



GRADO EN BIOQUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y
BIOQUÍMICA
UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA

**Producción heteróloga y caracterización bioquímica
de una α -D-galactosidasa de *Lactobacillus*
plantarum WCFS1**

Sandra Martín Esteban

Trabajo Fin de Grado
Toledo, 2017



GRADO EN BIOQUÍMICA

**FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y
BIOQUÍMICA**

UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA

Departamento de procesos

**Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición
(ICTAN-CSIC)**

**Producción heteróloga y caracterización bioquímica
de una α -D-galactosidasa de *Lactobacillus*
plantarum WCFS1**

Trabajo Fin de Grado

AUTOR: Sandra Martín Esteban

DIRIGIDO POR: Blanca de las Rivas González del Rey

Rosario Muñoz Moreno

TUTOR ACADÉMICO (TFG externos): María Jiménez Moreno

TOLEDO, 2017

Agradecimientos

Llegados a este punto, en el que han pasado volando estos cuatro años, llenos de grandes momentos, otros no tan buenos, pero siempre acompañada de personas que de una forma u otra me han estado apoyando. No sé a quién agradecer en primer lugar porque han sido muchas las personas importantes en este largo camino, y espero que no se me olvide nadie.

Voy a empezar dando las gracias a mis padres, sin ellos nada de esto habría sido posible, todo esto ha sido un esfuerzo no solo para mí sino también para ellos. Han estado siempre tanto en los buenos momentos como en los malos. A mi hermano Víctor, una de las personas más importantes de mi vida que siempre ha estado para sacarme una sonrisa, o incluso para decirme que me estaba volviendo loca con todo esto de escribir el TFG.

Muy importantes dar las gracias a mis tutoras del laboratorio Rosario y Blanca, ellas han hecho posible que pudiera realizar el TFG en su laboratorio en el que siempre me he encontrado muy a gusto. Gracias tanto a Laura Plaza como a Laura Santamaría, ellas han sido mis guías, las que me han enseñado muchas cosas durante la estancia en el laboratorio. Gracias a Pepe, siempre dispuesto a ayudar y a enseñarme también muchas cosas. Gracias también a María, mi tutora de la universidad, por estar pendiente de mí y estar siempre disponible para todas las dudas que me surgieran.

Llegó el turno de mis amigos y compañeros. Me gustaría empezar dando las gracias a Mario, un pilar muy importante en todo esto, la persona a la que más guerra he dado, el que siempre ha estado ahí, el que ha hecho que no mandase todo a la mierda en los momentos de desesperación, gracias por todo esto y por ayudarme siempre en lo posible. Gracias a mis chicas Andrea, Bea, Mónica y Míriam grandes apoyos en todo esto y con las que me llevo muchos momentos compartidos que volvería a repetir. Gracias a vosotros también Luis, Carlos, Dani y Jorge, hemos compartido muchos momentos juntos.

También me gustaría dar las gracias a mis amigos de siempre, sobre todo a Gema y a Fer, siempre han sido un apoyo, siempre se han interesado por mis cosas aunque pareciera que los estaba hablando en chino.

Por último y no menos importante, me gustaría dar las gracias a dos personas importantes a las que he perdido en este último año y medio de carrera. Ellos son mi abuelo Pedro y mi tía Carmela.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Objetivos	4
Materiales y métodos	5
1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	5
2. Medios y condiciones de cultivo	5
3. Técnicas de ADN	6
3.1. Extracción de ADN cromosómico	6
3.2. Amplificación de secuencias de ADN mediante PCR	6
3.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	6
3.4. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	7
3.5. Método de clonación independiente de ligación (LIC)	7
3.6. Transformación genética de <i>E. coli</i>	8
3.7. Extracción de ADN plasmídico	8
3.8. Secuenciación de ADN y análisis de la información	8
4. Técnicas de proteínas	9
4.1. Hiperproducción de la proteína recombinante	9
4.2. Purificación de la proteína recombinante	9
4.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	10
5. Caracterización bioquímica de la glicosidasa Lp_3485	10
5.1. Detección de la actividad glicosidasa. Especificidad de sustrato	10
5.2. Estudio cinético de la actividad α -galactosidasa	11
5.3. Efecto de aditivos en la actividad α -galactosidasa	11
5.4. Efecto del pH	11
5.5. Efecto de la temperatura	12
5.6. Ensayo de la estabilidad térmica de la α -galactosidasa	12
Resultados y discusión	12
1. Clonación y transformación del gen	12
2. Hiperproducción y purificación	14
3. Caracterización bioquímica de la glicosidasa Lp_3485 de <i>L. plantarum</i> WCFS1	15
3.1 Actividad glicosidasa de Lp_3485	15
3.2 Parámetros cinéticos de Lp_3485	16

3.3 Efecto de aditivos en la actividad α -galactosidasa de Lp_3485	17
3.4 Efecto del pH	18
3.5 Efecto de la temperatura	19
3.6 Estabilidad térmica de la α -galactosidasa Lp_3485	20
Conclusiones	21
Bibliografía	22

RESUMEN

Título: Producción heteróloga y caracterización bioquímica de una α -galactosidasa de *Lactobacillus plantarum* WCFS1

Nombre del Autor: Sandra Martín Esteban

Nombre del Tutor/es: Blanca de las Rivas González del Rey y Rosario Muñoz Moreno

Área/Departamento: Departamento de Procesos

Número de palabras de la memoria: 6917

Resumen:

La α -galactosidasa (E.C.3.2.1.22) es una exo-glicosidasa que escinde principalmente residuos terminales α -1,6-D-galactosilo unidos a una amplia gama de sustratos incluyendo oligosacáridos de azúcares de la familia de la rafinosa. Algunas de las α -galactosidasas son también conocidas por catalizar reacciones de transgalactosilación, especialmente a una alta concentración de sustrato. El interés de esta enzima se deriva de sus potenciales aplicaciones tecnológicas y medicinales. Con el objeto de encontrar nuevas enzimas con propiedades y características interesantes, en este trabajo se caracterizó la glicosidasa Lp_3485 de la bacteria láctica *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Se procedió a la producción heteróloga en *Escherichia coli*, la purificación y la caracterización de la proteína Lp_3485. El gen se clonó mediante un método de clonación independiente de ligación (LIC) en un vector de expresión que añade una etiqueta de polihistidina para su posterior purificación por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). Se obtuvo una proteína de 83.6 kDa con actividad frente al 4-nitrofenil- α -D-galactopiranosido. La proteína mostró una actividad específica α -galactosidasa de 2.56 U/mg y una eficacia catalítica de 1840.92 mM⁻¹ min⁻¹. Las condiciones óptimas de reacción se encuentran por debajo de los 30°C (manteniendo más de un 50% de actividad relativa a 22°C), y en un intervalo de pH de 4.0 a 6.5. La actividad α -galactosidasa de la proteína Lp_3485 se vio fuertemente inhibida por la presencia de Hg²⁺ y Cu²⁺, y favorecida por la presencia de Fe²⁺, Tritón-100, Tween 20, β -mercaptoetanol y el EDTA.

ABSTRACT

Title: Heterologous production and biochemical characterization of a α -galactosidase of *Lactobacillus plantarum* WCFS1

Author: Sandra Martín Esteban

Tutor's name: Blanca de las Rivas González del Rey y Rosario Muñoz Moreno

Area/Department: Department of processes

Number of words of report: 6917

Abstract:

α -galactosidase is an exo-glycosidase that mainly cleaves terminal α -1,6-linked D-galactosyl residues from a wide range of substrates including oligo-saccharides of raffinose family. Some of the α -galactosidases are also known for catalyzing transgalactosylation reactions especially at a high concentration of substrate. Interest in this enzyme is due to its potential technological and medicinal applications. With the aim to find novel enzymes with interesting features, we have characterized the Lp_3485 glycosidase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* WCFS1. The Lp_3485 protein was produced in *Escherichia coli* by heterologous production, purified and biochemically characterized. The gene was cloned by a ligation-independent cloning (LIC) method into an expression vector which added a polyhistidine tag for further purification by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). A 83.6 kDa protein with activity on 4-nitrophenyl- α -D-galactopiranoside was obtained. The Lp_3485 protein showed a specific α -galactosidase activity of 2.56 U/mg and a catalytic efficiency of 1890.42 mM⁻¹ min⁻¹. Optimal reaction conditions were below 30°C (maintaining more than 50% of its activity at 22°C) and in pH range between 4.0 and 6.5. Lp_3485 protein's α -galactosidase activity of the Lp_3485 protein was strongly inhibited by the presence of Hg²⁺ and Cu²⁺, and increased by the presence of Fe²⁺, Triton-100, Tween 20, β -mercaptoetanol and EDTA.

Introducción

Los hidratos de carbono son el principal componente de los productos alimentarios y presentan una gran diversidad estructural y funcional. Los más comunes y abundantes en los alimentos son el almidón, la sacarosa, la glucosa, la fructosa, el sorbitol, la pectina, la celulosa, la hemicelulosa, la quitina y los polisacáridos derivados de las algas, entre otros (Poli et al., 2011). Estos carbohidratos se pueden procesar mediante métodos químicos o enzimáticos para la elaboración de alimentos y para la producción de ingredientes alimentarios. Los métodos químicos, además de resultar caros y tediosos, en ocasiones no son aceptables en la industria alimentaria, por lo que la alternativa enzimática se ha convertido en el método de elección gracias a su estereoselectividad y eficacia (Bojarova & Kren, 2009). Por todo ello, el reto en la actualidad se centra en encontrar nuevas enzimas con las actividades y propiedades interesantes para la industria alimentaria (Pal et al., 2010).

Los avances tecnológicos han impulsado la investigación de nuevas enzimas o de enzimas modificadas con aplicaciones específicas que aumentan la eficacia catalítica. Los estudios se han centrado fundamentalmente en la caracterización de glicosil hidrolasas debido a su importancia en numerosos procesos biológicos y a sus múltiples aplicaciones biotecnológicas. Las glicosil hidrolasas (GHs) son un grupo de enzimas que hidrolizan, de manera selectiva, el enlace glicosídico entre dos hidratos de carbono o entre un hidrato de carbono y un resto no glucídico (Santhya & Khan, 2014). Sin embargo, en determinadas condiciones, pueden mediar la reacción inversa, catalizando la formación de enlaces glicosídicos. Para ello existen dos mecanismos diferentes. Uno es la hidrólisis inversa y el otro la transglicosilación. En el primer caso, se invierte el sentido de la reacción hacia la síntesis, debido a una modificación en las condiciones de la reacción, tales como la disminución de la actividad de agua, la retirada de los productos o la presencia de elevadas concentraciones de sustrato. En el caso de la transglicosilación, se produce una hidrólisis inicial del glicósido, pero el glicosil resultante se une a un nucleófilo diferente al agua (Bhatia et al., 2002).

