galleron N., Ehrlich S.D. y Berka R.M. **2004**. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 5:R77.
 - Sambrook J., Fritsch E.F.Y, Maniatis T. **1989**. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2ª edición.
 - Samuels M. L. y Witmer J. A. **2003**. Statistics for the life sciences. 3rd ed. Pearson Education, San Francisco. CA.

-
- Schallmeyer M., Singh A., y Ward O.P. **2004**. Developments in the use of *Bacillus* species in industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50:1-17
 - Schreiber A.B., Haimovich J. **1983**. Quantitative fluorometric assay for detection and characterization of Fc receptors. *Meth. Enzymol.* 93:147-155.
 - Sharp, R.J., M.D. Scawen and Atkinson T. **1989**. Fermentation and Downstream Processing of *Bacillus*. In: *Biotechnology Handbook: Bacillus*, Harwood, C.R. (Ed.). Plenum Press, New York, pp: 255-292.
 - Silva S. V. y Malcata F. X. **2005**. Partial identification of water-soluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: influence of type of coagulant and starter. *J. Dairy Sci.* 88: 1947-1954.
 - Sloma A., Ally A., Ally D., y Pero J. **1988**. Gene encoding a minor extracellular protease in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 170:5557-5563.
 - Sloma A., Rufo G.A. Jr., Theriault K.A., Dwyer M., Wilson S. W., Pero J. **1991**. Cloning and characterization of the gene for an additional extracellular serine protease of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 173:6889-6895.

- Smith E.L., Markland F.S., Kasper C.B., DeLange R.J., Landon M. y Evans W.H. **1966**. The complete amino acid sequence of two types of subtilisin, BPN' and Carlsberg. *J. Biol. Chem.* .241:5974-5976.
- Tanaka S.-i., Saito K., Chon H., Matsumura H., Koga Y., Takano K., Kanaya S. **2007**. Crystal Structure of Unautoprocessed Precursor of Subtilisin from a Hyperthermophilic Archaeon: evidence for Ca²⁺-induced folding. *J. Biol. Chem.* 282:8246-8255
- Tangrea MA, Bryan PN, Sari N, Orban J. **2002**. Solution structure of the pro-hormone convertase 1 pro-domain from *Mus musculus*. *J. Mol. Biol.* 320:801-12.
- Thomas J. G.y Baneyx, F. **1996**. Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing heat-shock proteins. *J. Biol. Chem.* 271:11141-11147.
- Tjalsma H., Antelman H., Jongbloed J.D.H., Braun P.G., Darmon E., Dorenbos R., Dubois J.F., Westers H., Zanen G., Quax W.J., Kuipers O.P., Bron S., Heckel M., van Dijk. **2004**. Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the "Secrets" of the Secretome. *J. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 207-233
- Todar, K. **2005**. Todar's online textbook of bacteriology: The genus *Bacillus*. Department of Bacteriology, University of Wisconsin.

-
- Twining, S. S. **1984**. Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Casein Assay for Proteolytic Enzymes. *Anal. Biochem.* 143:30-34.
 - Uffen, R.L.; Canale-Parola, E. **1972**. Synthesis of Pulcherriminic Acid by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 111:86-93.
 - Vasbinder, A. J., H. S. Rollema, A. Bot y C. G. de Kruif. **2003**. Gelation Mechanism of Milk as Influenced by Temperature and pH; Studied by the Use of Transglutaminase Cross-Linked Casein Micelles. *J. Dairy Sci.* 86:1556-1563.
 - Veith B., C. Herzberg, S. Steckel, J. Feesche, K. H. Maurer, P. Ehrenreich, S. Baumer, A. Henne, H. Liesegang, R. Merkl, A. Ehrenreich, G. Gottschalk. **2004**. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7:204-11.
 - Villa, T. G., V. Notario, J. R. Villanueva. **1975**. β -glucanases of the yeast *Pichia polymorpha*. *Arch. Microbiol.* 104:201-206.
 - Voigt, B., T. Schweder, M. J. J. B. Sibbald, D. Albrecht, A. Ehrenreich, J. Bernhardt, J. Feesche. K. H. Maurer, G. Gottschalk. J. M. van Dijn and M. Hecker. **2006**. The extracellular proteome of *Bacillus licheniformis* grown in different media under different nutrient starvation conditions. *Proteomics.* 6:268-281.

- Walstra, P. **1979**. The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications. *J. Dairy Res.* 46:317-322.
- Walstra, P. **1990**. On the Stability of Casein Micelles. *J. Dairy Sci.* 73:1965-1979.
- Webb, E. C. **1984**. Enzyme Nomenclature. New York Academic Press.
- Whitaker, J. R. **1963**. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal. Chem.* 35:1950-1956.
- Wright CS, Alden RA, Kraut J. **1969**. Structure of subtilisin BPN' at 2.5 angström resolution. *Nature.* 221:235-42.

Fluorescein Thiocarbamoyl-Kappa-Casein Assay for the Specific Testing of Milk-Clotting Proteases

J. M. Ageitos, J. A. Vallejo, M. Poza, and T. G. Villa¹

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT

Milk-clotting proteases, which are widely used in the cheese-making industry, are enzymes that use soluble caseins as their preferential substrates. Here, we propose a modification to a method previously described for the specific determination of milk-clotting proteases by using κ -casein labeled with fluorescein isothiocyanate as substrate. Validation of the modified method was confirmed using natural bacterial, fungal, plant, and animal milk-clotting proteases, as well as a milk-clotting enzyme of recombinant origin. The new modified method described here allowed specific quantification of the activity of milk-clotting proteases in a very sensitive way and permitted determination of the appropriate kinetic parameters of all the enzymes tested, consistent with their origin and degree of purity.

Key words: milk-clotting protease, enzymatic assay, κ -casein

INTRODUCTION

Caseins are a family of phosphoproteins (α_{S1} , α_{S2} , β , κ) that account for nearly 80% of bovine milk proteins (Lucey et al., 2003) and that form soluble aggregates because of the κ -casein molecules that stabilize the micellar structure. There are several models that account for the special conformation of casein in the micelles (Dalglish, 1998). One of them proposes that the micellar nucleus is formed by several submicelles, the periphery consisting of microvellosities of κ -casein (Walstra, 1979; Lucey, 2002). Another model suggests that the nucleus is formed by casein-interlinked fibrils (Holt, 1992). Finally, the most recent model (Horne, 1998) proposes a double link among the caseins for gelling to take place. All 3 models consider micelles as colloidal particles formed by casein aggregates wrapped up in soluble κ -casein molecules.

The milk-clotting process consists of 3 main phases (Carlson et al., 1987a): 1) enzymatic degradation of κ -

casein, 2) micellar flocculation, and 3) gel formation. Each step follows a different kinetic pattern, the limiting step in milk-clotting being the degradation rate of κ -casein. The kinetic pattern of the second step of the milk-clotting process is influenced by the cooperative nature of micellar flocculation (Carlson et al., 1987b; Silva and Malcata, 2005) whereas the rheological properties of the gel formed depend on the type of action of the proteases, the type of milk, and the patterns of casein proteolysis (Silva and Malcata, 2005). The overall process is influenced by several different factors, such as pH or temperature (Esteves et al., 2003; Vasbinder et al., 2003).

Milk-clotting proteases act on the soluble portion, κ -casein, thus originating an unstable micellar state that results in clot formation (Vasbinder et al., 2003). Chymosin (EC 3.4.23.4) is an aspartic protease that specifically hydrolyzes the peptide bond in Phe₁₀₅-Met₁₀₆ of κ -casein and is considered to be the most efficient protease for the cheese-making industry (Rao et al., 1998). However, there are milk-clotting proteases able to cleave other peptide bonds in the κ -casein chain, such as the endothiapepsin produced by *Endothia parasitica* (Drohse et al., 1989). There are also several milk-clotting proteases that, being able to cleave the Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bond in the κ -casein molecule, also cleave other peptide bonds in other caseins, such as those produced by *Cynara cardunculus* (Lucey, 2002; Esteves et al., 2003; Silva and Malcata, 2005) or even bovine chymosin (Kobayashi, 2004). This allows the manufacture of different cheeses with a variety of rheological and organoleptic properties.

The conventional way of quantifying a given milk-clotting enzyme (Poza et al., 2003) employs milk as the substrate and determines the time elapsed before the appearance of milk clots. However, milk clotting may take place without the participation of enzymes because of variations in physicochemical factors, such as low pH or high temperature (Lucey, 2002; Lucey et al., 2003; Vasbinder et al., 2003). Consequently, this may lead to confusing and irreproducible results, particularly when the enzymes have low activity. At the same time, the classical method is not specific enough, in terms of setting the precise onset of milk gelation, such that the

Received February 6, 2006.

Accepted April 11, 2006.

¹Corresponding author: mpvilla@usc.es

determination of the enzymatic units involved becomes difficult and unclear. Furthermore, although it has been reported that κ -casein hydrolysis follows typical Michaelis-Menten kinetics (Carlson et al., 1987a), it is difficult to determine with the classic milk-clotting assay.

To overcome this, several alternative methods have been proposed, such as the determination of halo diameter in agar-gelified milk (Poza et al., 2003), colorimetric measurement (Hull, 1947), or determination of the rate of degradation of casein previously labeled with either a radioactive tracer (Christen, 1987) or a fluorochrome compound (Twining, 1984). All these methods use casein as the substrate to quantify proteolytic or milk-clotting activities.

The method proposed in the present paper is the result of a modification to the one described by Twining (1984). The main modification was substituting the substrate previously used (casein) by κ -casein labeled with the fluorochrome fluorescein isothiocyanate (FITC) to yield the fluorescein thiocarbonyl (FTC) derivative. This variation allows quantification of the κ -casein molecules degraded in a more precise and specific way, detecting only those enzymes able to degrade such molecules. The method described by Twining (1984), however, was designed to detect the proteolytic activity of a considerably large variety of enzymes.

Validation of the new modified method described here was carried out using a battery of known milk-clotting proteases of different origin (animal, fungal, microbial, recombinant, or of plant origin) usually used in our laboratory or in the cheese-making industry (i.e., *Rhizomucor miehei* protease), thus allowing us to study the efficiency of the method. The method proposed here allows the precise characterization of enzymes capable of cleaving κ -casein. Because κ -casein degradation leads to the formation of milk clots, here we propose the use of this new method for the detection, quantification, and characterization of enzymes able to originate milk curds useful to the industry for the elaboration of different types of cheese.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the Enzymatic Samples

The proposed method was validated using commercial cheese-making proteases, such as that obtained from *R. miehei* (Arroyo, Spain) or recombinant bovine chymosin produced from *Escherichia coli* (Chymax, Pfizer, Inc., Milwaukee, WI), from flowers of *Cynara cardunculus*, cultures of *Bacillus licheniformis*, and the abomasum of *Bubalus arnee bubalis*. The enzymatic samples from *C. cardunculus* were obtained by an infusion of the flowers in 0.01 M potassium phosphate

buffer, pH 6.0, after which the flowers were removed by centrifugation. The enzyme from *B. licheniformis* was obtained from the supernatant of a stationary phase culture grown at 37°C for 7 d at 180 rpm, filtered, concentrated 10-fold, and 60% ammonium sulfate-precipitated. After dialyzing against 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, the dialysate was used for enzymatic assays. The enzyme from *B. arnee bubalis* was obtained by grinding the abomasum tissues extracted from a suckling calf, using liquid N. The resulting powder was resuspended in 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, and then centrifuged for 15 min at 15,000 rpm. The supernatant was used as the crude enzyme.

Finally, trypsin (Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim, Germany) was diluted as described by Twining (1984) to a final concentration of 5 μ g/mL in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 10 mM CaCl₂.

FTC- κ -Casein Assay

The assays were carried out as described by Twining (1984) in triplicate with some modifications. One gram of κ -casein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was dissolved in 100 mL of 50 mM carbonate buffer, pH 9.5, containing 150 mM NaCl. Then, 40 mg of FITC was added to the solution, and the mixture was gently stirred for 1 h at room temperature. Free FITC was removed by dialyzing twice against suspensions of 1% charcoal in 2 L of water, then against 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5 overnight, followed by 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. The protein concentration was adjusted to 0.5% with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2. The substrate was stored in 1 mL aliquots frozen at -20°C.

The quantity of FITC attached to κ -casein, 14.12 μ g per mg of solid, was determined by comparing this substrate with the commercial one, which was casein-fluorescein isothiocyanate type III containing 61 μ g of FITC per mg of solid (Sigma-Aldrich).

The reaction mixture contained 10 μ L of the enzymatic sample, 20 μ L of 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, and 20 μ L of 0.5% FTC- κ -casein. The reaction was carried out in covered 1.5-mL Eppendorf tubes in rotary motion (180 rpm) at 37°C from 15 to 185 min, depending on the assay. The reaction was stopped by adding 120 μ L of 5% cold trichloroacetic acid and mixing thoroughly. The tubes were allowed to stand at room temperature (23 to 24°C) for at least 1 h. The TCA-insoluble proteins were sedimented by centrifugation for 5 min at 14,000 rpm. A 60- μ L aliquot of the supernatant was diluted with 400 μ L of 0.5 M Tris-HCl, pH 8.5.

Aliquots (350 μ L) of the samples were placed in 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark), and the final

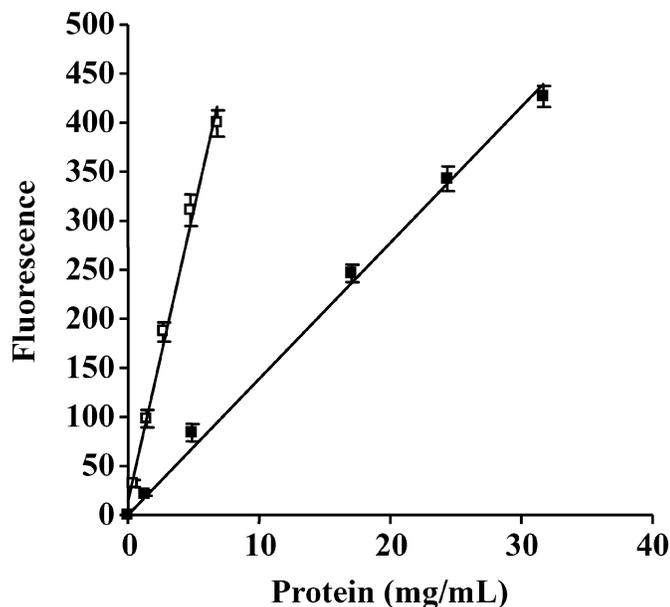


Figure 1. Standard plots showing the relationship between fluorescence and the amount of degraded fluorescein thiocarbamoyl (FTC)-casein ($Y = 59.232X + 13.64$; $R^2 = 0.993$) (□) and FTC- κ -casein ($Y = 13.464X + 9.0912$; $R^2 = 0.996$) (■). X refers to milligrams of protein per milliliter, and Y refers to fluorescence values. Error bars correspond to standard deviations from triplicate replicas.

values were measured using a robotized fluorometer (Luminescence Spectrometer LS50B, Perkin Elmer, Wellesley, MA) with a numeric slit of 2.5 and excitation and emission wavelengths of 490 and 525 nm, respectively.

