



TRABAJO FIN DE GRADO

Ciencias de la Alimentación

Producción heteróloga y caracterización bioquímica de una β -D-glucosidasa de *Oenococcus oeni* PSU-1

Elena de Antonio López

Tutores: Blanca de las Rivas y Rosario Muñoz

Curso 2016-2017

INDICE

Resumen y Abstract	Pág. 3.
1. Introducción sobre antecedentes	Pág. 5.
2. Objetivos y plan de trabajo	Pág. 7.
3. Procedimientos: Materiales y Métodos	
3.1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	Pág. 8.
3.2. Medios y condiciones de cultivo	Pág. 8.
3.3. Técnicas ADN	
3.3.1. Extracción ADN cromosómico	Pág. 9.
3.3.2. Extracción ADN plasmídico	Pág. 9.
3.3.3. Amplificación de secuencias de ADN mediante PCR	Pág. 10.
3.3.4. Secuenciación de ADN y análisis de la información	Pág. 10.
3.3.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	Pág. 11.
3.3.6. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	Pág. 11.
3.3.7. Método de clonación independiente de ligación (LIC)	Pág. 11.
3.3.8. Transformación genética en <i>E.coli</i>	Pág. 13.
3.4. Técnicas de proteínas	
3.4.1. Hiperproducción de la proteína recombinante	Pág. 13.
3.4.2. Purificación de la proteína recombinante	Pág. 13.
3.4.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	Pág. 14.
3.5. Ensayos de actividad enzimática: Caracterización bioquímica	
3.5.1. Efecto del pH	Pág. 15.
3.5.2. Efecto de la temperatura	Pág. 15.
3.5.3. Efectos de aditivos	Pág. 16.
3.5.4. Termoestabilidad	Pág. 16.
4. Resultados y Discusión	
4.1. Búsqueda <i>in silico</i> de una β - glucosidasa de <i>O. oeni</i>	Pág. 17.
4.2. Clonación y transformación del gen	Pág. 18.
4.3. Hiperproducción y purificación	Pág. 20.
4.4. Caracterización bioquímica	Pág. 22.
5. Conclusiones	Pág. 25.
6. Bibliografía	Pág. 27.

Resumen

El uso de enzimas glicosidasas en la industria alimentaria para la mejora de la calidad es muy habitual. En el caso del vino se han utilizado ampliamente enzimas con actividad β -glucosidasa con el fin de liberar compuestos aromáticos. Estas enzimas suelen tener origen fúngico y en numerosas ocasiones pierden gran parte de su actividad en las condiciones presentes en el vino (pH ácido, etanol, etc). *Oenococcus oeni* es la bacteria mejor adaptada a las condiciones de vinificación, siendo la bacteria responsable de la fermentación maloláctica que ocurre durante la elaboración del vino. Esta bacteria presenta actividad β -glucosidasa. En este trabajo se ha identificado y caracterizado la β -Dglucosidasa (BG) de *O. oeni* PSU-1 codificada por el gen *OEOE_1569*. La actividad de la proteína *OEOE_1569* se evaluó mediante un sustrato sintético demostrándose que presenta actividad β -glucosidasa. La enzima se caracterizó bioquímicamente y los resultados obtenidos muestran que presenta alta actividad a pH ácido, manteniendo dicha actividad en un amplio intervalo de temperatura. También se analizó su comportamiento frente a diversos aditivos presentes en el medio. Los resultados revelaron como la mayoría de los aditivos ensayados resultan prácticamente indiferentes sobre la actividad del enzima. Destacan el ión metálico HgCl_2 y el detergente Tween 80 por disminuir considerablemente dicha actividad y el ión metálico MgCl_2 , junto con el detergente Tween 20, que aumentaron la actividad del enzima.

Abstract

Glycosidic enzymes are commonly used in the food industry for quality improvement. In the case of wine, enzymes with β -glucosidase activity have been widely used in order to release aromatic compounds. These enzymes usually have fungal origin and, in many cases, lose much of their activity in the conditions present in wine (acidic pH, ethanol, etc.). *Oenococcus oeni* is the best adapted to the vinification conditions bacterium, being the malolactic fermentation responsible that occurs during winemaking. This bacterium has β -glucosidase activity. In this work the β -D-glucosidase (BG) of *O. oeni* PSU-1 encoded by the *OEOE_1569* gene has been identified and characterized. The activity of the *OEOE_1569* protein was evaluated demonstrating β -glucosidase activity with a synthetic substrate. The enzyme was biochemically characterized and results showed high activity at acidic pH keeping said activity over a wide temperature range. His behavior was also analyzed against various additives present in the medium. Results revealed how most of the additives tested are practically indifferent to the enzyme activity. HgCl_2 metal ion and Tween 80 detergent were particularly notable for considerably reducing the enzymatic activity and MgCl_2 metal ion, together with Tween 20 detergent, which increased the activity of the enzyme.