Las glicosil hidrolasas (GHs) se pueden clasificar atendiendo a varios criterios, dentro de los cuales, el basado en la especificidad de sustrato es el más sencillo. No obstante, en los últimos años se ha demostrado que esta forma de clasificar las GHs no es la más apropiada, debido a que una misma proteína puede actuar sobre diferentes sustratos. Por ello, se ha propuesto un nuevo sistema de clasificación de las GHs, basado en su secuencia aminoacídica, que a su vez determina la estructura terciaria de la proteína y, por lo tanto, su mecanismo de acción (Cantarel et al., 2009). Basándose en este criterio, a día de hoy, la base de datos *Carbohydrate Active enZYme* (CAZY, por sus siglas en inglés) reconoce 133 familias de GHs. Dentro de ellas, la familia 36 de las glicosil hidrolasas (GH36) incluye enzimas muy importantes en aplicaciones biotecnológicas y medicinales, tales como α -galactosidasas, α -N-acetilgalactosaminidasa, estaquiosa sintasa y rafinosa sintasa (Lombard et al., 2014; Anisha et al., 2011)

La α -galactosidasa (galactohidrolasa α -D-galactosido E.C.3.2.1.22) es una exo-glicosidasa que escinde principalmente residuos terminales α -1,6-D-galactosilo unidos a una amplia gama de sustratos incluyendo oligosacáridos de azúcares de la familia de la rafinosa: rafinosa, estaquiosa, melobiosa, verbascosa y polisacáridos de galactomananos, como de algarrobo y goma guar. También actúa sobre los glicoconjugados, glicoproteínas y glucoesfingolípidos. Algunas de las α -galactosidasas son también conocidas para catalizar reacciones de

transgalactosilación, especialmente a una alta concentración de sustrato. El interés de esta enzima se deriva de sus potenciales aplicaciones tecnológicas y medicinales. La aplicación industrial más importante en la industria del azúcar de remolacha, la industria de la pulpa y el papel, el procesamiento de piensos. Un aumento del interés en la α -galactosidasa se puede observar en la medicina humana, ya que se utiliza en la transformación del grupo sanguíneo, el tratamiento de la enfermedad de Fabry y en el xenotransplante (Carrera-Silva et al., 2006; Gote et al., 2006).

Las bacterias lácticas (LAB) son bacterias Gram-positivas, no esporuladas, aerotolerantes, que muestran un metabolismo fermentativo cuyo principal producto final es el ácido láctico. Esta clasificación funcional incluye una variedad de géneros industrialmente importantes *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* (Bachmann et al., 2017). La fermentación de los alimentos se ha empleado durante milenios como un proceso para prolongar la vida útil y mejorar la funcionalidad, textura y sabor de productos alimenticios. Los métodos han evolucionado desde la fermentación espontánea de la población microbiana indígena hasta la presencia de cultivos iniciadores con atributos conocidos (Hill et al., 2017). Hoy en día, las LAB desempeñan un papel muy importante en el suministro mundial de alimentos, realizando las principales conversiones de productos lácteos fermentados, carnes y verduras. LAB también son importantes para la producción de vino, café, cacao, masa fermentada y numerosas fermentaciones de alimentos indígenas (Makarova et al., 2006).

Lactobacillus plantarum es un organismo heterofermentativo facultativo capaz de utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono. Desde la secuenciación completa en 2003 de las 3.3 Mb de su genoma (Kleerebezen et al., 2003), *L. plantarum* WCFS1 se ha convertido en uno de los lactobacilos más estudiados (Van den Nieuwboer, Van Hemert, Claassen, & de Vos, 2016). Se trata de una de las bacterias lácticas con mayor genoma, lo que se relaciona con la gran variedad de azúcares que puede metabolizar. La mayoría de los genes implicados en estas funciones se concentran en una región cercana al origen de replicación denominada “*lifestyle adaptation island*” (Molenaar et al., 2005). Se trata por tanto de una especie muy versátil que es posible encontrar en diversos nichos ecológicos, como vegetales, carnes, pescado y lácteos fermentados, así como en el tracto gastrointestinal humano (Siezen et al., 2011). El genoma publicado de *L. plantarum* WCFS1 contiene varios genes clasificados en la familia 36 glicosil hidrolasas que codifican enzimas con posible función fosfo- α -glucosidasa. A pesar de que el metabolismo de carbohidratos es un proceso clave para el crecimiento de *L. plantarum* tanto en ambientes moleculares como durante el procesamiento de alimentos, existen muy pocos estudios moleculares al respecto (Michlmayr & Kneifel, 2014).

Objetivos

Las enzimas con actividad glicosidasa son muy importantes en la industria alimentaria puesto que, además de mejorar las características organolépticas de los alimentos, incrementan la seguridad alimentaria y la disponibilidad de compuestos con propiedades beneficiosas para la salud. A pesar de que en la actualidad ya existen enzimas comerciales capaces de catalizar reacciones de glicosilación, su actividad se ve limitada por ciertos parámetros físico-químicos a los que tienen que someterse durante el procesamiento. Este trabajo pretende aumentar el conocimiento de glicosidasas en *L. plantarum* y caracterizar bioquímicamente alguna de las

enzimas. Mediante un análisis bioinformático se identificó la proteína Lp_3485 como una posible α -galactosidasa, aunque se puede predecir el tipo de reacción de una determinada enzima es muy difícil determinar el sustrato sobre el que actúa. Con el fin de comprobar que efectivamente se trataba de una enzima α -galactosidasa se llevó a cabo la clonación de dicho gen y la obtención de la proteína soluble para posteriormente realizar su caracterización bioquímica.

Objetivos concretos:

1. Clonación e hiperexpresión del gen *lp_3485*
2. Producción y purificación de la proteína Lp_3485
3. Caracterización bioquímica de la proteína Lp_3485

Materiales y métodos

1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Para el desarrollo de este trabajo se han empleado las estirpes bacterianas, los plásmidos y los oligonucleótidos sintéticos indicados en las **Tabla 1**, **Tabla 2** y **Tabla 3**.

Tabla 1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos sintéticos empleados.

Estirpe bacteriana	Referencia
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	(Kleerebezen et al., 2003)
<i>Escherichia coli</i> DH10B BL21(DE3)	(Durfee et al., 2008) (Studier et al., 1990)

Tabla 2. Plásmidos oligonucleótidos sintéticos empleados.

Plásmido	Genotipo/ Fenotipo relevante	Referencia
pURI3-Cter	Ap ^R (resistencia a Ampicilina)	(Curiel et al., 2011)
pURI3-Cter-Lp_3485	Ap ^R (resistencia a Ampicilina)	Este estudio

Tabla 3. Oligonucleótidos sintéticos empleados.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Referencia
1699	TAACITTAAGAAGGAGATATACATATGGCAGTAACGTTGCAGCAAACCTT	Este estudio
1700	GCTATTAATGATGATGATGATGATGGTCCTTAGCCTTGAAGTAATGTAC	Este estudio

2. Medios y condiciones de cultivo

La cepa de *L. plantarum* WCFS1 se cultivó a 30°C sin agitación en medio líquido Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (de Man et al., 1960).

E. coli DH10B se empleó para la propagación del plásmido, mientras que *E. coli* BL21 (DE3) se utilizó para la expresión del gen de interés. Ambas estirpes se cultivaron a 37°C con agitación en medio líquido Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989). Para los cultivos en medio sólido se añadió agar al 1.5%. A los que se añadió ampicilina a una concentración final de 100 μ g/ml.

3. Técnicas de ADN

3.1. Extracción de ADN cromosómico

El ADN cromosómico de *L. plantarum* WCFS1 se aisló utilizando el siguiente protocolo:

L. plantarum WCFS1 se cultivó en 10 ml de caldo MRS a 30°C durante 48 horas. Las células, que se sedimentaron por centrifugación a 12500 x *g* durante 15 minutos, se lavaron con 500 µl de TES (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0) y se centrifugaron durante 4 minutos a 12000 rpm en la microcentrífuga *Universal 32 R (Hettich)*. Para llevar a cabo la ruptura de las células, el sedimento se resuspendió en 600 µl de solución TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) que contenía 10 mg/ml de lisozima (*Sigma-Aldrich*®) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se añadieron 80 µl de SDS al 20% y 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml) (*Sigma-Aldrich*®), se incubó a 37°C durante 30 minutos para la degradación de las proteínas presentes. Seguidamente, la preparación de ADN se purificó llevando a cabo dos extracciones con solventes orgánicos. En primer lugar, se realizó una extracción con fenol:clorofomo:alcohol isoamílico (25:24:1) para desproteinizar, seguida de una segunda extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para limpiar todas las trazas de fenol. En cada extracción, las fases se separaron mediante centrifugación a 12000 rpm durante 15 minutos en la microcentrífuga *Universal 32 R (Hettich)*. La fase acuosa, que contiene el ADN, se separó y se le añadió NaCl 5 M en proporción 1:25. Para precipitar el ADN cromosómico, se añadieron dos volúmenes de etanol 100% frío (-20°C) y el tubo se mezcló por inversión hasta observar el ADN precipitado. Éste se lavó con etanol al 70% y se dejó secar al aire (Vaquero et al., 2004). Finalmente, el ADN se resuspendió en tampón TE y se conservó congelado a -20°C hasta su uso.

3.2. Amplificación de secuencias de ADN mediante PCR

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, conteniendo: la ADN polimerasa *PrimeSTAR HM (Takara)* a una concentración final de 1.25 U/µl, el tampón de reacción recomendado para esta polimerasa con MgCl₂ 5 mM, desoxinucleótidos (dNTPs) a una concentración final de 0.2 mM, ADN molde y los oligonucleótidos a una concentración final de 0.3 µl como cebadores.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador *Personal (Eppendorf)* y consistieron en 30 ciclos de tres fases cada uno: fase de desnaturalización de ADN a 98°C durante 10 segundos, una fase de hibridación de los oligonucleótidos con el ADN molde a 55°C de 5 segundos y una elongación de ADN realizada a 72°C durante un tiempo proporcional al tamaño del fragmento a amplificar (1Kb/min).