Appropriate controls were performed by substituting the enzyme with 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 6.0. Basal fluorescence levels were subtracted from the resulting values to determine the quantity of free fluorochrome. The values of total protein concentration were determined by Bradford's method (Bradford, 1976).

A standard plot relating the fluorescence values obtained and the amount of degraded FTC- κ -casein was designed (Figure 1), taking into account that the FTC measured by fluorescence is released after the κ -casein proteolysis. This plot was constructed using trypsin for the degradation of increasing quantities of FTC- κ -casein.

One enzymatic unit was defined as the amount of enzyme necessary to degrade 1 μg of FTC- κ -casein in 1 h at 37°C.

As usual, Michaelis-Menten (Dixon and Webb, 1979) plots were performed as described above but modifying substrate concentrations, which were varied from 0.087 to 1.74 mg/mL. Enzymatic samples from *B. licheniformis* cultures and from the abomasum of *B. arnee*

bubalis were subjected to inhibition studies using several protease inhibitors reported by Rao et al., (1998); pepstatin A, dithiothreitol (DTT), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), all from Sigma-Aldrich, and EDTA, from Merck (Darmstadt, Germany). The PMSF, DTT, and pepstatin A were dissolved in 100% ethanol. First, enzymatic samples were incubated for 40 min in the presence of the inhibitors, as described by Croux et al. (1990). These previously treated enzymatic samples were subjected to the reaction protocol described for the FTC- κ -casein assay. The final concentration of the inhibitors in the reaction was 1 mM for DTT, PMSF, and EDTA and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for pepstatin A. Controls were conducted substituting the inhibitor by ethanol except for the EDTA. Both kinetic and inhibition assays were performed to demonstrate the precision and specificity of the new modified method.

FTC-Casein Assay

This assay was carried out as described by Twining (1984). The substrate used, casein fluorescein isothiocyanate III, was obtained from Sigma-Aldrich. The method consisted of determining the proteolytic activity by measuring the fluorescence values obtained from the free fluorochrome released due to casein degradation. The final fluorescence values were measured using the fluorometer described above. A standard plot was also constructed following the same strategy as that used for FTC- κ -casein assays (Figure 1).

Comparison Between FTC- κ -Casein and FTC-Casein Assays

A specific enzyme able to act only on κ -casein (*R. miehei* protease) and a less specific proteolytic enzyme (trypsin) were tested for comparative purposes. Thus, the enzymatic sample was incubated in the presence of FTC-casein or FTC- κ -casein, and the fluorescence was measured following the FTC-casein assay or the FTC- κ -casein assay, respectively. It is important to note that the concentrations of the enzymatic sample or the different substrates in both methods were the same, although the number of bound FTC molecules per gram of substrate was about 4-fold higher in the case of the commercial substrate (FTC-casein from Sigma-Aldrich). This variation was taken into account to obtain the final values and for comparative purposes. In fact, in the enzymatic units defined above it was taken into account the relationship between fluorescence and protein values, thus allowing comparison of the activity values by using the linear equation; $Y = 3.6949X$, where X refers to the units of FTC-casein per milliliter and Y refers to the units of FTC- κ -casein per milliliter ($R^2 =$

0.9981). Data were compared using statistical tests as described in the following section.

Statistical Analysis

To determine the normal distribution of data, standard kurtosis and standard asymmetry were calculated by measuring the data 20 times. Comparisons of variance were performed using the *F*-test. Finally, for the design of pair comparison, 1-tailed and 2-tailed Student *t*-tests were used (Samuels and Witmer, 2003). The Statgraphics Plus software V. 5.1 (StatPoint Inc., Herndon, VA) was used.

Milk-Clotting Assay

These assays were carried out using powdered skimmed milk (Central Lechera Asturiana, Siero, Spain) reconstituted at 26% (wt/vol) in 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, as substrate. The enzyme reactions were carried out at least in triplicate at 37°C in test tubes with 200 µL of enzyme solution and 200 µL of substrate. The milk clots were visualized by turning the tubes upside down.

RESULTS AND DISCUSSION

Standardization of the FTC-κ-Casein Assay

The standard plot relating the fluorescence values obtained and the amount of degraded FTC-κ-casein (Figure 1) allowed us to definitively establish a linear relationship between a given amount of fluorescence and the above-defined enzymatic units. In the present work we observed that the value of residual fluorescence showed a linear relationship with the substrate concentration. To standardize the method, here the control values were subtracted from the value of each measurement because negative controls may show variations in values of the different batches. As described by Twining (1984), some FTC release can occur when the samples are thawed. This effect can be avoided by performing the controls as described above.

It should be recalled that the experiments carried out by Twining (1984) were done with dilutions of pure enzyme, whereas in the present method the assays were carried out with industrial partially purified enzymes or with enzymes obtained directly from bacterial broths or animal or plant tissues, and, hence, were far from pure.

Validation of the FTC-κ-Casein Assay

To validate the method, samples of known milk-clotting enzymes of different origin (from *R. miehei*, from

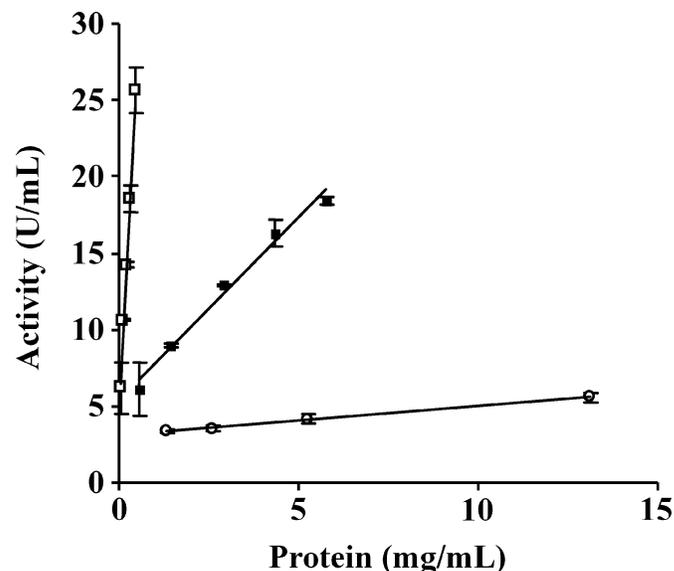


Figure 2. Specific activity of milk-clotting proteases from *Rhizomucor miehei* ($Y = 46.093X + 4.497$; $R^2 = 0.984$) (□), *B. licheniformis* ($Y = 2.386X + 5.359$; $R^2 = 0.984$) (■) and the abomasum of *Bubalus arnee bubalis* ($Y = 0.190X + 3.079$, $R^2 = 0.996$) (○). *X* refers to milligrams of protein per milliliter, and *Y* refers to activity (U/mL). Error bars correspond to standard deviations from triplicate replicas.

recombinant *E. coli*, from flowers of *C. cardunculus*, from *B. licheniformis*, and from the abomasum of *B. arnee bubalis*) were subjected to the FTC-κ-casein assay designed here.

Linearity of the Method

First, a plot showing the specific activity of 3 different enzymatic samples was drawn (Figure 2), relating the values of the amount of total protein in these samples to the values of the enzymatic units extracted from Figure 1. As expected, the degradation of the labeled substrate showed a linear relationship with the increase in enzyme concentration. The linear relationship observed demonstrates that the new modified method works in a precise fashion. The method allowed precise determination of the enzymatic units and the specific activity values of the enzymes. As shown in Figure 2, the commercial enzyme from *R. miehei* showed higher specific activity values than the *B. licheniformis* and *B. arnee bubalis* enzymes, which behaved as crude enzyme samples. Because of its high specific activity, the commercial enzyme from *R. miehei* was used to carry out a number of enzymatic assays.

Stability and Sensitivity of the Method

To check the stability of the modified method, the activity of different *R. miehei* enzymatic dilutions was

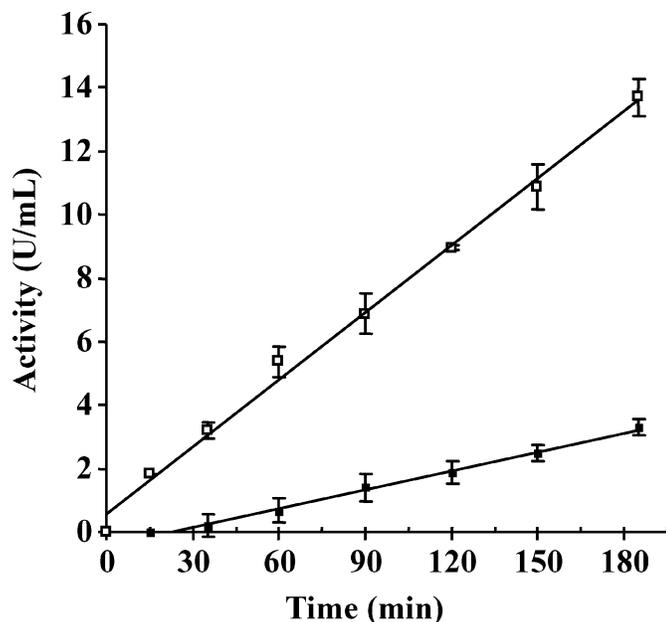


Figure 3. Effect of the incubation time and dilution factor on the enzymatic activity of *Rhizomucor miehei* protease. Dilution factor 1/1,000 ($Y = 0.071X + 0.574$; $R^2 = 0.995$) (□) and dilution factor 1/10,000 ($Y = 0.020X - 0.431$; $R^2 = 0.995$) (■). X refers to time in minutes, and Y refers to activity units per milliliter. Error bars correspond to standard deviations from triplicate replicas.

measured by extending the reactions from 15 to 185 min (Figure 3). The results showed that the linearity claimed in Twining's method (1984) is applicable to fairly diluted enzymatic samples. Additionally, when the results shown in Figure 3 were further analyzed, it was concluded that it is possible to detect activity in *R. miehei* samples even when the protein concentration is as low as 2.6 ng of enzyme in the reaction mixture, when the reaction is maintained for 1 h. The FTC- κ -casein method showed its high sensitivity and its stability even when the reactions were carried out over a prolonged time.

Determination of Kinetic Parameters

The kinetic parameters of 4 enzymatic samples of different origin (from *B. arnee bubalis*, *R. miehei*, *C. cardunculus* and the recombinant chymosin) were studied to evaluate the precision of the new modified method. As shown in Figure 4, the activity of the 4 enzymatic samples was measured in the presence of increasing concentrations of substrate. The plots revealed that the kinetic reaction fitted classic Michaelis-Menten kinetics, which is also followed by the first step of milk coagulation: the hydrolysis of κ -casein (Carlson et al., 1987a). No inhibition effect due to an excess of substrate was detected even at high concentrations of

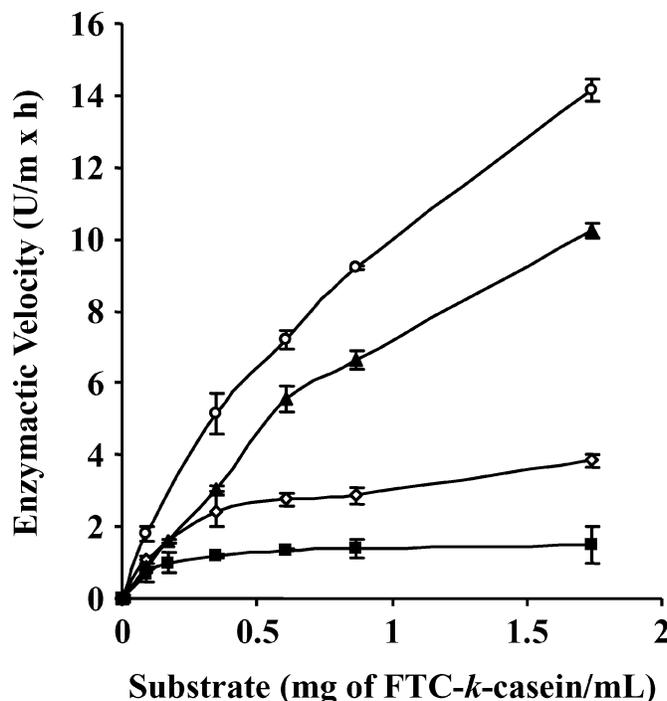


Figure 4. Effect of substrate concentration on the enzymatic activity of samples from; Chymax (■), *Rhizomucor miehei* (○), *Bubalus arnee bubalis* (▲), and *Cynara cardunculus* (◇). Error bars correspond to standard deviations from triplicate replicas.

substrate, under the conditions described. The V_{max} and K_m values of the 4 different enzymatic samples were obtained with the Lineweaver-Burk method (Dixon and Webb, 1979; Figure 5). The method allowed the establishment of the expected values of the kinetic parameters (Table 1).

Inhibition Assays

The inhibition assays on the enzymatic samples from *B. licheniformis* and *B. arnee bubalis*, carried out with the proposed method, afforded the results presented in Table 2. The *B. licheniformis* milk-clotting protease was inhibited by PMSF, thus indicating the serine proteinase nature of the enzyme. On the contrary, *B. arnee bubalis* chymosin was inhibited by pepstatin, indicating its aspartic character. The results show that both types of milk-clotting enzymes (serine and aspartic proteinases) can be detected by the modified method reported here because they both produced κ -caseinolysis, this being the first step of the milk-coagulation process, even though their action on caseins may be different.

Specificity of the FTC- κ -Casein Assay for Measuring κ -Casein Degradation

Having established the standardization and validation of the FTC- κ -casein assay described here and with

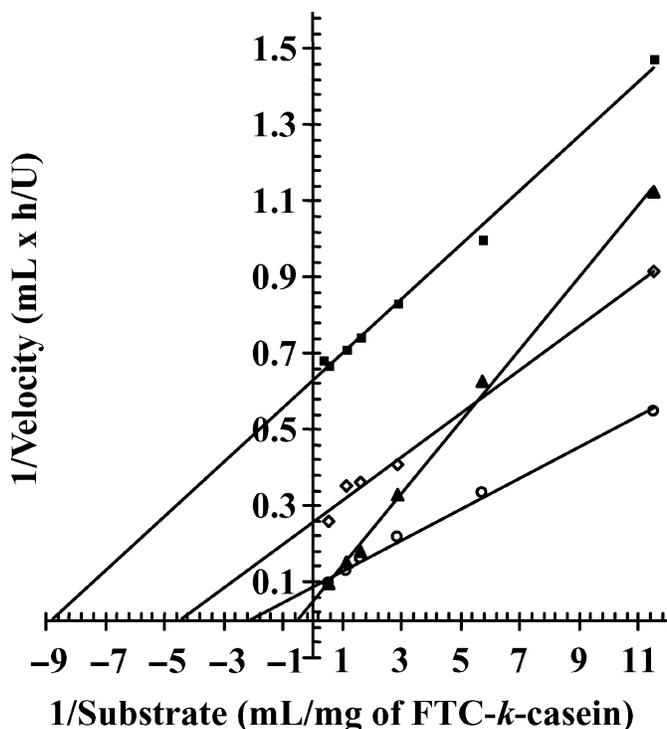


Figure 5. Lineweaver-Burk plot of enzymatic activity of samples from; Chymax ($Y = 0.072X + 0.629$; $R^2 = 0.995$) (■), *Rhizomucor miehei* ($Y = 0.041X + 0.087$; $R^2 = 0.996$) (○), *Bubalus arnee bubalis* ($Y = 0.095X + 0.045$; $R^2 = 0.997$) (▲), and *Cynara cardunculus* ($Y = 0.058X + 0.256$; $R^2 = 0.993$) (◇).

a view to determining the specificity of the method for measuring κ -caseinolytic degradation, we statistically compared this method and the method previously described by Twining (1984). The data obtained are shown in Table 3.