Palabras clave:

Oenococcus oeni

pURI3-Cter

LIC: clonación independiente de ligación

β -D-glucosidasa

1. Introducción sobre antecedentes

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: almidón, sacarosa, glucosa, fructosa, sorbitol, pectina, celulosa, hemicelulosa, quitina y polisacáridos derivados de 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. Por ejemplo la oleuropeina, un glucósido fenólico responsable del amargor de las olivas sin procesar, debe sufrir una degradación durante la preparación de las aceitunas de mesa (Ghabbour et al., 2011), por otro lado, las isoflavonas, presentes en los granos de soja en forma de β -glucósidos (genisteina y daidzeina), se ha observado que poseen efectos beneficiosos para la salud una vez libres tras ser hidrolizadas durante la fermentación de la leche de soja (Cho et al., 2012), en el caso de los antocianos flavonoideos, pigmentos naturales de muchas frutas y verduras, pueden llevar cabo su papel antioxidante una vez liberados tras la hidrólisis de su β -glucósido. Los glicósidos aromáticos son moléculas volátiles unidas a una molécula de azúcar (como glucosa o algún disacárido). La presencia del azúcar impide la volatilización de la molécula aromática, lo que significa que el glicósido por sí mismo no tiene aroma (Ley and Yates, 2008). Este es el caso de los terpenos presentes en el vino que son hidrolizados por acción de las β -glucosidasas durante la fermentación, liberándose así los compuestos aromáticos. En muchos casos, durante el procesado de los alimentos se utilizan diferentes estrategias para liberar estos compuestos influyendo así en sus características organolépticas así como en diferentes propiedades beneficiosas para la salud. Esta hidrólisis se puede llevar a cabo por métodos químicos y enzimáticos. 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 and Kren, 2009).

Las glicosil hidrolasas (GH) 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. Sin embargo, en determinadas condiciones, pueden mediar la reacción inversa, catalizando la formación de enlaces glicosídicos. La clasificación de las GH se basa en su secuencia aminoacídica, que a su vez determina la estructura terciaria de la proteína y por lo tanto su mecanismo de acción. Hoy se reconocen 133 familias de GH. De entre ellas, la familia 1 incluye enzimas con actividades muy interesantes para la industria alimentaria, tales como β -glucosidasas y β -galactosidasas entre otras.

Las β -glucosidasas constituyen un grupo de enzimas muy bien caracterizado ya que han sido sujeto de muchos estudios por su importancia en múltiples procesos biológicos y aplicaciones biotecnológicas, como la disminución de la toxicidad de alimentos o la conversión de biomasa y recientemente se están utilizando para mejorar las características sensoriales y nutricionales de alimentos y bebidas.

Actualmente, en la elaboración del vino, con el fin de incrementar la liberación de aromas se usan preparados enzimáticos comerciales de origen fúngico principalmente procedentes de *Aspergillus spp.* La composición de estos preparados no está en muchas ocasiones bien definida tratándose en realidad de una mezcla de glucosidasas que pueden dar lugar a reacciones colaterales no deseadas. Además, aunque resultan eficaces en la liberación de aromas, las actividades enzimáticas de estos cócteles se inhiben parcialmente por la presencia de glucosa y pH ácido.

Una alternativa al uso de estos preparados enzimáticos es el uso de enzimas específicas de levaduras y bacterias de ecosistemas vínicos que se encuentran adaptadas a su medio ecológico.

Numerosos estudios revelaron que *O. oeni*, uno de los pocos microorganismos que no solo sobreviven, si no que proliferan activamente en el vino, da lugar a mejoras en la calidad del vino en lugar de favorecer su deterioro debido a que esta bacteria puede hidrolizar precursores de aromas glicosilados durante el transcurso de la fermentación maloláctica (FML) del vino (Matthews et al., 204). *O. oeni* tiene una extensa serie de vías metabólicas y enzimas que generan compuestos secundarios volátiles a concentraciones muy por encima de su umbral de detección de olores, incluyendo ésteres de etilo y acetato, alcoholes superiores, carbonilos, ácidos grasos volátiles y compuestos de azufre (Siebert et al., 2005). Por todo ello, la búsqueda de una β -glucosidasa de *O. oeni* con adecuadas características bioquímicas podría resultar muy útil para la mejora de las características organolépticas del vino mediante la liberación de compuestos aromáticos.

2. Objetivos y plan de trabajo:

Las β -glucosidasas participan en numerosos procesos biológicos y se han utilizado en distintas aplicaciones biotecnológicas, de ahí la importancia de este estudio. En concreto en el proceso de vinificación se utilizan para la liberación de compuestos aromáticos glicosilados. *O. oeni* es la bacteria responsable de la FML del vino y se trata de la bacteria mejor adaptada a las exigentes condiciones de este medio (bajo pH, presencia de etanol, baja concentración de azúcares, etc.)