3.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El producto amplificado en la reacción de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% en tampón TAE (Tampón Tris-HCl 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 2 mM, pH 8.0) (Sambrook et al., 1989), el cual se empleó también como electrolito. Las muestras a cargar en los geles contenían, en una proporción 5:1, los productos de PCR y una solución compuesta por azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol FF al 0.25% y glicerol al 30% en agua. La electroforesis se realizó a 100 V.

Una vez finalizada, los geles se tiñieron con *GelRed™ Nucleic acid Gel Stain (Biotium)* a una concentración final 3X en agua con NaCl 0.1 M. Los fragmentos de ADN se detectaron mediante transiluminación ultravioleta ($\lambda=302$ nm) en un equipo *Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ Imaging System (Bio-Rad)*. Como marcador de tamaño se utilizó el ADN del fago Lambda cortado con *EcoT14I (Takara)*.

3.4. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Para extraer y purificar el ADN producto de la PCR, contenido en el gel de agarosa, se utilizó el *Kit QIAquick Gel extraction (QIAGEN)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Este Kit está compuesto por una membrana de sílice y por tampones de salinidad variable, que permiten la adsorción del ADN a la columna y su elución tras el lavado.

3.5. Método de clonación independiente de ligación (LIC)

En este estudio se utilizó el vector de expresión pURI3-Cter de la familia pURI (Curiel et al., 2011) para relizar la clonación del gen de interés mediante el método de clonación independiente de ligación (LIC) (de las Rivas et al., 2007).

El vector pURI-3Cter presente la secuencia líder para la expresión de proteínas tras la región RBS, constituida por un residuo de metionina en el extremo amino terminal y la cola de afinidad que codifica seis residuos de histidina se localiza 280 pb detrás del mencionado residuo de metionina, seguida de cuatro codones de terminación en tándem, como se muestra a continuación en la **Figura 1**. De esta forma el carboxilo terminal del gen clonado presenta una cola de 6 Histidinas seguidas de 4 codones de terminación en tándem.

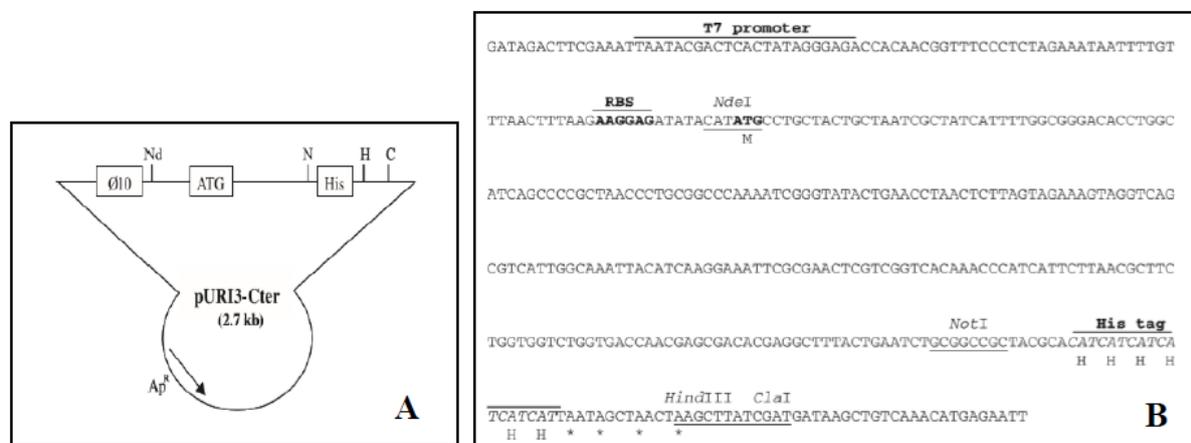


Figura 1. (A) Representación esquemática del vector de expresión pURI3-Cter (2642 pb). (B) Secuencia del vector pURI3-Cter, donde se muestra la cola de 6 His en el extremo C-terminal seguido por los cuatro codones Stop, que aparecen señalados con asteriscos. La secuencia líder de expresión se encuentra controlada por la polimerasa T7 promotor \emptyset en pURI3-Cter. Los sitios de restricción están indicados en la secuencia de nucleótidos con un subrayado: Nd, NdeI, N, NotI, H, HindIII y ClaI.

Para llevar a cabo la clonación se amplificó el gen de interés con la ADN polimerasa *PrimeSTAR™ HS (Takara)* utilizando los oligonucleótidos 1699 y 1700 (**Tabla 3**) diseñados con extremos 5' complementarios a regiones presentes en el vector de expresión pURI3-Cter. De esta manera, en una segunda amplificación utilizando el vector como molde y el gen amplificado como cebador, los extremos 5' hibridan en el plásmido, permitiendo a la enzima

ADN polimerasa copiar el resto del plásmido con la consiguiente inserción del gen de interés en el mismo.

Para seleccionar los plásmidos que contienen el gen de interés se realizó una digestión de la mezcla anterior con la enzima DpnI (*Roche*) durante 10 horas a 37°C, ya que éstos no presentan secuencias metiladas y no son digeridos por dicha enzima. La enzima se inactivó mediante una incubación a 65°C durante 25 minutos, y una vez inactivada, las células competentes de *E. coli* DH10B se transformaron con el producto de la digestión.

3.6. Transformación genética de *E. coli*

Para llevar a cabo la transformación genética de las cepas de *E. coli* DH10B y BL21 (DE3), se partió de células competentes obtenidas mediante el método de cloruro de rubidio (Hanahan, 1983), las cuales estaban conservadas en alícuotas de 200 µl a -80°C. La transformación se realizó incubando 200 µl de células competentes durante 15 minutos en hielo con 10 µl de la digestión anterior, en el caso de *E. coli* DH10B, y 3 µl de plásmido puro, en el caso de BL21 (DE3). Posteriormente se llevó a cabo un choque térmico durante 3 minutos a 37°C, y finalmente una incubación de 5 minutos en hielo. A continuación, se añadió 1 ml de LB y se incubó a 37°C durante una hora. Finalmente, para seleccionar las células transformadas, el producto de la transformación se sembró en placas de LB suplementadas con 100 µg/ml de ampicilina, que se incubaron durante 24 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se pudo observar el crecimiento de colonias transformadas.

3.7. Extracción de ADN plasmídico

Para verificar que las células de *E. coli* DH10B se habían transformado con el plásmido recombinante que contenía el gen de interés, las colonias obtenidas se sometieron a un método rápido de extracción de plásmidos basado en el protocolo desarrollado por Sekar (Sekar, 1987). Para llevar a cabo la extracción de ADN plasmídico, la colonia se cogió con una punta estéril y se resuspendió en 20 µl de una solución que contenía lisozima 0.5 mg/ml, EDTA 25 mM pH 8.0; Tris-HCl 25 mM pH 7.5; RNAsa 0.1 mg/ml, azul de bromofenol, 0.02% y glicerol 11.5%. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, posteriormente se añadieron 5 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos para que se separaran las dos fases. De la fase superior acuosa, que contenía ADN, se cargaron 9 µl en un gel de agarosa al 0.7% y se realizó una electroforesis convencional. Las células transformadas con los plásmidos recombinantes se seleccionaron mediante la diferencia de tamaño con respecto al ADN plasmídico original debido a la presencia del gen clonado.

3.8. Secuenciación de ADN y análisis de la información

Para comprobar que los plásmidos seleccionados en el paso anterior contenían en el gen *lp_3485*, el ADN plasmídico se mandó a secuenciar al servicio de secuenciación *Secugen* (<http://www.secugen.es>). La secuencia obtenida se comparó con la del gen de interés mediante alineamientos de secuencias, empleando el programa *Clustal W2* (Larkin et al., 2007). Finalmente, tras comprobar que el plásmido tenía insertado el gen *lp_3485* con la secuencia inalterada, se procedió a la transformación genética de *E. coli* BL21 (DE3) (apartado 3.6 de materiales y métodos) para expresar el gen de interés.

4. Técnicas de proteínas

4.1. Hiperproducción de la proteína recombinante

Para la hiperexpresión del gen *lp_3485*, insertado en el vector de expresión pURI3-Cter, se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), ya que contiene la RNA polimerasa T7 del fago defectivo DE3. Estas células transformadas con los plásmidos recombinantes se cultivaron en medio LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. Las condiciones de hiperproducción escogidas fueron las siguientes: cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm de entre 0.4-0.6, se indujo la hiperexpresión del gen mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0.4 mM. Se ensayaron distintas condiciones de inducción con IPTG valorando así las condiciones óptimas para la producción de la proteína recombinante. La inducción con IPTG se ensayó a 22°C, 30°C y 37°C con agitación, durante 4 y 18 horas. Se observó que las condiciones óptimas de inducción fueron a 22°C con agitación durante 18 horas.

4.2. Purificación de la proteína recombinante

Finalizado el periodo de inducción de las células de *E. coli* BL21 (DE3) se recogieron mediante centrifugación a 7000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH7.0 y se rompieron realizando tres pases en una prensa de French (*Amicon French pressure cell, SLM Instruments*) a una presión de 1000 psi. El lisado celular resultante se sometió a centrifugación a 15000 rpm durante 40 minutos a 4°C en la centrífuga *Thermo Scientific™ Sorvall™ RC 6 Plus Centrifuge* para obtener el extracto proteico (sobrenadante). El sobrenadante obtenido se filtró (*Millipore*, 0.45 µm de tamaño de poro). La proteína *Lp_3485*, presente en el extracto proteico, se purificó mediante cromatografía de afinidad mediante metales inmovilizados (IMAC) utilizando la resina *Talon®* (*Clontech*). Para ello, el extracto proteico se puso en contacto durante 20 minutos a temperatura ambiente con 1 ml de la resina de cobalto previamente equilibrada con tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH7.0. Una vez unida la proteína a la columna, se realizó un lavado con tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7.0. A continuación, se lavó con tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH7.0 conteniendo 10 mM de imidazol para eluir las proteínas que habían quedado unidas a la resina de forma inespecífica. Finalmente, la proteína recombinante se eluyó con 150 mM de imidazol en el mismo tampón, recogiendo en fracciones de 1 ml.