When the distribution of the data was analyzed, it was found that values of standard kurtosis and standard asymmetry were 0.895 and -1.430, respectively. These values demonstrated the normal distribution of data because they were included within the -2 to the +2 interval.

When variance comparison was designed, the following hypothesis was established:

$$H_0: S_{\text{FTC-casein assay}} = S_{\text{FTC-}\kappa\text{-casein assay}} \text{ and}$$

$$H_1: S_{\text{FTC-casein assay}} = S_{\text{FTC-}\kappa\text{-casein assay}}$$

As presented in Table 3, in both cases the P -value was more than 0.05, indicating that H_0 could not be rejected.

The statistical data obtained from variance comparison indicated that variance values did not differ significantly, which allowed us to establish that both methods are comparable; therefore the 2-tailed and 1-tailed t -tests could be designed.

The 2-tailed t -test was performed following the hypothesis:

$$H_0: \text{FTC-casein assay} = \text{FTC-}\kappa\text{-casein assay and}$$

$$H_1: \text{FTC-casein assay} \neq \text{FTC-}\kappa\text{-casein assay.}$$

As shown in Table 3, in the case of trypsin data the P -values were greater than 0.05, demonstrating that H_0 could not be rejected. In the case of the data for *R. miehei*, the P -values were less than 0.01, indicating highly significant differences between the means.

The 1-tailed t -test was conducted, establishing the following hypothesis:

$$H_0: \text{FTC-casein assay} = \text{FTC-}\kappa\text{-casein assay and}$$

$$H_1: \text{FTC-casein assay} < \text{FTC-}\kappa\text{-casein assay.}$$

As shown in Table 3, the P -values for trypsin data were greater than 0.05, demonstrating that H_0 could not be rejected. Finally, in the case of the data for *R. miehei*, the P -values were less than 0.01, showing that H_1 is acceptable.

The statistical data obtained from the t -tests revealed that the values obtained with the FTC- κ -casein assay are significantly greater (2.648-fold more) than those obtained with the FTC-casein assay when *R. miehei* protease was used, whereas when trypsin was used the

Table 1. Values of enzymatic units, specific activity, protein concentration, V_{max} , and K_m of 4 enzymatic samples¹

Enzymatic sample	V_{max}	K_m	U ² /mL	mg of protein/mL	U/mg of protein
<i>Bubalus arnee bubalis</i>	22.124	2.108	10,243 ± 0.21	0.164 ± 0.02	62.46
<i>Cynara cardunculus</i>	3.912	0.225	3.841 ± 0.21	0.013 ± 0.03	295.48
<i>Rhizomucor miehei</i>	16.611	0.714	14.139 ± 0.05	0.013 ± 0.02	1,087.63
Chymax	0.328	2.280	1.492 ± 0.52	0.005 ± 0.01	331.66

¹Reactions were carried out at 37°C for 1 h.

²One enzymatic unit (U) was defined as the amount of enzyme necessary to degrade 1 µg of fluorescein thiocarbamoyl- κ -casein in 1 h at 37°C.

Table 2. Effect of inhibitors on the enzyme activity of samples from *Bacillus licheniformis* and *Bubalus arnee bubalis*

Enzymatic sample	Inhibitor ¹	Concentration	Residual activity, %
<i>B. licheniformis</i>	Control	0	100 ± 0.45
	Control with ethanol	10 mL/mL	95.62 ± 0.49
	PMSF	1 mM	0 ± 0.54
	DTT	1 mM	109.02 ± 0.72
	EDTA	1 mM	93.60 ± 0.91
	Pepstatin A	1 µg/mL	99.73 ± 0.61
	<i>B. arnee bubalis</i>	Control	0
Control with ethanol		10 mL/mL	96.74 ± 2.58
PMSF		1 mM	100.55 ± 7.24
DTT		1 mM	99.45 ± 4.19
EDTA		1 mM	105.22 ± 4.63
Pepstatin A		1 µg/mL	43.42 ± 1.03

¹Inhibitor: PMSF = phenylmethylsulfonyl fluoride; DTT = dithiothreitol; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid.

values obtained were similar using both assays or did not differ significantly.

Finally, it was concluded that the method reported here detected κ -caseinolytic activity more specifically than the one described by Twining (1984). Taking all the above results together, it is possible to state that the new modified FTC- κ -casein method is able to specifically detect κ -caseinolytic enzymes more efficiently (2.648-fold better) than Twining's method, whereas the values of the activity of a less specific enzyme (trypsin) were similar using both methods.

Final Comments

At this juncture it is important to remark that all the proteases used in this work produced milk clots when the classic milk-clotting assay was followed (Poza et al., 2003). The classic milk-clotting assay was only qualitative, giving either the actual appearance of milk clots or affording the determination of the most active enzyme of those analyzed. Thus, no comparison between the results obtained from classic milk clotting and FTC- κ -casein assays was possible.

Milk clotting is a complex process that depends on many factors, such as high temperature or low pH (Es-

teves et al., 2003; Vasbinder et al., 2003). Regardless of these factors, the FTC- κ -casein method affords accurate and precise determinations of κ -caseinolytic degradation, the first step in the milk-clotting process. The modified FTC- κ -casein assay described here allows the detection of different types of proteases at levels when no milk clotting is yet apparent, unveiling its higher sensitivity over currently used assay procedures. Therefore, the method may find application as an indicator during the purification or characterization of new milk-clotting enzymes.

The method described by Twining (1984) has been extensively used over the last 2 decades to measure the proteolytic activity of all types of protease able to nonspecifically degrade substrates such as casein, hemoglobin, or fibrinogen, allowing the detection of minimum quantities of enzyme; i.e., 5 ng (Twining, 1984). The modified method proposed here basically consisted of the same methodology described by Twining (1984) but employed a more specific substrate and allowed detection of enzyme amount as low as 2.6 ng. The reason for this modification is the need for precise quantification of the activity of the proteases that lead to milk clotting. The use of fluorescence-based measurements allowed precise and fast quantifications of the so-called

Table 3. Values of enzymatic units obtained with both trypsin and *Rhizomucor miehei* enzyme using fluorescein thiocarbamoyl (FTC)-casein and FTC- κ -casein assays

Sample	Assay		F-test		Student <i>t</i> -test	
	FTC-casein	FTC- κ -casein	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value	<i>t</i> -value	<i>P</i> -value
Trypsin ¹	28.284 ± 0.53	28.215 ± 0.31	2.822	0.523	0.113	0.542 ^a
<i>R. miehei</i> ²	4.685 ± 0.41	12.405 ± 0.32	1.595	0.771	-14.829	0.602 10 ⁻⁴ a

^a*P*-values obtained by the 1-tailed Student *t*-test.

^b*P*-values obtained by the 2-tailed Student *t*-test.

¹Trypsin (1 µg/mL).

²*R. miehei* milk-clotting protease (5 µg/mL).

clotting strength of a given protease. Because variations in the viscosity of milk only take place when the enzymatic phase of coagulation is nearly completed (60% of the elapsed time before clotting appears; Lucey, 2002) and because the time required for the classic assay increases for very diluted enzymatic samples, the FTC- κ -casein assay allows a precise screening of the enzymatic phase during the milk coagulation process. The FTC- κ -casein assay is amenable to use by the cheese-making industry for specifically testing κ -caseinolytic enzymes of different origin and nature.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their gratitude to the School of Biotechnology of the University of Santiago de Compostela for the support shown throughout. They also want to thank the Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Santiago de Compostela, for the use of the fluorometer.

REFERENCES

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Carlson, A., C. G. Hill, Jr., and N. F. Olson. 1987a. Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation. *Biotechnol. Bioeng.* 29:582–589.
- Carlson, A., C. G. Hill, Jr., and N. F. Olson. 1987b. Kinetics of milk coagulation: II. Kinetics of the Secondary Phase. *Micelle Flocculation. Biotechnol. Bioeng.* 29:590–600.
- Christen, G. L. 1987. A rapid method for measuring protease activity in milk using radiolabeled casein. *J. Dairy Sci.* 70:1807–1814.
- Croux, C., V. Paquet, G. Goma, and P. Soucaille. 1990. Purification and characterization of acidolysin, an acidic metalloprotease produced by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3634–3642.
- Dagleish, D. G. 1998. Casein micelles as colloids. Surface structures and stabilities. *J. Dairy Sci.* 81:3013–3018.
- Dixon, M., and E. C. Webb. 1979. *Enzymes*. 3rd ed. Academic Press, New York, NY.
- Drohse, H. B., B. Foltmann, and B. Foltmann. 1989. Specificity of milk-clotting enzymes towards bovine kappa-casein. *Biochim. Biophys. Acta.* 995:221–224.
- Esteves, C. L. C., J. A. Lucey, T. Wang, and E. M. V. Pires. 2003. Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *J. Dairy Sci.* 86:2558–2567.
- Holt, C. 1992. Structure and stability of bovine casein micelles. *Adv. Protein Chem.* 43:63–151.
- Horne, D. S. 1998. Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.* 8:171–177.
- Hull, M. E. 1947. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of proteins in milk. *J. Dairy Sci.* 30:881–884.
- Kobayashi, H. 2004. Polyporopepsin. Pages 113–115 in *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2nd ed. A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner, ed. Elsevier, London, UK.
- Lucey, J. A. 2002. ADSA Foundation Scholar Award Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *J. Dairy Sci.* 85:281–294.
- Lucey, J. A., M. E. Johnson, and D. S. Horne. 2003. Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *J. Dairy Sci.* 86:2725–2743.
- Poza, M., C. Sieiro, L. Carreira, J. Barros-Velázquez, and T. G. Villa. 2003. Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 422. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:691–698.
- Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:597–635.
- Samuels, M. L., and J. A. Witmer. 2003. *Statistics for the Life Sciences*. 3rd ed. Pearson Education, San Francisco, CA.
- Silva, S. V., and F. X. Malcata. 2005. Partial identification of water-soluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: Influence of type of coagulant and starter. *J. Dairy Sci.* 88:1947–1954.
- Twining, S. S. 1984. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.* 143:30–34.
- Vasbinder, A. J., H. S. Rollema, A. Bot, and C. G. de Kruif. 2003. Gelation mechanism of milk as influenced by temperature and pH; Studied by the use of transglutaminase cross-linked casein micelles. *J. Dairy Sci.* 86:1556–1563.
- Walstra, P. 1979. The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications. *J. Dairy Res.* 46:317–322.

security factor, were 36.84 and 37.35 ng/mL for diflunisal and salicylic acid, respectively.

References

- Muñoz de la Peña A, Moreno MD, Durán-Merás I, Salinas F. *Talanta* 1996; **43**: 1349.
- Murillo Pulgarin JA, Alañon Molina A. *Comput. Chem.* 1993; **17**: 341.

Determination of milk clotting strength: the fluorescent approach

J. M. Ageitos, J. A. Vallejo, M. Poza* and T. G. Villa
Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain.
*E-mail: mpjmam@usc.es

Proteases are enzymes widely used in both the food and pharmaceutical industries, accounting for ca. 60% of the world enzyme market (1). Proteases have revealed themselves as very specific in their action on a given substrate in a particular site. This effect is essential, since a main role is to produce other active proteins from their inactive states or 'zymogens'. Another main role consists of the degradation of both endogenous and exogenous proteins in order to generate amino acids. Because of the great interest of these enzymes we must have reliable methods, as accurate as possible, for both detection and quantification.

Several ways have been proposed to detect these activities, mainly based on the disappearance of the substrate or the generation of by products. The substrates may be either the preferential substrate for a given protease or chemical analogues that exhibit similarities to the natural substrates as far their linkage are concerned. One of the most active fields in food science and technology concerns the cheese-making industry. The kinetics of milk-clotting formation has been studied since the 1970s. Because of the changes in the mechanization and robotization in the industry, we must use precise and accurate methods for determining the milk clot strength of a given rennet. Milk-clotting proteases act on the soluble portion of caseins, kappa-casein, thus originating an unstable micellar state that results in clot formation (2).

The first stage of milk clotting consists of a first-order reaction following Michaelis–Menten kinetics (3). This reaction is, in fact, the limiting step in cheese making and is normally conducted by chymosin (E.C. 3.4.23.4), considered to be one of the best aspartic proteases for milk clotting (1). This enzyme hydrolyses the linkage Phe₁₀₅–Met₁₀₆ in the kappa-casein chain, leading to milk clot formation.