La pureza de la enzima se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), lo cual permitió conocer las fracciones que contenían la proteína de interés. Dichas fracciones se dializaron frente a tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH7.0, a 4°C utilizando membranas de diálisis (*Cellu Sep®*) de 3.5 kDa de diámetro de poro. Se realizaron varios cambios de tampón para eliminar el imidazol presente en la muestra. A continuación, se determinó la concentración de proteína empleando la ley de Lambert-Beer, $A = \epsilon * b * c$, donde (A) es la absorbancia a 280 nm de la enzima purificada, (ϵ) es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1}cm^{-1}$) de la misma, (c) es su concentración (M), y (b) es el paso óptico de la cubeta (cm). Se utilizó el programa *Expasy* (<http://web.expasy.org/protoparam/>) para conocer el peso molecular y el coeficiente de extinción molar (ϵ) de la proteína.

4.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas se realizó en condiciones desnaturizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). La técnica utilizada fue la descrita por Laemmli (Laemmli, 1970) utilizando geles de poliacrilamida a una concentración de acrilamida del 10%. Las muestras que contenían la proteína a resolver se hirvieron durante 5 minutos a 80°C en presencia de un tampón Tris-HCl 125 mM pH6.8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%, glicerol 20% y azul de bromofenol 0.04 mg/ml. Como marcador de peso molecular se empleó *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range 161-0317 (BioRad)*. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente, utilizando como electrolito el tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%.

Las proteínas presentes en los geles se tiñeron con azul brillante de *Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich®)*. Finalmente, los geles se destiñeron con una solución que contenía metanol al 25% y ácido acético al 10%. Las proteínas se detectaron con epiiluminación con luz blanca en el equipo *Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ Imaging System (BioRad)*.

5. Caracterización bioquímica de la glicosidasa Lp_3485

5.1. Detección de la actividad glicosidasa. Especificidad de sustrato

La actividad glicosidasa de la enzima Lp_3485 se determinó empleando un método colorimétrico estándar que utiliza glicósidos sintéticos unidos a 4-nitrofenilo (*para*-nitrofenilo, *p*NF). La hidrólisis del enlace glicosídico como consecuencia de la actuación enzimática libera *p*-nitrofenol, que, al ser de color amarillo, puede cuantificarse por medida de la absorbancia a 420 nm. Una desventaja de este método colorimétrico es la sensibilidad de los sustratos empleados al imidazol, lo que imposibilita la utilización de proteínas eluidas directamente de las resinas de afinidad a metales (Kuznetsova et al., 2005) y hace necesaria una diálisis previa (apartado 4.2 de materiales y métodos). Los sustratos empleados fueron los mostrados en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Sustratos ensayados en el *screening*

4-nitrofenil-α-D-galactopiranosido	4-nitrofenil-α-L-ramnopiranosido	4-nitrofenil-β-D-maltósido
4-nitrofenil-α-D-glucopiranosido	4-nitrofenil-β-D-celobiosa	4-nitrofenil-β-D-manopiranosido
4-nitrofenil-α-D-maltopentaósido	4-nitrofenil-β-D-fucopiranosido	4-nitrofenil-β-D-ribofuranósido
4-nitrofenil-α-D-maltósido	4-nitrofenil-β-D-galactopiranosido	4-nitrofenil-β-D-xilopiranosido
4-nitrofenil-α-D-manopiranosido	4-nitrofenil-β-D-galactopiranosido-6-fosfato	4-nitrofenil-β-D-fucopiranosido
4-nitrofenil-α-D-xilopiranosido	4-nitrofenil-β-D-glucopiranosido	4-nitrofenil-N-acetil-α-D-galactosaminida
4-nitrofenil-α-L-arabinofuranósido	4-nitrofenil-β-D-glucopiranosido-6-fosfato	4-nitrofenil-N-acetil-α-D-glucosaminida
4-nitrofenil-α-L-arabinopiranosido	4-nitrofenil-β-D-glucurónido	4-nitrofenil-N-acetil-β-D-galactosaminida
4-nitrofenil-α-L-fucopiranosido	4-nitrofenil-β-D-lactopiranosido	4-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida

La reacción enzimática se realizó incubando a 30°C durante 10 minutos muestras consistentes en 4 µg de la enzima Lp_3485 en presencia de los sustratos a una concentración final de 10 mM, en tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7.0 (volumen final de reacción de

75 μ l). A continuación, se añadieron 75 μ l de carbonato sódico 1M pH 9. Dicho tampón, detiene la reacción. La cuantificación de la actividad glicosidasa se determinó espectrofotométricamente valorando la cantidad de *p*-nitrofenol liberado a 420 nm. Paralelamente se llevó a cabo un control de la reacción sin enzima para valorar la hidrólisis espontánea de los sustratos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El espectrofotómetro empleado fue *UVmini-1240 UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu)*.

La actividad específica, que son los moles de *p*-nitrofenol producidos por minuto por mg de proteína, se determinó a partir de la absorbancia media de la reacción estándar. La concentración de *p*-nitrofenol se halló empleando la ecuación de Lambert-Beer, conociendo el coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol ($9311 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y el paso óptico (0.43 cm), y se calcularon los moles de *p*-nitrofenol teniendo en cuenta que el volumen de reacción es de 150 μ l. El tiempo de reacción fue de 10 minutos y se emplearon 4 μ g de proteína en el ensayo.

5.2. Estudio cinético de la actividad α -galactosidasa

Para determinar los parámetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten (K_M) y velocidad máxima (V_{max}) se utilizó el lector de microplacas *EPOCH|2 MICROPLATE READER (Biotek®)* y el Software de análisis de datos *Gen 5* versión 2.06. Se analizaron mezclas de reacción de un volumen final de 150 μ l en las que se varió la concentración de *p*-NFG (0.1; 0.25; 0.35; 0.5; 1; 2; 3; 4; 5; 6), el cual se disolvió en tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7.0. La cantidad de enzima añadida fue 4 μ g. Se programó el lector para que la reacción se llevase a 30°C, tomase medidas a 420 nm de cada una de las mezclas de reacción cada 30 segundos durante 10 minutos y para que agitase las muestras entre cada una de las medidas realizadas. Para realizar la representación gráfica de los datos obtenidos y el posterior análisis de la cinética enzimática, se empleó el programa *SigmaPlot*, versión 12.5.

5.3. Efecto de aditivos en la actividad α -galactosidasa

Se estudió el efecto que tenían diferentes aditivos sobre la actividad α -galactosidasa de Lp_3485 de *L. plantarum* WCFS1. Dentro de estos aditivos, se ensayaron las sales ZnCl_2 , HgCl_2 , CaCl_2 , KCl y MgCl_2 ; los surfactantes no iónicos Tween 20, Tween 80 y Tritón X-100; la urea, el dimetilsulfóxido (DMSO) como agentes desnaturizantes (caotrópicos), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como agente quelante de divalentes; β -mercaptoetanol como agente reductor que rompe los enlaces disulfuro. Las mezclas de reacción analizadas contenían 4 μ g de la proteína en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, 6 μ l de sustrato *p*-NFG 12.5 mM y el aditivo a una concentración final de 1 mM. Esta reacción se incubó durante 10 minutos a 37°C. A continuación, se añadieron 75 μ l de carbonato sódico 1M pH 9 y se midió la absorbancia a 420 nm. Las actividades resultantes se compararon con la actividad de la enzima en una mezcla de reacción sin aditivo, sometida a las mismas condiciones.

5.4. Efecto del pH

Para determinar el efecto del pH sobre la actividad enzimática de la α -galactosidasa Lp_3485, se emplearon diferentes tampones a una concentración final de 50 mM. Tampón citrato para el pH 3, tampón acetato para los pH 4 y 5, tampón fosfato sódico para los pH 6.5 y 7, tampón Tris para el pH 8 y tampón glicina para el pH 9. Los 75 μ l de la mezcla de reacción, que contenía 6 μ l de sustrato *p*NFG 12.5 mM, 4 μ g de la enzima y el tampón correspondiente en cada caso,

se incubaron a 37°C durante 10 minutos. A continuación, se detuvo la reacción añadiendo 75 µl de tampón carbonato sódico 1 M pH 9 y se midió la absorbancia a 420 nm en el lector de placas.

5.5. Efecto de la temperatura

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la α -galactosidasa Lp_3485, se analizó ensayando las siguientes temperaturas de incubación: 4°C, 22°C, 30°C, 37°C, 45°C y 65°C durante 10 minutos. Las mezclas de reacción contenían 64 µl de tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7.0, 6 µl de sustrato *p*-NFG 12.5 mM y 4 µg de la enzima. A continuación, se detuvo la reacción añadiendo 75 µl de tampón carbonato sódico 1 M pH 9 y se midió la absorbancia a 420 nm en el lector de placas.

5.6. Ensayo de la estabilidad térmica de la α -galactosidasa

Para determinar la estabilidad térmica sobre la actividad enzimática de la α -galactosidasa Lp_3485, la proteína se incubó a 22°C, 30°C, 37°C, 45°C y 65°C durante un periodo total de 24 horas. Se tomaron alícuotas de 4 µg de la proteína incubada en los tiempos 0 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 24 horas. Estas alícuotas se añadieron a la mezcla de reacción que contenía tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM pH 7.0 y 6 µl de sustrato *p*-NFG 12.5 mM. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 10 minutos. A continuación, se detuvo la reacción añadiendo 75 µl de tampón carbonato sódico 1 M pH 9 y se midió la absorbancia a 420 nm en el lector de placas. Para tener un valor de actividad de referencia, se llevó a cabo una reacción, en las mismas condiciones que se acaban de citar, en la que la enzima añadida no había sido sometida a incubación y se encontraba a una temperatura de 4°C.

Para todas las condiciones ensayadas durante la caracterización bioquímica de la α -galactosidasa (cinética, efecto de aditivos, pH, temperatura y estabilidad térmica), las reacciones se realizaron por triplicado y se emplearon controles que se sometieron a las mismas condiciones de reacción y que contenían todos los compuestos presentes en cada una de las mezclas de reacción, salvo la enzima.

Resultados y discusión

1. Clonación y transformación del gen

El gen *lp_3485* contiene 2214 pb y fue clonado en el vector pURI3-Cter utilizando los oligonucleótidos 1699 y 1700 (**Tabla 3**), que fueron diseñados para amplificar el gen añadiendo a sus extremos 5' nucleótidos que hibridan con el vector de expresión pURI3-Cter para llevar a cabo una estrategia de clonación independiente de ligación (de las Rivas et al., 2007) descrito en el apartado 3.5 de materiales y métodos.

En la **Figura 2** se muestra el fragemento de ADN correspondiente al gen *lp_3485* amplificado mediante PCR. Se muestra un gel de agarosa al 0.7% donde se observó la banda con el tamaño esperado del gen.

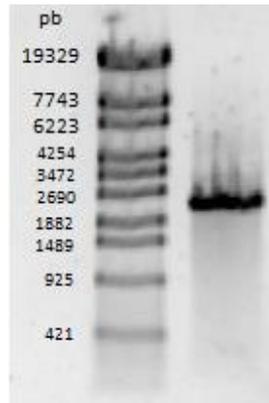


Figura 2. Amplificación mediante PCR del fragmento del gen *lp_3485* utilizando los oligonucleótidos 1699 y 1700. En el primer carril se encuentra el marcador de tamaños λ T14 (Takara) y en el segundo carril se aprecia la banda correspondiente al gen *lp_3485*.

A continuación, se realizó la transformación de la cepa de *E. coli* DH10B con el producto de la digestión. Las células transformadas se chequearon en un gel de agarosa al 0.7% para buscar aquellas que contenían el plásmido recombinante pURI3-Cter-*lp_3485* (**Figura 3**). Se observaron varias colonias positivas (carriles 3, 4, 6, 7 y 8), que, al contener el plásmido con el inserto, presenta un mayor tamaño que las colonias negativas (carril 5). Una de estas colonias positivas, se mandó a secuenciar para confirmar que teníamos el gen sin ninguna mutación.

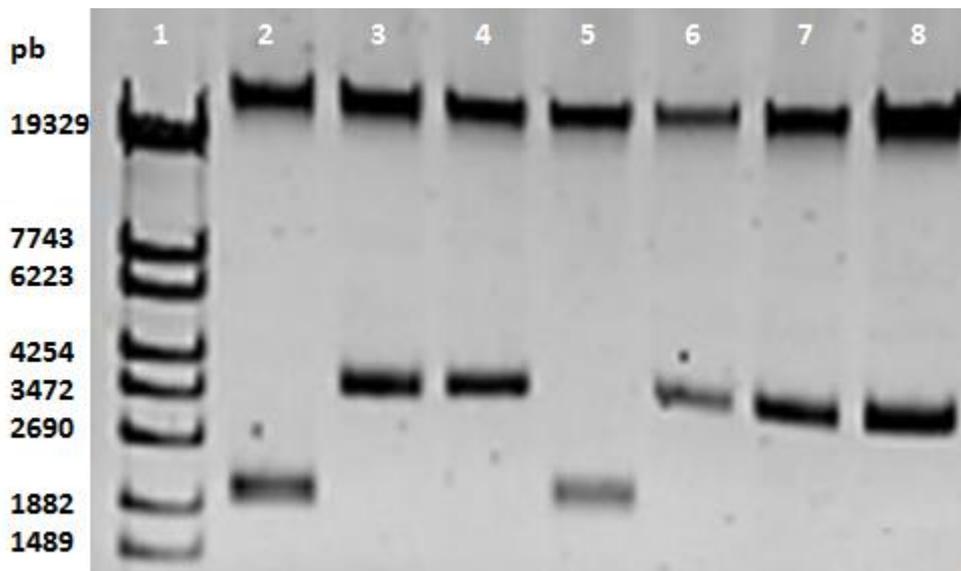


Figura 3. Chequeo de las construcciones pURI3-Cter-*lp_3485* mediante el método de extracción rápida de plásmidos. (1) marcador de peso molecular λ T14 (Takara), (2) control pURI3-Cter, (3-8) ADN plasmídico de las colonias seleccionadas.

A continuación, se secuenció el plásmido recombinante, y una vez verificada la secuencia se transformó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) con plásmido pURI3-Cter-*lp_3485*, con el fin de hiperproducir la proteína correspondiente.

2. Hiperproducción y purificación

La cepa BL21 (DE3) con el plásmido pURI3-Cter-*lp_3485* se cultivó en medio LB con ampicilina (100 µg/ml), y una vez el cultivo alcanzó 0.4 de densidad óptica a 600 nm, se ensayaron distintas condiciones de inducción con IPTG valorando así las condiciones óptimas para la producción de la proteína recombinante. Se observó que las condiciones óptimas de inducción fueron a 22°C con agitación durante 18 horas. Las células se recogieron por centrifugación (apartado 4.2 de materiales y métodos). Una vez rotas con la prensa de *French*, se llevó a cabo la purificación de la proteína Lp_3485 mediante una cromatografía de afinidad a cobalto gracias a la cola de 6 histidinas presente en el extremo C-terminal de la proteína. La proteína se eluyó con imidazol 150 mM y se recogieron fracciones de 1 ml. Se realizó una electroforesis en geles SDS-PAGE con 10% de acrilamida para comprobar la hiperproducción de la proteína recombinante. A continuación, se realizó una diálisis a la proteína para eliminar el imidazol.

En la **Figura 4** se comprobó que tanto en el extracto proteico obtenido de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido recombinante, como en las diferentes fracciones que fueron eluidas de la columna con imidazol, aparece la banda que se corresponde con la proteína Lp_3485 recombinante, con un tamaño aproximado de 83.6 kDa. Por otro lado, como era de esperar, la proteína de interés no aparece en el carril 4, que pertenece a la primera elución de la columna, que contiene otras proteínas que no presentan afinidad por la resina.

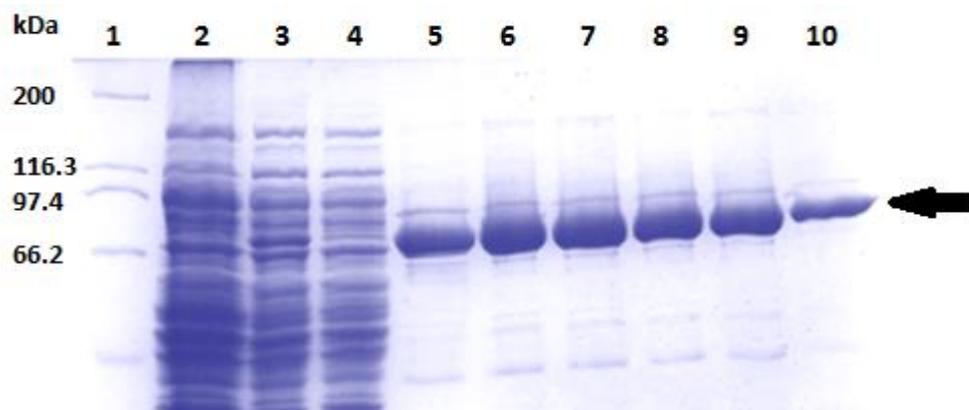


Figura 4. Hiperproducción y expresión de la proteína Lp_3485 recombinante de *Lactobacillus plantarum* en gel SDS-PAGE con un 10% de acrilamida. (1) marcador de peso molecular *Broad Range* (Bio-Rad), (2) Control negativo: extracto proteico de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pURI3-Cter sin inserto, (3) extracto proteico procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) p-URI3-Cter con el inserto del gen de interés, (4) fracción eluida no retenida en la resina de afinidad, (5-10) fracciones eluidas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). La proteína Lp_3485 está señalada con una flecha.

Una vez que se comprobó la pureza de la proteína, se dializó para eliminar los restos de imidazol, ya que puede interferir en los ensayos de actividad enzimática. Tras la diálisis, se calculó el rendimiento de la purificación, es decir, se calculó la cantidad de proteína que se obtuvo a partir del cultivo realizado (1 L). Para ello, se midió la absorbancia a 280 nm, que fue de 1.6. Sabiendo que el coeficiente de extinción molar estimado por *ProtParam* (Wilkins et al., 1999) para la proteína Lp_3485 es de $103000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y su peso molecular de 83.6 kDa y aplicando la ley de Lambert-Beer, se calculó el rendimiento de la purificación como se muestra a continuación.

$$\frac{\text{Abs (280 nm)} * 1 \text{ cm (paso \u00f3ptico)}}{\epsilon} * Pm \text{ (Da)} * n^{\circ} \text{ de fracciones purificadas} = \text{mg prote\u00edna/l}$$

$$\frac{1.564 * 1}{103000} * 83600 * 10 = 12.7 \text{ mg de prote\u00edna Lp}_{3485} \text{ por cada l de cultivo}$$

3. Caracterizaci\u00f3n bioqu\u00edmica de la glicosidasa Lp_3485 de *L. plantarum* WCFS1

3.1. Actividad glicosidasa de Lp_3485

Para conocer los sustratos sobre los que act\u00faa la prote\u00edna Lp_3485, se evalu\u00f3 la actividad glicosidasa frente a 27 sustratos derivados del *p*-nitrofenilo, disponibles comercialmente (**Tabla 4**). Para ello, se utiliz\u00f3 el m\u00e9todo colorim\u00e9trico descrito anteriormente (apartado 5.1 de materiales y m\u00e9todos).