The classic milk-clotting assay consists of determination of the time elapsed until the milk clot appears. Because milk clotting is sensitive to pH and temperature (2), other methods, such as haloes formation in agar milk, colorimetric determination or the determination of the degree of hydrolysis of previously labelled molecules of casein, have been employed. Recently a new method has been proposed (4) (Fig. 1) in order to facilitate this task. The method uses FITC-labelled

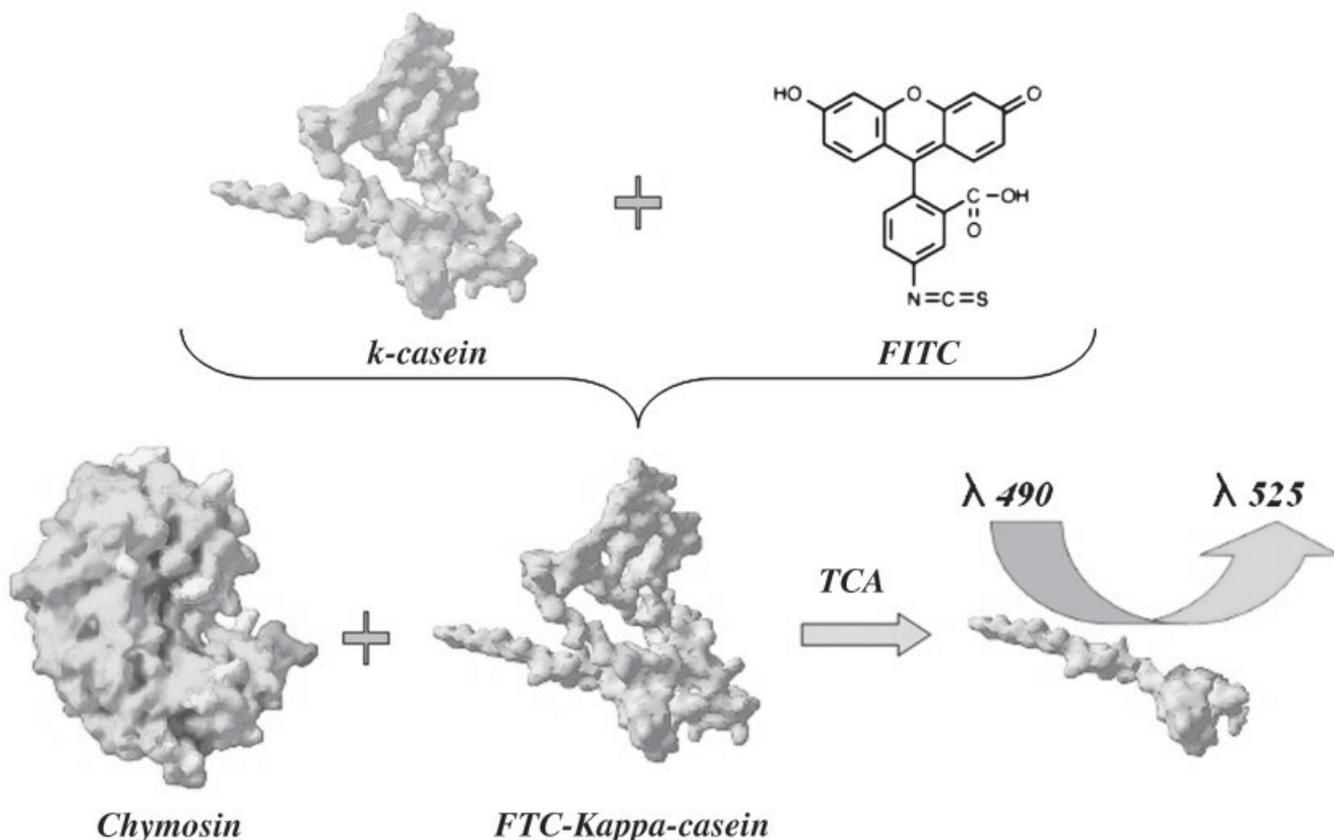


Figure 1. FITC-kappa-casein assay scheme.

kappa-casein. Fluorescein isothiocyanate (FITC) is a widely used fluorescent marker (5). The isothiocyanate reacts with amino-terminal groups and primary amines of the proteins, originating fluorescein thiocarbonyl (FTC) that remains bound to the protein (6).

In the method of Ageitos *et al.* (4), the amount of fluorochrome released by the action of the protease on the kappa-casein is quantified and compared with the residual levels (Fig. 1). The relationship between fluorescence and the amount of protein of the substrate leads to enzymatic unit definition. The method described by Ageitos *et al.* (4) allows the comparison of the enzyme activity of different fluorescent substrates. The use of fluorescence-based measurements allows precise and fast determination of the so-called 'clotting strength' of a given protease. Since variations in the viscosity of milk only take place when the enzymatic phase of coagulation is nearly complete and the time required for the classic assay increases for very diluted enzymatic samples, the FTC-kappa-casein assay (4) is amenable to use in the cheese-making industry for specifically testing kappa-caseinolytic enzymes of different origin and nature.

References

1. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; **62**: 597–635.
2. Lucey JA. ADSA Foundation Scholar Award formation and physical properties of milk protein gels. *J. Dairy Sci.* 2002; **85**: 281–294.
3. Carlson A, Hill CG Jr, Olson NF. Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa-casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation. *Biotechnol. Bioeng.* 1987; **29**: 582–589.
4. Ageitos JM, Vallejo JA, Poza M, Villa TG. Fluorescein thiocarbonyl-kappa-casein assay for the specific testing of milk-clotting proteases. *J. Dairy Sci.* 2006 (in press).
5. Schreiber AB, Haimovich J. Quantitative fluorometric assay for detection and characterization of Fc receptors. *Methods Enzymol.* 1983; **93**: 147–155.
6. Twining SS. Fluorescein isothiocyanate-labelled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.* 1984; **143**: 30–34.

Fluorescent *in situ* hybridization technique applied to the identification of bacteria from activated sludge samples

M. Figueroa, J. R. Vázquez-Padín, J. L. Campos, R. Méndez and A. Mosquera-Corral*

Department of Chemical Engineering, School of Engineering,

Rua Lope Gómez de Marzoa s/n, University of Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain. *E-mail address: eqanusmc@usc.es

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique is an ideal method for selective detection of a particular organism in a mixture with others. The FISH technique, based on the use of fluorescently labelled rRNA-targeted nucleic acid probes which target specific regions of the 16S rRNA sequence, can be used to directly identify microorganisms within complex samples from environment and wastewater treatment plants in a few hours and therefore has widespread application in environmental technology (1).

Nowadays the identification of the different populations present in activated sludge systems operating in wastewater treatment plants is increasing in interest. Gaining knowledge about the microorganisms present in these systems allows better understanding of the performance of these biological processes at macroscopic level. The development of new techniques to fulfil this objective, easy to handle by engineers, is then an important issue. The FISH technique combines the simplicity of its analytical procedure with the specificity of the selected probes in order to characterize the biomass present in an operating reactor, and for this reason its use is increasing in popularity. Different probes have been developed to identify the main populations involved in the organic matter and nutrients removal processes from wastewater, based on phylogenetic studies (2).

The FISH procedure used in this work has been developed by Amann (3) and includes four steps: fixation and permeabilization of the sample; hybridization of the target sequence to the probe; washing steps to remove unbound probe; and the detection of labelled cells by epifluorescence microscopy. Biomass samples were either disaggregated or the granules were cut with a cryotome (Cryocut 1800) in slices of 25 µm. The oligonucleotide probes used are listed in Table 1. The fluorochromes labelling the probes were fluorescein (FITC, green colour) and carbocyanine (Cy3, red colour). The positive targeting is visualized by an epifluorescence microscope (Axioskop 2 plus, Zeiss) in combination with a digital camera (Coolsnap, Roper Scientific Photometrics). Sliced samples were observed under a confocal laser scanning microscope.

In the present work the FISH technique has been applied to granular biomass samples collected from aerobic reactors to detect different bacteria involved in nitrogen removal processes for four different purposes (Fig. 1), which are described with examples as follows:

- A. *To identify specific populations.* A positive target was detected for populations belonging to the nitrite oxidizing bacteria (probes: EUB338, Ntspa712). Results from the FISH analysis correlated with the macroscopic observation

Table 1. Oligonucleotide probes used

Probe	Specificity	Formamide (%)	References
EUB338	Bacteria domain	35	Amann <i>et al.</i> (4)
NEU653 and competitor	Most halophilic and halotolerant <i>Nitrosomonas</i> spp.	40	Wagner <i>et al.</i> (5)
Nsm156	<i>Nitrosomonas</i> spp. and <i>Nitrosococcus mobilis</i>	5	Mobarry <i>et al.</i> (6)
Ntspa712 and competitor	Most members of the phylum Nitrospirae	35	Daims <i>et al.</i> (7)

ORIGINAL ARTICLE

Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13

J.M. Ageitos, J.A. Vallejo, A.B.F. Sestelo, M. Poza and T.G. Villa

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Keywords

Bacillus licheniformis, caseinolytic activity, dairy industry, milk clotting, serine protease.

Correspondence

Tomás González Villa, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, Campus Sur 15782, Santiago de Compostela, Spain. E-mail: mpvilla@usc.es

2006/1603: received 17 November 2006, revised 12 February 2007 and accepted 2 May 2007

doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03460.x

Abstract

Aim: The study of a milk-clotting protease secreted by *Bacillus licheniformis* strain USC13.

Methods and Results: Growth of *B. licheniformis* USC13 in LB medium resulted in the production of a serine protease with a molecular weight of 62 kDa processed to its mature form of 34 kDa, both forms were found in the extracellular medium. The enzyme exhibited typical milk-clotting kinetics.

Conclusions: The capacity of this protease to produce milk curds could make it useful as a new source of milk coagulants.

Significance and Impact of the Study: Cheese-making industry seeks for novel enzyme sources, and microbial coagulants have several advantages over animal and plant counterparts. The protease from *B. licheniformis* has the ability to produce milk curds although more studies about quality of both the enzyme and the milk curds formed should be carried out in the future to confirm its usefulness in the dairy industry.

Introduction

Proteases are lytic enzymes that act on other proteins. Additionally, they are possibly the most important group of enzymes as far as industrial applications are concerned (Rao *et al.* 1998). Proteases combine their effects with their specificity as they normally act on a narrow number of substrates at a given salt concentration and specific pH values (Gupta *et al.* 2002). The genus *Bacillus* has been studied in considerable depth, showing that more than 90% of the species are catalase-positive, endospore-forming and motile Gram-positive rods (Holt *et al.* 1994). The ability of *Bacillus* strains to produce and secrete large quantities (20–25 g l⁻¹) of extracellular enzymes has placed them among the most important industrial enzyme producers (Schallmey *et al.* 2004). In industry, *B. licheniformis* is used for the production of proteases or α -amylase (Rao *et al.* 1998). These hydrolases play an important role during vegetative growth and other phenomena occurring during the bacterium's cell cycle. The requirement of proteases for sporulation has been demonstrated by the use of protease inhibitors (Rao *et al.* 1998). Caseins

are a family of phosphoproteins (α_{S1} , α_{S2} , β , κ) that account for nearly 80% of bovine milk proteins (Lucey *et al.* 2003) and such proteins form colloidal aggregates because of the κ -casein molecules that stabilize the micellar structure. Milk-clotting proteases act on the soluble portion, κ -casein, thus originating an unstable micellar state that results in clot formation (Vasbinder *et al.* 2003). Chymosin (E.C. 3.4.23.4) is an aspartic protease that specifically hydrolyses the peptide bond in Phe₁₀₅–Met₁₀₆ of κ -casein and is considered to be the most efficient protease in the cheese-making industry (Rao *et al.* 1998). However, there are other proteases with milk-clotting activities that cleave other bonds in the κ -casein chain (Esteves *et al.* 2003). This allows the manufacture of different cheeses with a variety of rheological and organoleptic properties (Silva and Malcata 2005; Ageitos *et al.* 2006). Ever since the beginning of milk processing by humankind, gastric enzymes from animals were routinely used. Depending on the kind of animal present in the area, different types of coagulating enzymes were employed. Over the years, this practice has led to different rheological and organoleptic properties. Microbial enzymes, however, have some

advantages over those obtained from plants or animals (Poza *et al.* 2003). Such advantages are: (i) they are cheaper to produce, (ii) they show greater biochemical diversity and (iii) their genetic modification is easier. These microbial proteases represent 40% of the world enzyme market (Rao *et al.* 1998). Most commercial proteases, mainly neutral or alkaline, are produced by organisms belonging to the genus *Bacillus*. *Bacillus* secretes several proteases during the exponential phase of growth, all of which have been cloned and characterized (Rao *et al.* 1998). Most of them have been characterized as serine, cysteine or metalloproteases and there is only one aspartic protease that has been described in *B. licheniformis*, although it was characterized as an atypical aspartic protease (Carroll and Setlow 2005; Poza *et al.* in press). The recently sequenced genome of *B. licheniformis* (Rey *et al.* 2004; Veith *et al.* 2004) revealed 296 proteins with N-terminal signal peptides for secretion from the cytoplasm. Most of these signal peptides direct proteins to the Sec secretion machinery (Voigt *et al.* 2006). This paper describes the isolation and characterization of a protease secreted by *B. licheniformis* strain USC13 that was isolated in this laboratory in a routine survey for milk-clotting microorganisms.

Materials and methods

Strains, media and culture conditions

Strain USC13 was cultured in a rotary shaker at 180 rev min⁻¹ and 37°C. The normal growth medium was LB (tryptone 10 g l⁻¹, yeast extract 5 g l⁻¹, NaCl 10 g l⁻¹ and agar 2% when solid medium was needed). However, the strain was grown in minimal medium (glucose 20 g l⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 10 g l⁻¹, urea 3 g l⁻¹, KH₂PO₄ 1 g l⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.41 g l⁻¹, FeSO₄·4H₂O 2 mg l⁻¹, MnSO₄·4H₂O 2 mg l⁻¹ and NaCl 50 mg l⁻¹) for evaluating the need of a protein source for protease production.

Growth and enzyme production curves

LB medium (1 l) was inoculated with 10 ml of a stationary phase of growth culture of *B. licheniformis* USC13. Hundred millilitres of samples were withdrawn over nine consecutive days, the pH measured, and the samples were centrifuged for 15 min at 4°C and 15 000 g. The supernatant was subsequently filtered through 0.22 µm GSWP nitrocellulose membranes (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and the filtrate was frozen at -20°C until further needed. During these 9 days, 100 µl serial dilutions of each sample were

inoculated in petri dishes with LB agar medium and incubated at 37°C for 24 h. Optical density was estimated at 600 nm with DU-40 spectrophotometer (Beckman Instruments, Inc., Irvine, CA, USA).

Production of the milk-clotting enzyme in a pilot plant fermentation unit

Fermentation was carried out in a Biostat C 30-l fermenter (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany), using 20 l of LB medium. The medium was sterilized *in situ* at 121°C for 30 min with gentle stirring, following the manufacturer's instructions. Controls were performed to evaluate the success of sterilization of the noninoculated media and to check for contamination. The inoculum consisted of 3 l of a shake-flask culture in such a manner that an initial cellular density of 10⁵ cells per millilitre was achieved. Fermentation was started with an air flow of 5 l min⁻¹ at pH 7.0 and a stirring speed of 300 rev min⁻¹ at 37°C. Addition of the anti-foam product (B. Braun Biotech International) was controlled automatically. The air flow and the stirring were increased as the biological oxygen demand increased. Samples were removed over 24 h in order to determine pH, cell density and enzymatic activity. The cells were then harvested using a high-speed continuous-flow centrifuge CEPA Model GLE (New Brunswick Scientific CO. Inc., Edison, NJ, USA).

Fluorescein thiocarbamoyl-κ-casein assays

These assays were carried out to test κ-caseinolytic activity of the enzymatic samples as described by Ageitos *et al.* (2006). One enzymatic unit was defined as the amount of enzyme necessary to degrade 1 µg of fluorescein thiocarbamoyl-κ-casein (FTC-κ-casein) in 1 h at 37°C.