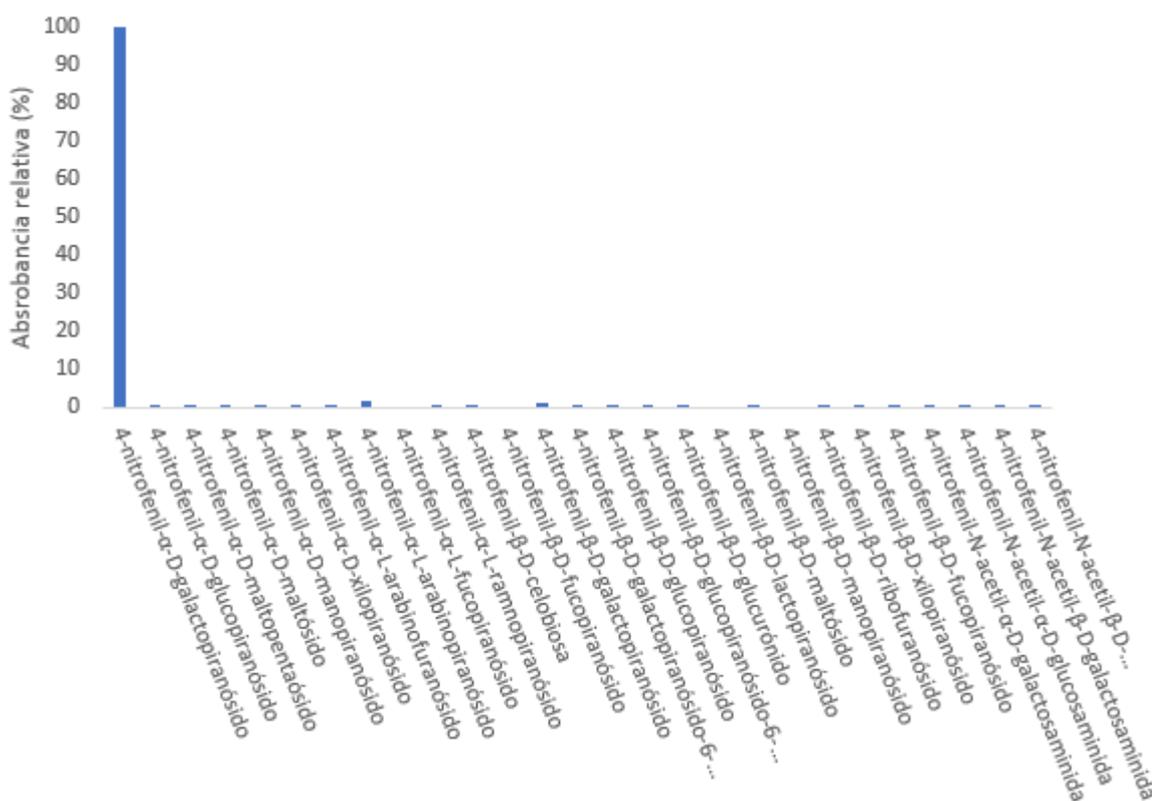


Figura 5. Especificidad de sustrato de Lp_3485 frente a 27 sustratos glicos\u00eddicos derivados del *p*-nitrofenilo (10 mM). La actividad enzim\u00e1tica α -galactosidasa se consider\u00f3 el 100% de la actividad.

Para poder analizar los datos se relativiz\u00f3 dando el valor de 100% a la m\u00e1xima absorbancia obtenida frente a los diferentes sustratos. La prote\u00edna Lp_3485 solo fue activa frente al sustrato *p*NF-\u03b1-D-Gal (**Figura 5**). Por tanto, la caracterizaci\u00f3n de la prote\u00edna se realiz\u00f3 para esta actividad α -galactosidasa.

La prote\u00edna Lp_3485 purificada present\u00f3 una actividad espec\u00edfica α -galactosidasa de 2.56 U/mg ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Por ejemplo, la actividad espec\u00edfica de la α -galactosidasa de *Lactobacillus fermentum* es de 0.21 U/mg, que es una actividad bastante menor a la que presenta nuestra prote\u00edna. Sin embargo, la actividad espec\u00edfica de la α -galactosidasa de

Lactobacillus curvatus es de 5.71 U/mg, siendo una actividad bastante mayor de la que presenta nuestra proteína. Como se puede ver, las actividades de las α -galactosidasas de diferentes especies de *Lactobacillus* son muy diferentes entre ellas (Yoon & Hwang, 2008; Carrera-Silva et al., 2006).

3.2. Parámetros cinéticos de Lp_3485

Se realizaron ensayos cinéticos con la enzima Lp_3485 y el sustrato pNFG. Se determinaron los valores de la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la velocidad máxima (V_{max}) de esta proteína. Se empleó el lector de microplacas y el *software* de análisis de datos Gen 5, versión 2.06, para calcular la absorbancia a 420 nm/min de cada una de las mezclas de reacción que contenían diferentes concentraciones de pNFG. La cinética de la enzima Lp_3485 se correspondía con la clásica de Michaelis-Menten (**Figura 6**). De la ecuación de la hipérbola, $f = 4.609x/(1.966 + x)$ se obtuvieron los valores de la constante de Michaelis-Menten y de la velocidad máxima, siendo K_M 1.966 ± 0.703 mM, V_{max} 43.13 ± 0.555 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y (x) la concentración de pNFG. A partir de estos datos, se calculó la K_{cat} y la eficacia catalítica (K_{cat}/K_M), siendo K_{cat} $3619.247 \text{ min}^{-1}$ y la eficacia catalítica (K_{cat}/K_M) $1840.919 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Estudios previos de caracterización de α -galactosidasas han calculado parámetros cinéticos y obtenido eficacias catalíticas muy superiores, como es el caso de la α -galactosidasa de *Bacillus stearothermophilus*, que presenta una eficacia catalítica de $260000 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Este parámetro es la relación entre la constante catalítica (K_{cat}), que describe la velocidad de la reacción enzimática en condiciones de saturación por sustrato, y la constante de Michaelis-Menten (K_M), que es un indicador de la afinidad de la proteína por el sustrato. En el caso de la proteína Lp_3485 el valor de K_M es de 1.97 mM, siendo mayor que valores hallados para la proteína del ejemplo anterior (0.5 mM), por lo que la proteína Lp_3485 al tener una mayor K_M presenta menos afinidad por el sustrato que la proteína del estudio anterior. En cuanto a la K_{cat} , se obtuvo un valor de 3619.25 min^{-1} es menor que en el caso del estudio anterior (130000 min^{-1}) (Gote et al., 2006).

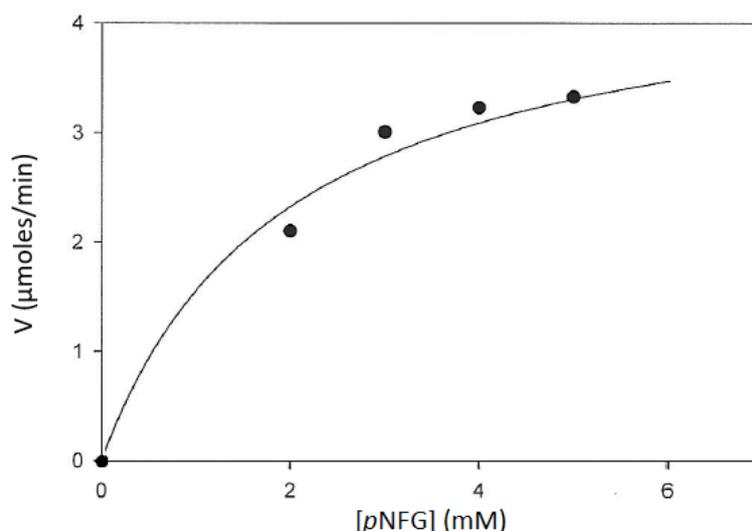


Figura 6. Velocidad (absorbancia 420nm/min) de la reacción enzimática de Lp_3485 de *L. plantarum* WCFS1 frente a diferentes concentraciones de pNFG (0.1 a 6 mM). (—) Ajuste hiperbólico a la ecuación $f = 43.13x/(4.07 + x)$, con un coeficiente de correlación R^2 de 0.9946. V_{max} $43.13 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, K_M 4.07 mM. Las reacciones se llevaron a cabo en condiciones estándar. (•) Media de los triplicados.

3.3. Efecto de aditivos en la actividad α -galactosidasa de Lp_3485

Se estudió el efecto de distintos iones metálicos y otros aditivos sobre la actividad α -galactosidasa de Lp_3485 (apartado 5.3 de materiales y métodos). Como se puede observar en la **Figura 7**, el Fe^{2+} y el Mn^{2+} son los dos iones que son capaces de aumentar la actividad enzimática, de forma que su presencia eleva la actividad relativa de la enzima a un 139% y un 145% respectivamente, respecto al control (sin aditivos), esto coincide con otros experimentos realizados en *Lactobacillus reuteri*, en el que también aumenta la actividad enzimática en presencia de estos dos iones metálicos (Ibrahim et al., 2010). Otros iones como el K^+ y el Mg^{2+} prácticamente no influyen en la actividad enzimática, ya que su presencia mantiene una actividad relativa de la enzima a un 91% y un 71% respectivamente, con respecto al control (sin aditivo), esto se corresponde con la actividad enzimática de otras bacterias termófilas en las que su actividad α -galactosidasa tampoco se ve afectada por estos dos iones metálicos (Schröder et al., 2017). Por último, destacar los iones Hg^{2+} y Cu^{2+} , que inhiben completamente la actividad de la enzima con respecto al control (sin aditivo), esto se corresponde con otras α -galactosidasas como la de *Bacillus stearothermophilus*, esta inhibición sugiere la reacción de estos iones con grupos tiol y/o grupos carboxilo, amino e imidazol de la histidina que se encuentra en el centro activo de esta enzima (Gote et al., 2006).

En el caso de los surfactantes no iónicos ensayados, el Triton-100 y el Tween 20 aumentan la actividad enzimática, mientras que el Tween 80 mantiene prácticamente la actividad de la enzima con respecto al control (sin aditivo). La diferencia de actividad que presentó la enzima entre el Tween 20 y el Tween 80 probablemente se debe a la concentración de polisorbato monolaurato que lleva cada uno, ya que en el Tween 20 constituye un 40-60% de la mezcla y en el Tween 80 constituye más del 60% de la mezcla. Estos resultados se corresponden con los resultados obtenidos en un ensayo de α -galactosidasa de bacterias termófilas, a excepción del Tween 80 en el que en este ensayo también presenta aumentada la actividad enzimática (Schröder et al., 2017).

En lo referente a los agentes caotrópicos, la urea y el DMSO disminuyen en un 15% la actividad de la enzima. Al añadir a la reacción el agente quelante de cationes divalentes EDTA, aumenta la actividad de la enzima, esto tiene que ver con que las α -galactosidasas no requieren iones metálicos para la catálisis. La adición del agente reductor de enlaces disulfuro β -mercaptoetanol aumenta la actividad de la enzima. Estos resultados guardan reacción con el estudio que se realizó con α -galactosidasas de bacterias termófilas en el que el EDTA y el β -mercaptoetanol también aumenta la actividad enzimática (Schröder et al., 2017).