Milk-clotting assays

These assays were performed to test milk clotting using powdered skimmed milk (Central Lechera Asturiana, Siero, Spain) reconstituted at 26% (w/v) in 0.01 mol l⁻¹ potassium phosphate buffer, pH 6.0, as substrate. The enzyme reactions were carried out in test tubes with 200 µl of enzyme solution and 200 µl of substrate. The milk clots were visualized by turning the tubes upside down. In order to evaluate the activity of this enzyme, several milk curds assays were prepared. Coagulations were carried out in 250 ml of milk to which 5 ml of enzyme preparation was added at 37°C. The enzymatic samples tested were: (i) 10-fold-concentrated crude enzyme and (ii) partially purified enzyme (60% ammonium sulfate-precipitated). Curds were elaborated with

reconstituted powdered skimmed milk (Central Lechera Asturiana) and both cow and buffalo milks.

Determination of kinetic parameters

Michaelis–Menten plots (Dixon and Webb 1979) were performed, increasing substrate concentrations as described by Ageitos *et al.* (2006). The V_{\max} and K_m values of the enzymatic samples were obtained using the Lineweaver-Burk method (Dixon and Webb 1979).

Inhibition assays

Enzymatic samples were subjected to inhibition studies using several protease inhibitors (Croux *et al.* 1990; Rao *et al.* 1998; Ageitos *et al.* 2006), including 0.001 mol l^{-1} pepstatin A, 0.001 mol l^{-1} dithiothreitol (DTT), 0.001 mol l^{-1} phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), all from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and 0.001 mol l^{-1} ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) from Merck (Darmstadt, Germany).

Determination of optimal temperature and pH

The enzymatic reactions were subjected to different incubation temperatures (from 20 to 50°C) during 30 min. In addition, the enzymatic reactions were carried out at different pH values (from 4.0 to 8.0) during 30 min. The different buffers were 0.01 mol l^{-1} potassium phosphate and 0.01 mol l^{-1} Tris-HCl for ranges of 4.0–6.0 and 6.0–8.0, respectively. Enzymatic activity was measured as described before.

Cellular location of the enzyme

Bacillus licheniformis strain USC13 was grown in shake flasks (180 rev min^{-1}) for at least 5 days in 1 l of LB at 37°C. The cells were then harvested and divided into two identical portions as described by Villa *et al.* (1975). One portion was centrifuged, re-suspended in 30 ml of 0.001 mol l^{-1} KH_2PO_4 (pH 7.6), and the cells were disrupted at 4000 rev min^{-1} for 3 min in a CO_2 -cooled cell homogenizer (Braun MSK, Melsungen, Germany) in the presence of 0.1-mm glass beads. Cellular debris was removed by centrifugation for 10 min at 4°C and 7000 g and the specific proteolytic activity present in the supernatant was evaluated. Cells from the other portion were re-suspended in 0.1 mol l^{-1} HCl and incubated for 1 h at 18°C. Subsequently, the cells were washed and resuspended in the same buffer and homogenized. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as the intracellular marker in both HCl-treated and nontreated portions (Gacto 1973). Finally, the enzymatic extracts were tested

for milk-clotting activity and subjected to the FTC- κ -casein assay.

Preparation of semi-purified enzymatic samples

Cultures of 2 l were prepared in 5 l flasks. After 5 days, the cells were spun down by centrifugation for 15 min at 4°C and 15 000 g and the supernatant was filtered through $0.22 \mu\text{m}$ GSWP nitrocellulose membranes (Millipore Corporation). Samples were concentrated tenfold in an Amicon (Millipore Corporation) device harbouring 10 K factor membranes. The concentrate was precipitated with 60% ammonium sulfate and finally dialysed against 0.01 mol l^{-1} potassium phosphate buffer, pH 6.0, at 4°C. The final samples were then used for isoelectrofocusing and anion exchange chromatography.

Isoelectrofocusing

Partially purified enzymatic samples obtained from ammonium sulfate precipitation were subjected to isoelectrofocusing using a Rotofor device (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) at 4°C. A pH gradient (3.0–10.0) was implemented using 2% ampholites (Bio-Rad Laboratories Inc.) at 500 V. Samples were finally collected and pH and protein concentration values were determined by Bradford's method (1976). The fractions were then dialysed against 0.01 mol l^{-1} potassium phosphate buffer (pH 6.0) and evaluated for enzyme activity according to Ageitos *et al.* (2006).

Anion exchange chromatography

The enzymatic samples obtained after ammonium sulfate precipitation and dialysis were also subjected to DEAE-Biogel A (Bio-Rad Laboratories Inc.) anion exchange chromatography ($38 \times 3.5 \text{ cm}$ column), where the column had previously been equilibrated with 0.01 mol l^{-1} potassium phosphate buffer (pH 6.0). Proteins were subsequently eluted using a NaCl gradient (0.1 mol l^{-1}) in the same buffer at a flow rate of 0.5 ml min^{-1} . Fractions of 4 ml were collected and evaluated for protease activity as before. Fractions showing activity were again concentrated with the Amicon device.

Molecular exclusion chromatography

Three millilitres of the enzymatic samples obtained after anion exchange chromatography was subjected to gel exclusion chromatography. The column ($80 \times 35 \text{ cm}$) was packed with Sephacryl S-200 (Bio-Rad Laboratories Inc.)

and equilibrated with 0.01 mol l⁻¹ potassium phosphate buffer (pH 6.0). The dead volume was measured according to the elution profile of blue dextran. The elution rate was 0.5 ml min⁻¹ and the 5 ml fractions collected were monitored at 280 nm. Aldolase (158 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), egg albumin (45 kDa), chymotrypsinogen (25 kDa) and lysozyme (14 kDa) (Sigma-Aldrich) were employed as molecular markers. The molecular weight of the enzyme was calculated as described by Whitaker (1963).

SDS-PAGE

Polyacrylamide gel electrophoresis was accomplished according to Laemmli (1970) in a miniProtean-III cell (Bio-Rad Laboratories Inc.).

Protein sequence analyses

Samples were subjected to trypsin digestion to obtain peptide fingerprinting. The peptide map was obtained by means of matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. This work was carried out at the Proteomics Service of the University of Santiago de Compostela (Spain). The peptident program EXPASY was used for database searches. The sequences obtained were analysed with the Vector NTI 9.0.0 (Infomax Inc., Bethesda, MD, USA) program.

Results

Morphology of the isolated strain

The strain isolated consisted of Gram-positive, rod-shaped cells. Cells from overnight cultures seemed to appear singly, in pairs, or occasionally in chains. After 24 h, they produced subterminal ellipsoidal spores in swollen sporangia. The flagellum insertion point was in a subpolar position. The colonies exhibited an irregular shape, with nondefined margins and the presence of gas vesicles.

Microbial growth and enzyme production

The strain USC13 showed milk-clotting activity when grown in LB medium. No activity was found in minimal medium with glucose as the sole carbon source. Consequently, both cell grown and enzyme production curves were performed in LB medium (Fig. 1a). Maximum enzyme production was obtained after 6 days of inoculation and the pH of the medium increased during the fermentation.

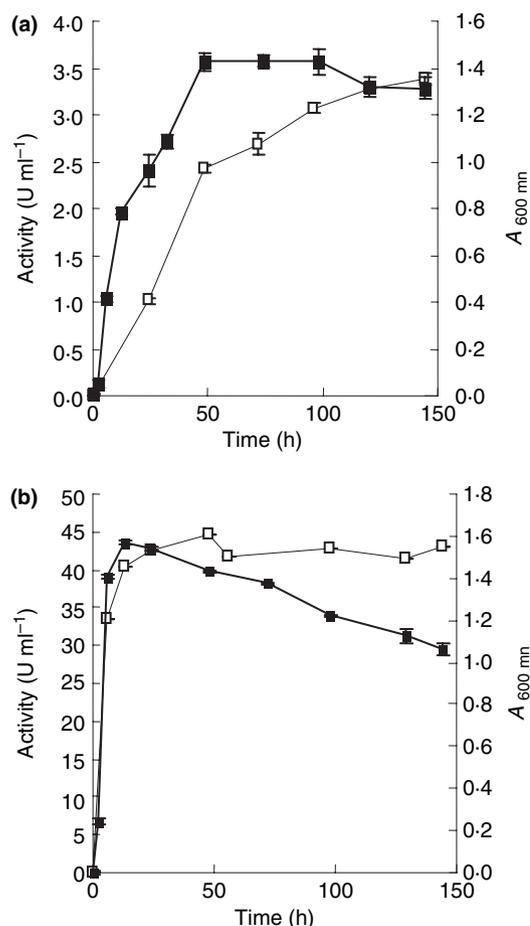


Figure 1 Growth and enzyme production curves of *Bacillus licheniformis* USC13 in shake flasks (a) and in a 30-l fermenter (b). Enzymatic activity (□) and optical density of cultures (●).

Enzyme production in a 30-l fermenter

The strain was grown in LB medium in a 30-l fermenter. Maximum activity was obtained after 48 h of growth in the fermenter (Fig. 1b).

Table 1 Effect of inhibitors on the enzyme activity of samples from *Bacillus licheniformis* USC13

Inhibitor*	Concentration	Residual activity (%)
Control	0	100 ± 0.45
Control with ethanol	10 µl ml ⁻¹	95.62 ± 0.49
PMSF	0.001 mol l ⁻¹	0 ± 0.54
DTT	0.001 mol l ⁻¹	109.02 ± 0.72
EDTA	0.001 mol l ⁻¹	93.60 ± 0.91
Pepstatin A	1 µg ml ⁻¹	99.73 ± 0.61

*Inhibitor: PMSF, Phenylmethylsulfonyl fluoride; DTT, Dithiothreitol; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid.

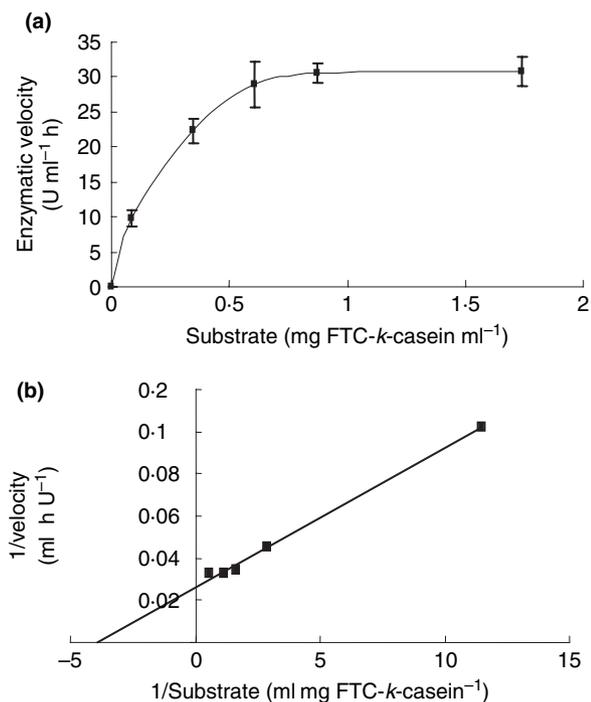


Figure 2 (a) Effect of substrate concentration on the enzymatic activity of samples from *Bacillus licheniformis* USC13. (b) Lineweaver-Burk plot of the enzymatic samples from *B. licheniformis* USC13. ($Y = 0.007X + 0.026$; $R_2 = 0.996$) (■). Error bars correspond to standard deviations from triplicate replicas.

Determination of the type of enzyme

In order to determine the type of milk-clotting protease produced by *B. licheniformis* USC13, inhibition experiments with different protease inhibitors were conducted; the results are summarized in Table 1.

K_m and V_{max} determinations

As shown in Fig. 2a, the activity of the enzymatic sample was measured in the presence of increasing concentrations of substrate. The V_{max} and K_m were 38.61 U ml⁻¹ h and 0.26 mg FTC- κ -casein per millilitre, respectively (Fig. 2b).

Enzyme purification

Enzyme purification was accomplished with ammonium sulfate precipitation; maximum precipitation occurred at 60% of saturation and the precipitate was employed to perform the next purification steps. An active fraction with a pI of 9.2 was obtained from isoelectrofocusing. This fraction, which showed κ -caseinolytic activity, was subjected to SDS-PAGE, obtaining a band of 62 kDa (Fig. 3a). When ammonium sulfate-precipitated samples were subjected to anion exchange chromatography, an active fraction was obtained. This fraction revealed several bands by SDS-PAGE, the 62-kDa band being the major one (Fig. 3b). The active fraction obtained from anion exchange chromatography was also subjected to gel exclusion chromatography, where two active peaks of c. 60 and 35 kDa, respectively, were obtained. When c. 60-kDa active fraction was analysed by SDS-PAGE, a band of 62 kDa was obtained, as expected; however, several bands of lower molecular weight also appeared; among them, a 34-kDa band proved to be the major one (Fig. 3c). In turn, c. 35-kDa active fraction obtained from gel exclusion chromatography was also analysed by SDS-PAGE; as expected, a band of 34 kDa appeared (Fig. 3a).

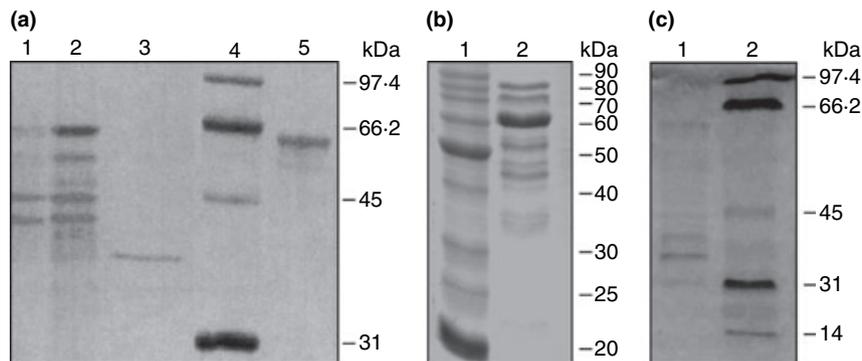


Figure 3 SDS-PAGE of different enzymatic samples from *Bacillus licheniformis* USC13. (a) Lane 1: Concentrated enzymatic culture supernatant. Lane 2: Enzymatic sample from culture supernatant ammonium sulfate concentrated. Lane 3: Enzymatic sample obtained from the c. 35-kDa active fraction with gel exclusion chromatography. Lane 4: Molecular weight marker. Lane 5: Enzymatic sample from the pI = 9.2 fraction after isoelectrofocusing. (b) Lane 1: Molecular weight marker. Lane 2: Enzymatic sample obtained from anion exchange chromatography. (c) Lane 1: Enzymatic sample obtained from the c. 60-kDa active fraction from gel exclusion chromatography. Lane 2: Molecular weight marker.