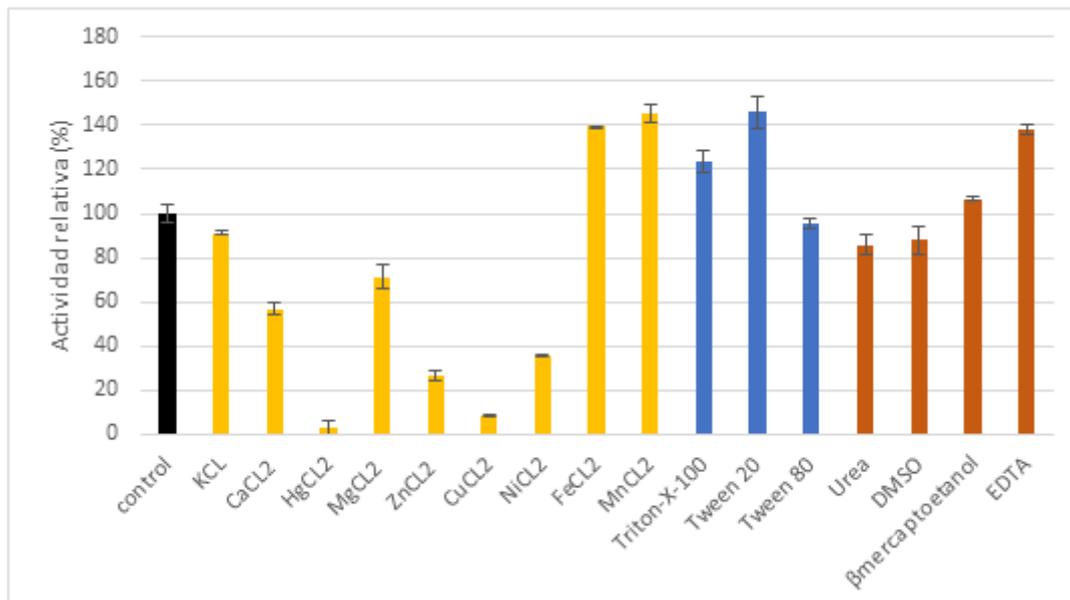


Figura 7. Efecto de distintos aditivos (concentración final 1 mM) sobre la actividad α -galactosidasa de Lp_3485 de *L. plantarum* WCFS1. (■) Control sin aditivo, (■) iones metálicos, (■) detergentes, (■) agente quelante de cationes divalentes (EDTA) y agente reductor (β -mercaptoetanol). Los experimentos se realizaron por triplicado, en condiciones estándar. Las barras de error representan las desviaciones estándar, estimada de los tres ensayos independientes. La actividad enzimática control (sin aditivo) se consideró el 100% de la actividad.

3.4. Efecto del pH

Se ensayó la actividad enzimática de la proteína Lp_3485 a diferentes valores de pH. El sustrato empleado fue el pNFG, y el intervalo de pH ensayado fue de 3.0 a 9.0 (apartado 5.4 de materiales y métodos). Los datos muestran el valor medio de tres experimentos independientes, junto con su error relativo.

Atendiendo a la **Figura 8**, se puede observar que el pH óptimo de la proteína Lp_3485 es 6.5; manteniéndose una actividad relativa superior al 90% en el intervalo de pH 4.0 a 6.5. Para el pH 7.0 la actividad relativa de la enzima disminuye hasta aproximadamente el 80%, y a pH superiores la actividad disminuye drásticamente. Así, a pH 8.0 la actividad relativa es del 3.5% y a pH 9 es de 7%, de igual forma a pH 3.0 la actividad disminuye drásticamente, presentando una actividad relativa del 3%.

El pH óptimo de α -galactosidasas de otras especies de *Lactobacillus* varía desde de un pH próximo al neutro a un pH ácido. Para *Lactobacillus curvatus* se observó que presenta un pH óptimo a 6.5, coincidiendo con el pH óptimo que se obtuvo para la proteína Lp_3485, sin embargo, el pH óptimo de las α -galactosidasas de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus fermentum*, éstas presentan un pH óptimo más ácido en torno a 4.8 (Wang et al., 2014; Yoon & Hwang, 2008; Carrera-Silva et al., 2006).

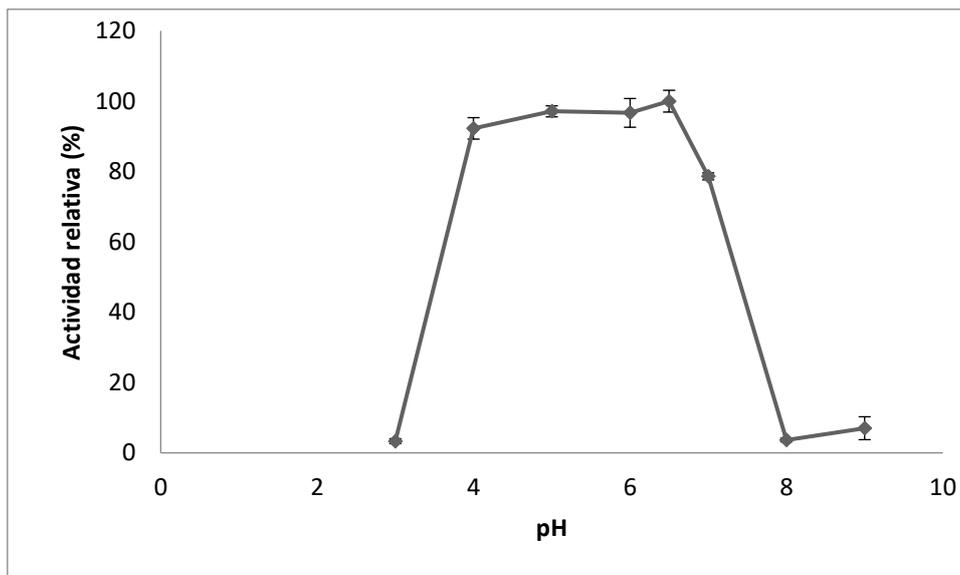


Figura 8. Efecto del pH sobre la actividad de la proteína Lp_3485 de *L. plantarum* WCFS1. Los ensayos se realizaron en condiciones estándar, utilizando 4 μg de proteína. Los datos muestran el valor medio de tres experimentos independientes, junto con su error relativo. La actividad máxima observada se consideró el 100%.

3.5. Efecto de la temperatura

Se ensayó la actividad enzimática de la proteína Lp_3485 a diferentes temperaturas. El sustrato empleado fue el pNFG, y el intervalo de pH ensayado fue de 4°C a 65°C (apartado 5.4 de materiales y métodos). Los datos muestran el valor medio de tres experimentos independientes, junto con su error relativo.

Con respecto al efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática (**Figura 9**), los resultados muestran que la proteína Lp_3485 purificada presenta una actividad buena a temperaturas inferiores a los 30°C, siendo máxima a los 22°C. Esta actividad α -galactosidasa disminuye ligeramente, hasta un valor del 75% de actividad relativa, a los 30°C. A 4°C la actividad relativa se mantiene en un 96%, mientras que a temperaturas superiores a los 30°C, la enzima pierde actividad, no alcanzando, en ninguno de los casos, la mitad de la actividad relativa.

Comparando la temperatura óptima de esta α -galactosidasa con las temperaturas óptimas de otras α -galactosidasas de otras especies de *Lactobacillus*, se observó que la temperatura óptima para la α -galactosidasa de *Lactobacillus curvatus* es de 37°C y para *Lactobacillus reuteri* entre 30°C y 35°C, mientras que para la α -galactosidasa de *Lactobacillus fermentum* es superior a ellas, siendo la temperatura óptima de esta enzima los 50°C. Todas ellas superiores a la temperatura óptima de la α -galactosidasa de *L. plantarum* ensayada en este estudio, que fue de 22°C (Wang et al., 2014; Yoon & Hwang, 2008; Carrera-Silva et al., 2006).

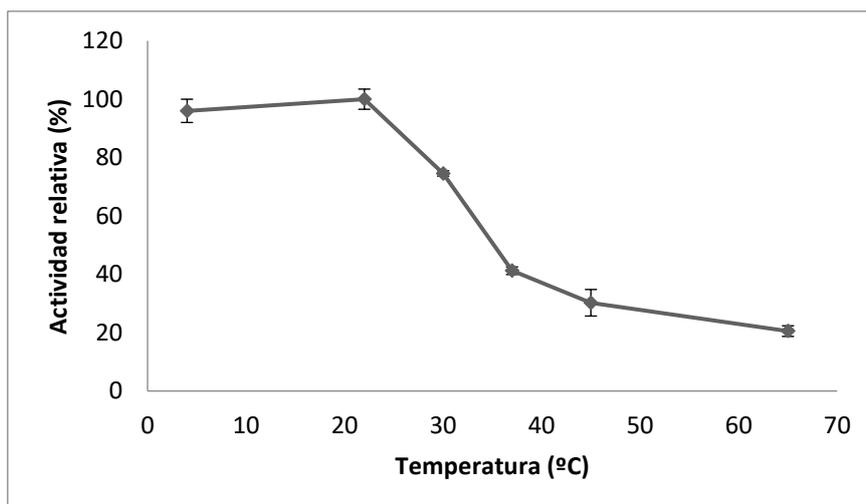


Figura 9. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la proteína Lp_3485 de *L. plantarum* WCFS1. Los ensayos se realizaron en condiciones estándar, utilizando 4 µg de proteína. Los datos muestran el valor medio de tres experimentos independientes, junto con su error relativo. La actividad máxima observada se consideró el 100%.

3.6. Estabilidad térmica de la α -galactosidasa Lp_3485

Se analizó la estabilidad térmica de la proteína Lp_3485 de *L. plantarum* WCFS1, en un intervalo de temperaturas comprendido entre 22°C y 65°C durante un periodo de incubación de 24 horas. El ensayo se realizó en condiciones estándar utilizando 4 µg de la proteína. La actividad de la proteína a 4°C (sin incubación) se consideró el valor 100% de la actividad relativa.

Los resultados de la **Figura 10** reflejan que esta α -galactosidasa pierde por completo su actividad a los 30 minutos de incubación a las temperaturas de 37°C, 45°C y 65°C. En el caso de la incubación a 30°C, a los 30 minutos la proteína ya presenta una actividad relativa del 40%, que va disminuyendo hasta tener un 20% de actividad relativa a las 6 horas, y que a las 24 horas ya no presenta actividad. Sin embargo, la proteína presenta estabilidad térmica a los 22°C, de manera que, a esta temperatura, su actividad relativa se mantiene en torno a un 50% de actividad relativa a lo largo de las 24 horas de incubación, esto quiere decir que esta proteína es termolábil.

Comparando los datos obtenidos para la Lp_3485 con los de una α -galactosidasa de *Lactobacillus curvatus*, ésta mantiene una actividad relativa por encima del 60% en el intervalo de temperaturas de los 20°C a los 40°C, indicándonos que es termoestable en un intervalo más amplio de temperaturas, mientras que la Lp_3485 solo es estable a 22°C, lo que nos indica que es termolábil (Yoon & Hwang, 2008).

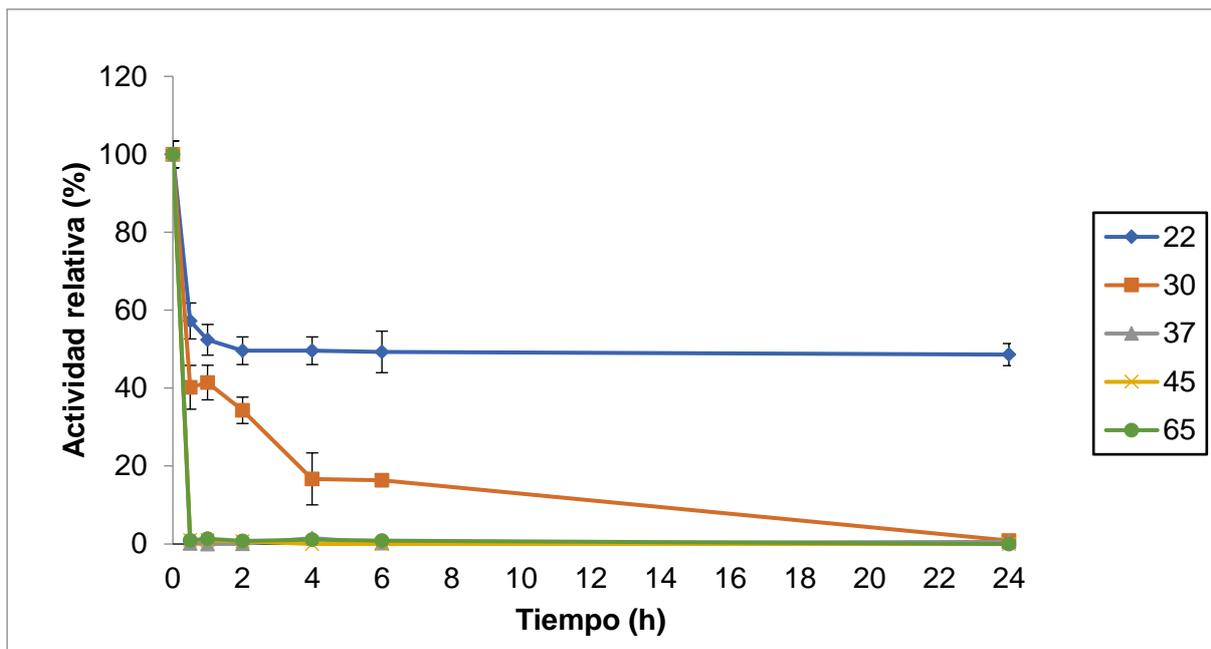


Figura 10. Ensayos de estabilidad térmica de la proteína Lp_3485 de *L. plantarum* WCFS1. Las medidas de la actividad enzimática se realizaron a cinco temperaturas diferentes: (●) 22°C, (■) 30°C, (▲) 37°C, (×) 45°C y (●) 65°C. Durante un periodo de incubación de 24 horas. El ensayo se realizó en condiciones estándar, utilizando 4 µg de proteína. Los datos representan los valores medios de los tres experimentos independientes, incluyéndose el error relativo. La actividad de la enzima a 4°C (sin incubación) se consideró el valor de 100% de actividad relativa.

Conclusiones

Los resultados en este trabajo permiten concluir que: (i) se ha clonado el gen *lp_3485* de *L. plantarum* WCFS1 en el vector de expresión pURI3-Cter e hiperproducir de forma heteróloga y purificar la proteína Lp_3485; (ii) se ha comprobado que la proteína Lp_3485 es una α -galactosidasa, con una actividad específica de 2.56 U/mg y una eficacia catalítica de 1840.92 $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$; (iii) la máxima actividad relativa se encontró en temperaturas inferiores a los 30°C, y de pH 4.0 a 6.5; (iv) la proteína Lp_3485 es termolábil, ya que mantiene una actividad relativa en torno al 50% a los 22°C, mientras que a temperaturas superiores pierde actividad; (v) en cuanto a la adición de aditivos, los detergentes aumenta la actividad de la proteína, en cuanto la adición de iones metálicos, el Fe^{2+} y Mn^{2+} aumentan la actividad de la enzima, el K^+ y el Mg^{2+} no afectan a la actividad de la proteína, mientras que el Hg^{2+} y el Cu^{2+} ejercen un efecto negativo sobre la actividad de la proteína, el β -mercaptoetanol y el EDTA incrementan la actividad de la proteína.

Bibliografía

- Anisha, G., Jhon, R., & Prema, P. (2011). Substrate specificities and mechanism of action of multiple α -galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus*. *Food Chemistry*, 124, 349-353.
- Bachmann, H., Molenaar, D., Branco dos Santos, F., & Teusink, B. (2017). Experimental evolution and the adjustment of metabolic strategies in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, En revisión.
- Bhatia, Y., Mishra, S., & Bisaria, V. (2002). Microbial beta-glucosidases: cloning, properties and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22, 375-407.
- Bojarova, P., & Kren, V. (2009). Glycosidases: a key to tailored carbohydrates. *Trends in Biotechnology*, 27, 199-209.
- Cantarel, B., Coutinho, P., Rancurel, C., Bernad, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The carbohydrate-active enZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 37, D233-D238.
- Carrera-Silva, E. A., Silvestroni, A., LeBlanc, J. G., Piard, J. C., Savoy de Giori, G., & Sesma, F. (2006). A thermostable α -galactosidase from *Lactobacillus fermentum* CRL722: genetic characterization and main properties. *Current Microbiology*, 53, 374-378.
- Curiel, J., de las Rivas, B., Mancheño, J., & Muñoz, R. (2011). The pURI family of expression vectors: a versatile set of ligation independent cloning plasmids for producing recombinant His-fusion proteins. *Protein Expression and Purification*, 76, 44-53.
- de las Rivas, B., Curiel, J., Mancheño, J., & Muñoz, R. (2007). Expression vectors for enzyme restriction- and ligation-independent cloning for producing recombinant his-fusion proteins. *Biotechnology Progress*, 23, 680-686.
- de Man, J., Rogosa, M., & Sharpe, E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., . . . Blattner, F. (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *Journal of Bacteriology*, 190, 2597-2606.
- Gote, M. M., Khan, M. I., Gokhale, D. V., Bastawde, K. B., & Khire, J. M. (2006). Purification, characterization and substrate specificity of thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). *Process Biochemistry*, 41, 1311-1317.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557-580.
- Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. (2017). Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Research*, 6, 751-759.
- Ibrahim, S., Alazzeah, A., S., A. S., Song, D., Shahbazi, A., & AbuGhazaleh, A. (2010). Enhancement of alpha- and beta-galactosidase activity in *Lactobacillus reuteri* by different metal ions. *Biological Trace Element Research*, 136, 106-116.

- Kleerebezen, M., Boekhorst, J., Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O., Leer, R., . . . Ursing, B. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 100, 1990-1995.
- Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Sanders, S., Reiking, J., Savchenko, A., Arrowsmith, C., . . . Yakunin, A. (2005). Enzyme genomics: Application of general enzymatic screens to discover new enzymes. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 263-279.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P., McWilliam, H., . . . Higgins, D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 158, 192-199.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42, 490-495.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., . . . Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 15611-15616.
- Michlmayr, H., & Kneifel, W. (2014). β -glucosidase activities of lactic acid bacteria: mechanisms, impact on fermented food and human health. *FEMS Microbiol Letter*, 352, 1-10.
- Molenaar, D., Bringel, F., Schuren, F., de Vos, W., Siezen, R., & Kleerebezem, M. (2005). Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *Journal of Bacteriology*, 187, 6119-6127.
- Pal, S., Banik, S., Ghorai, S., Chowdhury, S., & Khowala. (2010). Purification and characterization of a thermostable intra-cellular beta-glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. *Bioresource Technology*, 101, 2412-2420.
- Poli, A., Nicolaus, B., Fiorentino, G., Anzelmo, G., Tommonaro, G., & Di Donato, P. (2011). Polysaccharides from wastes of vegetable industrial processing: new opportunities for their eco-friendly re-use. *Biotechnology of biopolymers*, 33-56.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual. Vol 1-3*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. N.Y., USA.
- Santhya, T., & Khan, M. (2014). Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry. *Journal of Food Science*, 79, R2149-R2156.
- Schröder, C., Janzer, V. A., Schirrmacher, G., Claren, J., & Antranikian, G. (2017). Characterization of two novel heat-active α -galactosidases from thermophilic bacteria. *Extremophiles*, 21, 85-94.
- Sekar, V. (1987). A rapid screening procedure for the identification of recombinant bacterial clones. *Biotechniques*, 5, 11-13.

- Siezen, R., & van Hylckama Vlieg, J. (2011). Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories*, 10, S1-S3.
- Studier, F., Rosenberg, A., Dunn, J., & Dubenforff, J. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*, 185, 60-89.
- Van den Nieuwboer, M., Van Hemert, S., Claassen, E., & de Vos, W. (2016). *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and its host interaction: a dozen years after the genome. *Microbial Biotechnology*, 9, 452-465.
- Vaquero, I., Marcobal, A., & Muñoz, R. (2004). Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 199-204.
- Wang, Y., Black, B., Curtis, J. M., & Gänzle, M. (2014). Characterization of α -galactooligosaccharides formed via heterologous expression of α -galactosidases from *Lactobacillus reuteri* in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 2507-2517.
- Wilkins, M., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J., Williams, K., Appel, R., & Hochstrasser, D. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in Molecular Biology*, 112, 531-552.
- Yoon, M. Y., & Hwang, H. J. (2008). Reduction of soybean oligosaccharides and properties of alpha-D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. *Food Microbiology*, 25, 815-823.