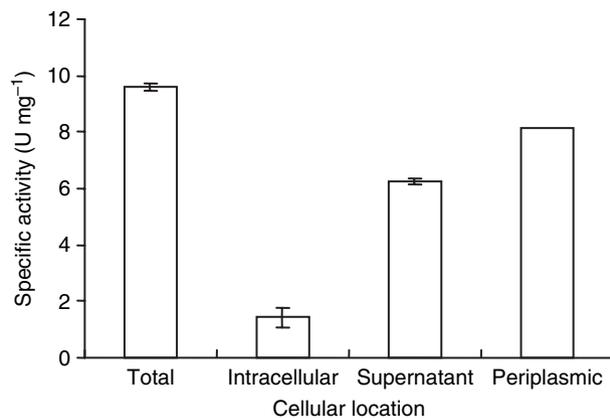


Figure 4 Cellular location of the protease activity from *Bacillus licheniformis* USC13. Error bars correspond to standard deviations from triplicate replicas.

Cellular location of the enzyme

From Fig. 4, about 85% of the total cell κ -caseinolytic activity was located outside the plasma membrane and only a minor proportion was intracellular. Additionally, *B. licheniformis* USC13 forms a mucilaginous substance, which eventually, becomes insoluble; and thus difficult to the enzyme purification. Finally, it was observed that crude enzymatic samples increased their activity with storage.

Optimal temperature and pH

The highest activity for the 62-kDa protease was obtained at pH 7.5 and 37°C and the 34-kDa protease showed an optimum at pH 6 and 30°C (Fig. 5).

Milk-curd analysis

The crude enzyme preparations afforded brownish semi-degraded curds with an unpleasant aroma. Once the enzyme had been precipitated with ammonium sulfate, this generating an enrichment in the 62-kDa band (Fig. 3a), the curds were white, firm and odourless (Fig. 6). In order to investigate the stability of the curds, some of them were maintained in the presence of the milk serum for as long as 72 h and at the end of this time they were just as firm as at the beginning.

Discussion

The characteristics of both the cells and colonies of the isolated strain USC13 matched those belonging to *B. licheniformis* (Holt *et al.* 1994). *Bacillus licheniformis* strain USC13 did not show any milk-clotting activity when grown in minimal medium without protein source and

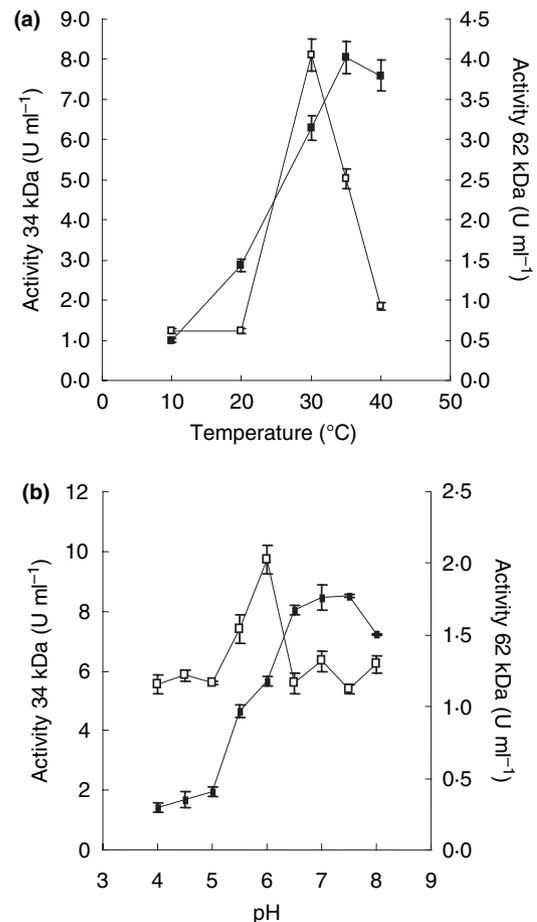


Figure 5 (a) Effect of temperature on enzymatic activity of protease samples obtained from *Bacillus licheniformis* USC13. (b) Effect of pH on enzymatic activity of protease 21 samples obtained from *B. licheniformis* USC13. Sample (34 kDa) (□). Sample (62 kDa) (■). Error bars correspond to standard deviations from triplicate replicas.

with glucose as the sole carbon source, suggesting catabolic repression by glucose. The strain showed its maximum activity after 6 days of inoculation and the pH values increased during those days because of proteolysis and the release of ammonium (Kumar and Takagi 1999). Voigt *et al.* (2006) reported that in *B. licheniformis*, many degradative extracellular enzymes are secreted at low levels during the exponential growth phase and are induced in the stationary phase and the protein secretion is higher in complex medium as compared with cells grown in minimal medium. The growth curve in the fermenter was similar to that obtained with the shake flasks, except that the stationary phase, and consequently the enzyme production, both occurred earlier. Hence, the fermentation technology allows enzyme production to be shortened by threefold. From Table 1, the enzyme was blocked by PMSF, suggesting that it belongs to a serine protease

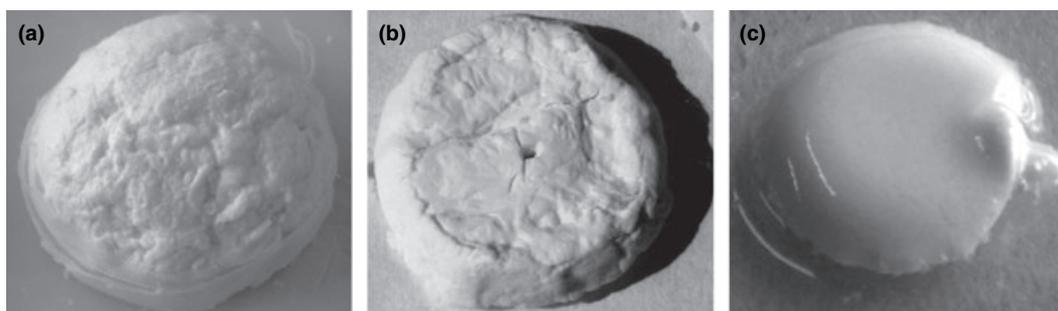


Figure 6 Milk curds obtained from ammonium sulfate-precipitated enzymatic samples from *B. licheniformis* USC13. (a) Buffalo milk. (b) Cow's milk. (c) Powdered skimmed milk.

group; in agreement with the data reported for *B. licheniformis*, as no typical milk-clotting aspartic protease was found in *Bacillus* (Rey *et al.* 2004; Veith *et al.* 2004). Because micellar aggregation during the milk-clotting process is cooperative (Silva and Malcata 2005), the classic milk-clotting assay does not perform well in kinetic studies (Ageitos *et al.* 2006); the lower the substrate concentrations are, the more difficult the flocculation occurs (Carlson *et al.* 1987a). The plots revealed that the kinetic reaction produced by the protease of *B. licheniformis* USC13 matched classic milk-clotting kinetics (Carlson *et al.* 1987b). No inhibition effect because of an excess of substrate was detected, even at high concentrations of substrate and under the conditions described. The K_m value obtained revealed that this protease exhibits high affinity towards the substrate, as it happens with other microbial milk-clotting proteases (Ageitos *et al.* 2006). Additionally, the V_{max} value reveals that the enzyme has high κ -caseinolytic activity, but regardless of milk-clotting, this occurred at low rate. This latter aspect may be because simultaneous acidification does not occur in this type of protease, although it does in aspartic proteases (Rao *et al.* 1998). Data obtained from isoelectrofocusing, SDS-PAGE and chromatographic assays point towards some type of processing of the 62-kDa protease that generates forms of different molecular weight, as described by Sloma *et al.* (1988) for the Epr serine protease produced by *Bacillus*. *Bacillus licheniformis* largely resembles *B. subtilis*, up to 84% of genetic homology (Rey *et al.* 2004) and hence so do the proteases from both bacterial species. Two types of extracellular proteases are known in *B. subtilis* (Choi *et al.* 2005): a group of four serine proteases (Bpf, Epr, Vpr and Wpr) and another group of two neutral metalloproteases (NpdrB and PepT). Studies on the sequence of *B. licheniformis* DMS13 have reported the Epr, Vpr, HtrA, ISpA, YutA, ClpPs and YyX proteases as serine proteases. The results obtained here suggest that the milk-clotting enzyme could correspond to the previously described Vpr or Epr proteases. Protease Vpr from

B. subtilis is a serine protease that, during processing, normally varies from 94 to 65 kDa although forms of even only 28.5 kDa have also been reported (Sloma *et al.* 1991). The band of 62 kDa reported here could be the mature form Vpr, however, the previously described pI for this protease (Choi *et al.* 2005) did not match our results. Additionally, the peptide mass finger printing (PMF) of the 62-kDa band obtained here did not match the PMF for the preproVpr described by Kho *et al.* (2005) or any other PMF pattern found in databases. The same occurred with the 34-kDa band. In *B. licheniformis*, the Epr protease has a calculated initial molecular mass of 62.7 kDa; whereas the same protein in *B. subtilis* exhibits a molecular mass of 69.7 kDa that falls to 40.3 kDa after its processing (Sloma *et al.* 1988; Choi *et al.* 2005). Analysis of the sequence data of *B. licheniformis* ATCC 14580 points that the 62 kDa described here could be the non-processed Epr protease, with a calculated mass of 62.8 kDa and a pI of 10.2. Additionally, Voigt *et al.* (2006) described an extracellular protease with the same molecular mass and pI. However, they failed to find 62-kDa protease when the *B. licheniformis* strain was grown in LB medium. This could be due to processing of the 62 kDa in LB to an active mature protease of 34 kDa, which is in agreement with our results, although we found both forms in *B. licheniformis* USC13. Similarly, expression studies of this enzyme in *Escherichia coli* (Sloma *et al.* 1988) disclosed bands of 69, 38 and 34 kDa. As it is well established in *B. subtilis* that preproteases preserve their catalytic activity (Kho *et al.* 2005), it may be concluded that the present 62-kDa protease must correspond to the proEpr protein that is released during the sporulation process, the 34 kDa form being the mature Epr enzyme. It has been described that *B. subtilis* shows a periplasmic space similar to that of Gram-positive bacteria (Merchant *et al.* 1995) and it may further be assumed that *B. licheniformis* would have the same properties. Most serine proteases from *B. licheniformis* have been described as extracellular enzymes. As the Epr

protease exhibits a Sec secretion signal (Voigt *et al.* 2006), this could account for the cellular location reported here. *Bacillus licheniformis* USC13 forms a mucilaginous substance that eventually becomes insoluble, thus arresting several proteins, including the protease. Additionally, the enzymatic samples increased their activity with storage, this again suggesting that the protease would be released during sporulation and the increase in enzyme activity would precisely be due to enzyme processing. Because milk clotting may take place owing to changes in pH and temperature without the participation of enzymes, these tests were carried out by evaluating residual protease activity using the FTC- κ -casein method described by Ageitos *et al.* (2006). The inhibition data gathered here revealed that the milk-clotting activity present in the supernatant of *B. licheniformis* USC13 is due to a serine protease. The average size of the enzyme was 62 kDa but this value decreased to 34 kDa as the enzyme was further purified. All the data suggested that the heavier form was the proEpr protease released during sporulation and the lighter form was in fact the mature protease. Finally, the ability of this protease to produce milk curds could make it useful as a new source of milk-clotting enzyme; although, more studies on the quality of the milk curds obtained should be performed to confirm its usefulness in the dairy industry.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (Grant no. AGL2001-2992) and Xunta de Galicia (Grant no. PGIDIT02PXIC20302PN). The authors wish to express their gratitude to the School of Biotechnology of the University of Santiago de Compostela for the support shown throughout.

References

- Ageitos, J.M., Vallejo, V.A., Poza, M. and Villa, T.G. (2006) Fluorescein thiocarbamoyl- κ -casein assay for the specific testing of milk-clotting proteases. *J Dairy Sci* **89**, 3770–3777.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Carlson, A., Hill, C.G. Jr and Olson, N.F. (1987a) Kinetics of milk coagulation: II. Kinetics of the secondary phase. Micelle flocculation. *Biotechnol Bioeng* **29**, 590–600.
- Carlson, A., Hill, C.G. Jr and Olson, N.F. (1987b) Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of κ casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation. *Biotechnol Bioeng* **29**, 582–589.
- Carroll, T.M. and Setlow, P. (2005) Site-directed mutagenesis and structural studies suggest that the germination protease, GPR, in spores of *Bacillus* species is an atypical aspartic acid protease. *J Bacteriol* **187**, 7119–7125.
- Choi, N.-S., Chung, D.-M., Ryu, C.H., Yoon, K.-S., Maeng, P.J. and Kim, S.-H. (2005) Identification of three extracellular proteases from *Bacillus subtilis* KCTC 3014. *J Microbiol Biotechnol* **16**, 456–464.
- Croux, C., Paquet, V., Goma, G. and Soucaille, P. (1990) Purification and characterization of acidolysin, an acidic metalloprotease produced by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* **56**, 3634–3642.
- Dixon, M. and Webb, E.C. (1979) *Enzymes*, 3rd edn. New York: Academic Press.
- Esteves, C.L.C., Lucey, J.A., Wang, T. and Pires, E.M.V. (2003) Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *J Dairy Sci* **86**, 2558–2567.
- Gacto, M. (1973) *Hydrolases from yeast*. PhD Dissertation, University of Salamanca, Salamanca University Press, Spain.
- Gupta, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P. (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**, 15–32.
- Holt, J.C., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994) *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Williams Co.
- Kho, C.W., Park, S.G., Cho, S., Lee, D.H., Myung, P.K. and Park, B.C. (2005) Confirmation of Vpr as fibrinolytic enzyme present in extracellular proteins of *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif* **39**, 1–7.
- Kumar, G.G. and Takagi, H. (1999) Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv* **7**, 561–594.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–695.
- Lucey, J.A., Johnson, M.E. and Horne, D.S. (2003) Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *J Dairy Sci* **86**, 2725–2743.
- Merchante, R., Pooley, H.M. and Kamatara, D. (1995) A periplasm in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**, 6176–6183.
- Poza, M., Sieiro, C., Carreira, L., Barros-Velázquez, J. and Villa, T.G. (2003) Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 422. *J Ind Microbiol Biotechnol* **30**, 691–698.
- Poza, M., Ageitos, J.M., Vallejo, J.A., de Miguel, T., Veiga-Crespo, P. and Villa, T.G. (in press) Industrial applications of microbial proteases and genetic engineering. In *Hot Spots in Applied Microbiology* ed. Poza Domínguez, M. and González Villa, T. Trivandrum: Research Signpost.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 597–635.

- Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J, Tang, M., Lopez de Leon, A., Xiang, H., *et al.* (2004) Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol* **5**, R77.
- Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O.P. (2004) Developments in the use of *Bacillus* species in industrial production. *Can J Microbiol* **50**, 1–17.
- Silva, S.V. and Malcata, F.X. (2005) Partial identification of water-soluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: influence of type of coagulant and starter. *J Dairy Sci* **88**, 1947–1954.
- Sloma, A., Ally, A., Ally, D. and Pero, J. (1988) Gene encoding a minor extracellular protease in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **170**, 5557–5563.
- Sloma, A., Rufo, G.A. Jr, Theriault, K.A., Dwyer, M., Wilson, S.W. and Pero, J. (1991) Cloning and characterization of the gene for an additional extracellular serine protease of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **173**, 6889–6895.
- Vasbinder, A.J., Rollema, H.S., Bot, A. and de Kruif, C.G. (2003) Gelation mechanism of milk as influenced by temperature and pH; studied by the use of transglutaminase cross-linked casein micelles. *J Dairy Sci* **86**, 1556–1563.
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K.H., Ehrenreich, P., Baumer, S., Henne, A., *et al.* (2004) The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**, 204–211.
- Villa, T.G., Notario, V. and Villanueva, J.R. (1975) β -Glucanases of the yeast *Pichia polymorpha*. *Arch Microbiol* **104**, 201–206.
- Voigt, B., Schweder, T., Sibbald, M.J.J.B., Albrecht, D., Ehrenreich, A., Bernhardt, J., Feesche, J., Maurer, K.H., *et al.* (2006) The extracellular proteome of *Bacillus licheniformis* grown in different media under different nutrient starvation conditions. *Proteomics* **6**, 268–281.
- Whitaker, J.R. (1963) Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal Chem* **35**, 1950–1956.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 303 760**

② Número de solicitud: 200600873

⑤ Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **24.03.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2008**

Fecha de la concesión: **21.07.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **11.09.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
11.09.2009

⑰ Titular/es:

**Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS-Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **Ageitos Martínez, José Manuel;
Vallejo Vidal, Juan Andrés;
Poza Domínguez, Margarita y
González Villa, Tomás**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Método analítico para la medida de la actividad κ -caseinolítica de enzimas.**

㉒ Resumen:

Método analítico para la medida de la actividad κ -caseinolítica de enzimas de interés en la industria quesera y en la investigación biológica. Se basa en la medición de la cantidad de κ -caseína degradada, marcada con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína. El método comprende las siguientes etapas: 1) Elaboración del sustrato, FTC- κ -caseína, por unión de isotiocianato de fluoresceína a κ -caseína. 2) Incubación de una muestra enzimática en presencia de FTC- κ -caseína con el tampón adecuado para la enzima. 3) La reacción se detiene por adición de tricloroacético (TCA). 4) La fluorescencia emitida se obtiene midiendo una alícuota del producto de la reacción empleando un fluorímetro. 5) Los valores de actividad se extraen a partir de la ecuación de una recta patrón que relaciona la fluorescencia con la cantidad de κ -caseína degradada.

ES 2 303 760 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método analítico para la medida de la actividad κ -caseinolítica de enzimas.

5 El método permite detectar y cuantificar la actividad κ -caseinolítica de enzimas de interés en la industria quesera y en la investigación biológica. Las enzimas que producen la coagulación de la leche y que, por tanto, permiten obtener masas queseras, son aquellas proteasas que actúan sobre la κ -caseína de la leche. El método se basa en la medición de la cantidad de κ -caseína degradada. La κ -caseína es marcada con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína. El método es preciso y permite determinar el grado de purificación de las proteasas a partir de mezclas enzimáticas de origen animal, vegetal, microbiano y recombinante. Debido a su sensibilidad es útil para la caracterización y purificación de enzimas con capacidad κ -caseinolítica.

Estado de la técnica

15 Las caseínas constituyen una familia de fosfoproteínas (α_1 , α_2 , β , κ) que forman casi el 80% de las proteínas de la leche bovina (Lucey *et al.*, 2003, *J. Dairy Sci.* 86:2725-2743). Son proteínas que se encuentran en la leche formando micelas solubles. La solubilidad de las micelas se debe a las moléculas de κ -caseína, que recubren y estabilizan la estructura.

20 Básicamente, existen tres modelos que intentan explicar la disposición espacial de las caseínas en las micelas (Dalglish, 1998, *J Dairy Sci.* 81:3013-3018). Uno de ellos propone que el núcleo de las micelas está compuesto por multitud de submicelas y que la periferia consiste en microvellosidades de κ -caseína (Walstra, 1970, *J. Dairy Res.* 46:317-322; Lucey, 2002, *J. Dairy Sci.* 85:281-294). Otro de los modelos sugiere que el núcleo está formado por fibras de caseína interconexionadas (Holtz, 1992, *Adv. Protein Chem.* 43:51-63). Finalmente, el modelo más reciente (Home, 1998, *Internat. Dairy J.* 8:171-177), propone una doble conexión entre las caseínas que hace que las micelas sean estables. Los tres modelos consideran las micelas de la leche como partículas coloidales formadas por agregados y recubiertas por las moléculas solubles de κ -caseína.

30 El proceso de coagulación de la leche consiste principalmente en tres fases (Carlson, *et al.*, 1987, *Biotechnol. Bioeng.* 29:582-589): i) la degradación enzimática de la κ -caseína, ii) la floculación de las micelas, y iii) la formación del gel. Cada una de las fases sigue una cinética diferente, siendo la degradación de la κ -caseína la fase limitante en el proceso de coagulación de la leche. El proceso entero está influenciado por factores físico-químicos, tales como el pH o la temperatura (Esteves *et al.*, 2003, *J. Dairy Sci.* 86:2558-2567; Vasbinder *et al.*, 2003, *J. Dairy Sci.* 86:1556-1563).

35 Las proteasas coagulantes de la leche actúan sobre la porción soluble de las micelas, la κ -caseína, produciendo una estructura inestable que origina la formación de una masa quesera (Vasbinder *et al.*, 2003, *J. Dairy Sci.* 86:1556-1563). La quimosina (E.C. 3.4.23.4) es una proteasa aspártica que hidroliza el puente proteico fenilalanina₁₀₅ - metionina₁₀₆ de la κ -caseína y está considerada como la proteasa más eficiente en la industria quesera (Rao *et al.*, 1998, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:597-635). Sin embargo, existen otras proteasas capaces de desencadenar la coagulación de la leche, rompiendo otro tipo de enlaces diferentes de la κ -caseína (Lucey, 2002, *op. cited*; Esteves, 2003, *op. cited*). Este efecto permite la obtención de quesos con una gran variedad de propiedades reológicas y organolépticas.

45 El método convencional para cuantificar una enzima coagulante de leche (Poza *et al.*, 2003, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:691-698) utiliza leche como sustrato, y determina el tiempo transcurrido hasta que aparece el coágulo lácteo. Sin embargo, como la coagulación de la leche puede verse influida por variaciones físico-químicas (Lucey, 2002, *op. cited*; Lucey, 2003, *op. cited*; Vasbinder, 2003, *op. cited*), puede llegar a ocurrir sin la participación de ningún enzima. Como consecuencia, se pueden obtener resultados confusos e irreproducibles, particularmente cuando se trabaja con enzimas con poca actividad. Por otra parte, la medición del tiempo de coagulación no es suficientemente precisa, dado que el momento exacto de la formación del coágulo lácteo es difícil de observar y es subjetivo, lo cual dificulta una determinación precisa de las unidades enzimáticas.

55 Además, aunque está descrito que la hidrólisis de la κ -caseína sigue una cinética clásica de Michaelis-Menten (Carlson, *et al.*, 1987, *Biotechnol. Bioeng.* 29:582-589), es difícil de determinar midiendo el tiempo de la coagulación. Cuando se trabaja con enzimas poco activas, el tiempo que tarda en formarse el coágulo se puede alargar durante horas, siendo posible que tenga lugar una coagulación espontánea de la leche por aumento de la temperatura o por bajada del pH.

60 Para solucionar estos problemas y mejorar el estudio del proceso, se han propuesto diversos métodos: la determinación del diámetro de halos en placas de agar-leche (Poza, *op. cited*); la determinación colorimétrica (Hull, 1947, *J. Dairy Sci.* 30:881-884); y la determinación de la degradación de la caseína marcada previamente con un marcador radioactivo (Christen, 1987, *J. Dairy Sci.* 70:1807-1814), o con un compuesto fluorocrómico (Twining, 1984, *Anal. Biochem.* 143:30-34). Todos estos métodos utilizan caseína como sustrato para detectar la actividad proteolítica y, en algunos casos, la actividad coagulante.

65 El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es una sustancia fluorescente, que se une a grupos amino, utilizada para el marcaje de proteínas (Schreiber, A.B., y Haimovich, J., 1983, *Methods Enzymol.*, 93:147-155). El grupo isotiocianato reacciona con los grupos amino terminal y las aminas primarias de la proteína, formando un derivado tiocarbamoil, tiocarbamoil de fluoresceína (FTC) (Twining, 1984, *op. cited*) que queda unido a la proteína.

Descripción de la invención

La característica novedosa esencial del método propuesto, consiste en la sustitución de la caseína como sustrato por otro sustrato más específico, la κ -caseína, marcado con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). El cambio de sustrato permite la cuantificación de las moléculas de κ -caseína degradadas de un modo preciso y específico, detectando aquellos enzimas que son capaces de actuar sobre el sustrato formado FTC- κ -caseína.

El método analítico para la medida de la actividad κ -caseinolítica de enzimas comprende las siguientes etapas:

a) Elaboración del sustrato: Se incuba κ -caseína en tampón carbonato y NaCl a pH 9.5, con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), durante una hora en agitación. El sustrato resultante, FTC- κ -caseína, se dializa varias veces frente a carbón activo, tampón Tris-HCl, pH 8.5 y frente a Tris-HCl, pH 7.5. Por último, el sustrato, FTC- κ -caseína, se congela a -20°C en alícuotas de 1 mL.

b) Preparación de la mezcla de reacción: Se incuba la muestra enzimática, en presencia de FTC- κ -caseína con el tampón adecuado para la muestra. Se deja reaccionar en agitación a la temperatura óptima de la enzima. Se detiene la reacción por adición de ácido tricloroacético (TCA) frío y en agitación. Mediante centrifugación, se eliminan las proteínas precipitadas y se guarda el sobrenadante.

c) Medición de la fluorescencia: Se diluye parte del sobrenadante con tampón Tris-HCl, pH 8.5. La cantidad de fluorocromo liberado se mide empleando un fluorímetro robotizado. Se realizan controles negativos sustituyendo la enzima por el tampón; el valor basal de fluorescencia obtenido se resta al obtenido tras la reacción.

d) Construcción de una recta patrón: Se incuban cantidades crecientes del sustrato, FTC- κ -caseína, con una proteasa un tiempo suficiente hasta la completa degradación del sustrato de origen. Así, se obtiene la relación entre la fluorescencia y la cantidad de FTC- κ -caseína degradada.

Se define la unidad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 μ g de FTC- κ -caseína en 1 h a 37°C.

e) Interpolación de los datos: A partir de la recta patrón obtenida, se deducen los datos de actividad de la proteasa, a través de la cantidad de fluorescencia emitida.

A continuación se ilustra más ampliamente la invención mediante ejemplos no limitativos:

Ejemplo 1

Preparación del sustrato FTC- κ -caseína

Para la preparación del sustrato del presente método, 1 g de κ -caseína se disolvió en 100 mL de tampón carbonato 50 mM, pH 9.5 y NaCl 150 mM. Posteriormente, se añadieron 40 mg de isotiocianato de fluoresceína (FITC). La mezcla se agitó suavemente durante una hora a temperatura ambiente. Durante esta hora tiene lugar la unión del tiocarbamoilo de fluoresceína (FTC), derivado de FITC, y las moléculas de κ -caseína. El FITC no unido se eliminó dializando la muestra frente a 1% de carbón activo en 2 L de agua a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se dializó frente a tampón 50 mM Tris-HCl, pH 8.5 durante toda una noche, seguido de una diálisis frente a tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. La concentración de proteína en la muestra obtenida fue ajustada al 0.5% con tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. El sustrato fue conservado a -20°C en alícuotas de 1 mL. La cantidad de FITC unido a la κ -caseína fue de 14.12 μ g por mg de sólido. Esta determinación se obtuvo comparando el sustrato con un sustrato comercial de FTC-caseína.

Ejemplo 2

Mezcla de reacción

La mezcla de reacción consistió en 10 μ L de la muestra enzimática, 20 μ L de tampón adecuado para cada enzima y 20 μ L de sustrato de FTC- κ -caseína. La reacción se llevó a cabo en tubos cubiertos de 1,5 mL en condiciones de agitación (180 rpm) a la temperatura óptima de la enzima y un tiempo variable, según las condiciones del experimento. En el caso de las enzimas utilizadas en los ejemplos posteriores (Ejemplos 4 a 7) fueron estas condiciones; 37°C durante un tiempo que varió entre 15 y 180 min, dependiendo del tipo de ensayo. La reacción se detuvo mediante la adición de 120 μ L de ácido tricloroacético (TCA) frío al 5% y agitando fuertemente los tubos. La mezcla se dejó reposar como mínimo 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas insolubilizadas por el TCA se precipitaron mediante centrifugación durante 5 min a 14,000 rpm. Una alícuota de 60 μ L de sobrenadante se diluyó con 400 μ L de tampón 0.50 M Tris-HCl, pH 8,5.

ES 2 303 760 B1

Ejemplo 3

Medición de la fluorescencia

5 Los valores de fluorescencia se obtuvieron mediante la medición de 350 μL de las muestras obtenidas empleando placas de 96 pocillos especiales para la medición por fluorescencias empleando un fluorímetro robotizado con una apertura de 2.5 y unas longitudes de onda de excitación y emisión de 490 y 525 nm, respectivamente.

10 Los niveles de fluorescencia basales fueron sustraídos de los valores de las mediciones para determinar la cantidad de fluorocromo liberado. Se realizaron controles negativos sustituyendo la enzima por el tampón empleado en la reacción.

Ejemplo 4

15 *Diseño de la recta patrón*

Se realizó una recta patrón que relacionó la cantidad de fluorescencia con la cantidad de FTC- κ -caseína degradada. Esto se consiguió incubando concentraciones crecientes del sustrato (de 0 mg/mL a 43 mg/mL de FTC- κ -caseína) en presencia de tripsina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) hasta conseguir la degradación completa. Esto permitió obtener la relación entre la fluorescencia y la cantidad de FTC- κ -caseína degradada.

20 Se definió la unidad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 pg de FTC- κ -caseína en 1 h a 37°C.

Ejemplo 5

30 *Estudio comparativo de la acción de la tripsina y de la enzima coagulante de la leche de R. miehei sobre los sustratos FTC- κ -caseína y FTC-caseína*

Se llevó a cabo una recta patrón de FTC-caseína degradada del mismo modo descrito en el ejemplo 4. Con estos valores y los obtenidos en el ejemplo 4 se llevó a cabo una recta patrón que relacionó la cantidad de FTC- κ -caseína y FTC-caseína degradadas (Tabla 1).

35 Se realizaron mediciones con el sustrato comercial FTC-caseína y con el sustrato FTC- κ -caseína del modo descrito en los ejemplos 2 y 3.

40 Se incubó 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tripsina en presencia de los dos sustratos. Los valores obtenidos en el experimento, tal como era de suponer, fueron muy similares, no encontrándose diferencias significativas con un α de 0,05% (Tabla 1).

45 Se incubaron 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteasa coagulante de leche procedente de *R. miehei*, que sólo actúa sobre la κ -caseína, en presencia de los dos sustratos. Se obtuvieron valores de actividad 2.65 veces más elevados empleando el método aquí propuesto y empleando FTC- κ -caseína como sustrato que cuando se empleó FTC-caseína como sustrato, tal como se puede observar en la Tabla 1.

TABLA 1

50 *Valores de actividad enzimática de la tripsina y de la enzima prodecente de R. miehei, usando como sustratos FTC-caseína o FTC- κ -caseína*

Muestra enzimática (Dilución)	FTC-caseína	FTC- κ -caseína
Tripsina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	28.28 ¹	28.22
Enzima de <i>R. miehei</i> (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	4.69 ¹	12.41

60 ¹Valores convertidos según la ecuación $Y = 3,6949X$ donde X se refiere a las unidades de FTC-caseína/mL e Y se refiere a las unidades de FTC- κ -caseína/mL. ($R^2 = 0.9981$).

65

ES 2 303 760 B1

Ejemplo 6

Determinación de la actividad enzimática, actividad específica y parámetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$ y K_m) de muestras enzimáticas de uso industrial

Se incubaron las siguientes muestras enzimáticas del modo descrito en los ejemplos anteriores.

La proteasa comercial producida por *R. miehei* (13 $\mu\text{g/mL}$), la quimosina obtenida a partir de un cuajar de búfalo lactante (164 $\mu\text{g/mL}$), la proteasa procedente de una infusión de flores de *Cynara cardunculus* (13 $\mu\text{g/mL}$) y la quimosina comercial recombinante producida por *Escherichia coli* (5 $\mu\text{g/mL}$).

Las diluciones de las muestras fueron incubadas frente a concentraciones crecientes de sustrato FTC- κ -caseína (de 0 a 1,47 mg/mL) y las mezclas se incubaron durante 1 h a 37°C. Se midió la actividad y la cantidad de proteína del modo anteriormente descrito. Con estos valores se realizó la gráfica de Michaelis-Menten (Figura 1) y la representación de Lineweaver-Burk (Figura 2), lo cual permitió la obtención de los valores de K_m y $V_{\text{máx}}$ de dichas enzimas (Tabla 2).

TABLA 2

Valores de unidades enzimáticas, actividad específica, concentración de proteína y $V_{\text{máx}}$ y K_m de todas las muestras enzimáticas probadas. Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 1 h

Muestra enzimática	$V_{\text{máx}}$	K_m	U/mL	mg proteína/mL	U/mg proteína
<i>B. arnee bubalis</i>	22.124	2.108	10.243	0.164	62.46
<i>C. cardunculus</i>	3.912	0.225	3.841	0.013	295.48
<i>R. miehei</i>	16.611	0.714	14.139	0.013	1,087.63
Quimosina recombinante	0.328	2.280	1.492	0.005	331.66

Ejemplo 7

Estudio de la linealidad y el límite de detección del método

Con el objetivo de observar la linealidad de la degradación de FTC- κ -caseína, la reacción se prolongó en el tiempo. Las muestras enzimáticas consistieron en dos diluciones de la enzima coagulante procedente de *R. miehei* (7 y 13 $\mu\text{g/mL}$) y el sustrato fue FTC- κ -caseína, preparado del modo descrito en los ejemplos anteriores.

Las reacciones se incubaron durante un tiempo variable, desde 5 minutos hasta 3 horas y se realizaron por triplicado (Figura 3).

Con el objeto de observar linealidad en la degradación de κ -caseína cuando la reacción tiene lugar empleando distintas concentraciones de enzima, se realizaron ensayos del mismo modo descrito en ejemplos anteriores, donde las reacciones fueron incubadas durante 1 h y se varió la concentración de la muestra enzimática (de 44 a 440 $\mu\text{g/mL}$) procedente de *R. miehei* (Figura 4).

Tal como se puede observar en las figuras 3 y 4, los resultados originaron una representación lineal en ambos casos. De la figura 3 se extrajo el dato de que el método detecta cantidades mínimas de enzima (tales como 2,6 ng en reacción). Esto lo hace ideal para ser empleado durante la purificación de enzimas; aunque se tenga poca actividad o poca cantidad de enzima, el método permite detectar la enzima.

El método analítico para la medida de la actividad κ -caseinólítica de enzimas detecta actividad sobre la κ -caseína en cantidades que no consiguen originar la coagulación de la leche sin que pueda intervenir factores fisicoquímicos, tales como el pH y la temperatura.

ES 2 303 760 B1

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de las muestras procedentes de: quimosina recombinante (■), *R. miehei* (○), *B. arnee bubalis* (▲) y *C. cardunculus* (◇). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

Figura 2. Representación de Lineweaver-Burk de la actividad enzimática de las muestras procedentes de: quimosina recombinante ($y = 0.072x + 0.629$; $R^2 = 0.995$) (■), *R. miehei* ($y = 0.041x + 0.087$; $R^2 = 0.996$) (○), *B. arnee bubalis* ($y = 0.095x + 0.045$; $R^2 = 0.997$) (▲) y *C. cardunculus* ($y = 0.058x + 0.256$; $R^2 = 0.993$) (◇).

Figura 3. Efecto del tiempo de incubación y el valor de dilución sobre la actividad enzimática de la proteasa procedente de *R. miehei*. Factor de dilución 1/1,000 ($Y = 0.071X + 0.574$; $R^2 = 0.995$) (□) y factor de dilución 1/10,000 ($Y = 0.020X - 0.431$; $R^2 = 0.995$) (■). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

Figura 4. Actividad específica de la proteasa procedente de *R. miehei*. ($Y = 46.093X + 4.497$; $R^2 = 0.984$) (□). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 303 760 B1

REIVINDICACIONES

1. Método analítico para la medida de la actividad κ -caseinolítica de enzimas, que comprende las siguientes etapas:

5 a) Elaboración del sustrato: Se incuba κ -caseína en tampón carbonato y NaCl a pH 9.5, con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), durante una hora en agitación. El sustrato resultante, FTC- κ -caseína, se dializó varias veces frente a carbón activo, tampón Tris-HCl, pH 8.5 y frente a Tris-HCl, pH 7.5. Por último, el sustrato, FTC- κ -caseína, se congela a -20°C en alícuotas de 1 mL.

10 b) Preparación de la mezcla de reacción: Se incuba la muestra enzimática en presencia de FTC- κ -caseína con el tampón adecuado para la muestra. Se deja reaccionar en agitación a la temperatura óptima de la enzima. Se detiene la reacción por adición de ácido tricloroacético (TCA) frío y en agitación. Mediante centrifugación, se eliminan las proteínas precipitadas y se guarda el sobrenadante.

15 c) Medición de la fluorescencia: Se diluye parte del sobrenadante con tampón Tris HCl, pH 8.5. La cantidad de fluorocromo liberado se mide empleando un fluorímetro robotizado. Se realizan controles negativos sustituyendo la enzima por el tampón; el valor basal de fluorescencia obtenido se resta al obtenido tras la reacción.

20 d) Construcción de una recta patrón: Se incuban cantidades crecientes del sustrato FTC- κ -caseína, con una proteasa un tiempo suficiente hasta la completa degradación de sustrato de origen. Así, se obtiene la relación entre la fluorescencia y la cantidad de FTC- κ -caseína degradada.

25 Se define la unidad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 μ de FTC- κ -caseína en 1 h a 37°C.

e) Interpolación de los datos: A partir de la recta patrón obtenida, se deducen los datos de actividad de la proteasa, a través de la cantidad de fluorescencia emitida.

30 2. Un método analítico, según la reivindicación 1, donde las enzimas o muestras enzimáticas que se evalúan son proteasas que actúan sobre la κ -caseína.

35 3. Un método analítico, según la reivindicación 1, para la detección de nanogramos de enzima con actividad κ -caseinolítica, y su utilización para llevar a cabo procesos de purificación de enzimas y para la industria quesera.

40

45

50

55

60

65

70

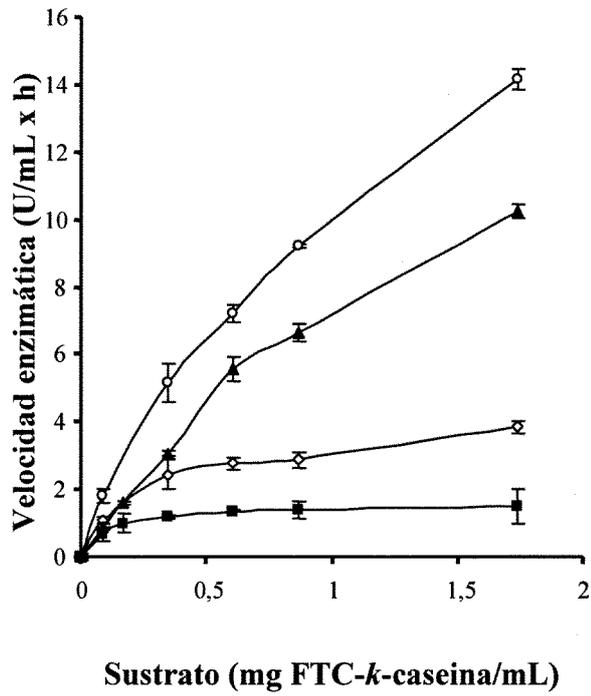


FIGURA 1

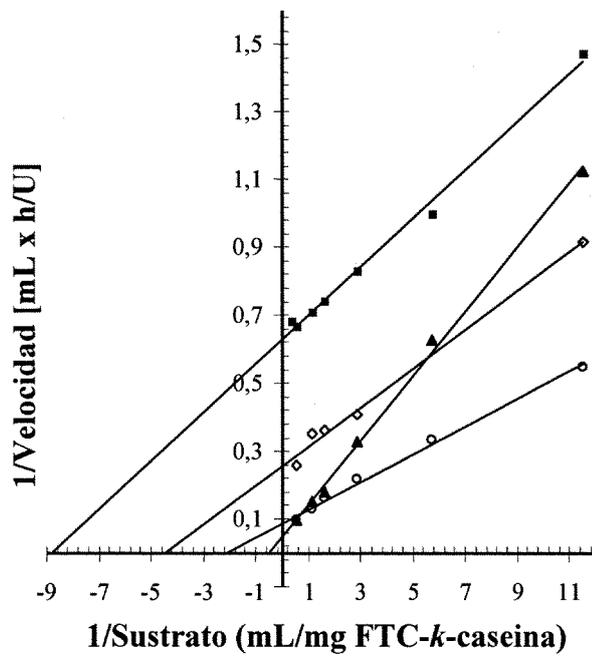


FIGURA 2

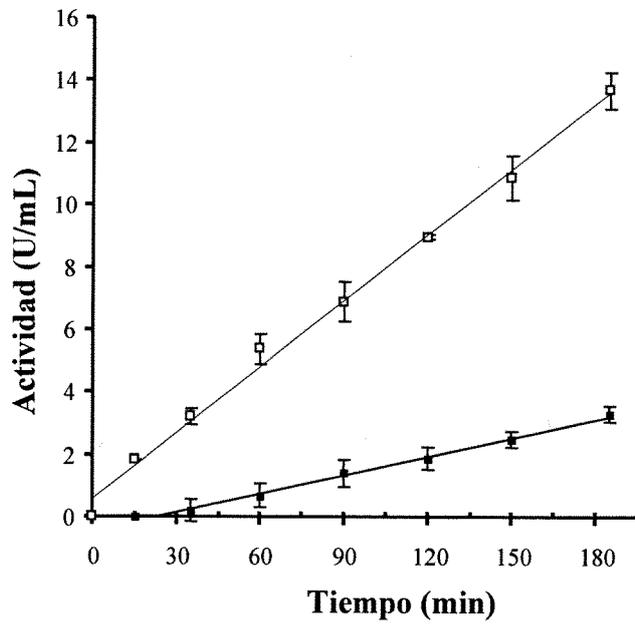


FIGURA 3

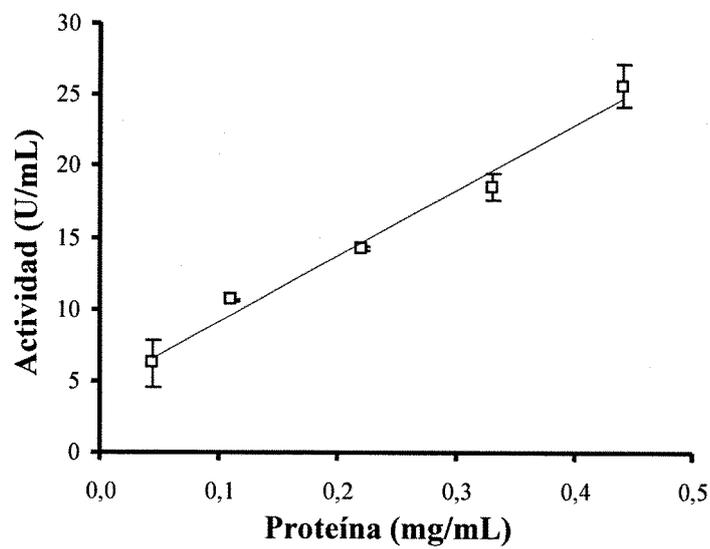


FIGURA 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 303 760

② Nº de solicitud: 200600873

③ Fecha de presentación de la solicitud: 24.03.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	I. QUEIROZ MACEDO y col. Specificity and Kinetics of the Milk-Clotting Enzyme from Cardoon (Cynara cardunculus L.) toward Bovine kappa-Casein. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Octubre 1993, Vol. 41, Nº 10, páginas 1537-1540, ISSN 0021-856.	1-3
X	TWINING S.S. Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Casein Assay for Proteolytic Enzymes. Analytical Biochemistry, 15 Noviembre 1984, Vol. 143, Nº 1, páginas 30-34, ISSN 0003-2697.	1-3
A	US 5262183 A (MORAN et al.) 16.11.1993, columna 5, líneas 12-64.	1-3
A	WO 0060042 A1 (PROCTER & GAMBLE; KHAN GOLAM FARUQUE; OTANI RYOHEI) 12.10.2000, página 5, línea 23 - página 6, línea 17.	1-3
A	WO 03070009 A1 (GERVAIS DANONE SA) 28.08.2003, página 15, línea 18-página 16, línea 26.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

23.07.2008

Examinador

Mª J. de Concepción Sánchez

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

Purificación, caracterización y expresión
heteróloga de la proteasa menor extracelular (Epr)
de *Bacillus licheniformis*



JOSÉ MANUEL AGEITOS MARTÍNEZ
SANTIAGO DE COMPOSTELA
2011