En este trabajo se plantea la búsqueda de una β -glucosidasa que pueda desarrollar su actividad en estas condiciones de vinificación. Por ello la hipótesis de partida es que *O. oeni* puede poseer proteínas similares a β -glucosidasas ya descritas en otras bacterias ácido lácticas (BAL) y que presentan adecuadas características tecnológicas, como es la β -glucosidasa de *Lactobacillus brevis* descrita recientemente. Por todo ello el objetivo general de este trabajo es la identificación y caracterización de una β -glucosidasa de *O. oeni* con buenas características bioquímicas para su utilización en la elaboración del vino.

Objetivos concretos:

1. Identificación del gen *OEOE_1569*
2. Clonación e hiperexpresión del gen *OEOE_1569*
3. Producción y purificación de la proteína *OEOE_1569*
4. Caracterización bioquímica de la proteína *OEOE_1569*

3. Procedimientos: Materiales y Métodos

3.1. 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 la tabla 1.

Tabla 1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos sintéticos empleados

Estirpe bacteriana	Referencia
<i>Oenococcus oeni</i> PSU-1	Universidad de California 1958
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Hanahan, 1983
BL21(DE3)	Hanahan, 1983

Tabla 2. Plásmidos oligonucleótidos sintéticos empleados

Plásmido	Genotipo/ Fenotipo relevante	Referencia
pURI3- Cter	Ap ^R (resistencia a Ampicilina)	Curiel <i>et al.</i> 2011
Puri3-Cter-OEOE_1569	Ap ^R (resistencia a Ampicilina)	Este estudio

Tabla 3. Oligonucleótidos sintéticos empleados

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Referencia
1798	AACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCTAAGATTACTTCAATTATTTTC	Este estudio
1799	CTATTAATGATGATGATGATGATGACTTTGATTGGCGAGTTTAATAAAT	Este estudio

3.2. Medios y condiciones de cultivo

La cepa de *O. oeni* se cultivó a 30 °C sin agitación en medio líquido MLO (*Leuconostoc Oenus* Medium).

Las cepas de *E. coli* se cultivaron rutinariamente a 37 °C con agitación en medio líquido de Luria-Bertani (LB) o añadiendo agar al 1,5 % para los cultivos en medio sólido.

3.3. Técnicas ADN

3.3.1. Extracción ADN cromosómico

El ADN cromosómico de *O. oeni* se aisló utilizando el protocolo descrito por Sambrook y sus colaboradores en 1989 (Sambrook et al., 1989). La bacteria fue cultivada en 10 mL de medio MLO durante 18 horas. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 12500 x durante 5 min. Las células sedimentadas se lavaron una vez en 500 µL de TES (Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM; NaCl 100 mM). El sedimento se resuspendió en 600 µL de solución TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM) conteniendo 10 mg/mL de lisozima (Sigma, Alemania) y se incubó durante 30 min a 37 °C.

Para producir la lisis celular, se adicionaron 70 µL de SDS (Sigma, Alemania) al 10 % y 10 µL de proteinasa K (20 mg/mL) (Sigma, Alemania) y se incubó a 37 °C durante 30 min. Una vez lisado el cultivo, se desproteinizó el ADN mediante dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

Con el fin de precipitar el ADN cromosómico, se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C) y el tubo se agitó lentamente hasta que apareció el ADN como un precipitado. El ADN se disolvió en tampón TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM) (Sambrook *et al.*, 1989).

3.3.2. Extracción ADN plasmídico

Para verificar que las células de *E.coli* se habían transformado con los plásmidos recombinantes que contenían los genes de interés, se realizó un método rápido de extracción de plásmidos a partir de colonias crecidas en medio sólido (Sekar, 1987). Para llevar a cabo la extracción del ADN plasmídico, se tomó la colonia con un apuntes estéril y se resuspendió en 20 µL de una solución con lisozima 0,5 mg/mL, EDTA 25 mM, pH 8, Tris HCl 25 mM pH 7,5, RNasa 0,1 mg/mL, azul de bromofenol 0,02 % y glicerol 0,015 %. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, posteriormente se añadieron 5 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente. La mezcla se centrifugó a 12500 x g durante 2 min para que se separaran las dos fases. De la fase superior acuosa, que contiene el ADN, se cargaron 10 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 de los genes clonados.

Una vez seleccionadas las colonias con el plásmido correctamente transformado se llevó a cabo un método de extracción de ADN plasmídico utilizando el sistema comercial FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN® Biotech corp) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.3. Amplificación de secuencias de ADN mediante PCR

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L, conteniendo: la ADN polimerasa *PrimeSTAR HM (Takara)* a una concentración final de 1,25 U/ μ L, el tampón de reacción recomendado para esta polimerasa con MgCl₂ 5mM, desoxinucleótidos (dNTPs) a una concentración final de 0,2 mM, ADN molde y los oligonucleótidos a una concentración final de 0,3 μ M como cebadores.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en los termocicladores *Personal* y *Mastercycler gradient* (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).

3.3.4. Secuenciación de ADN y análisis de la información

La secuenciación de ADN se realizó en la empresa Secugen (<http://www.secugen.es>)

El programa BLAST (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>), herramienta perteneciente al NCBI se utilizó para la búsqueda de secuencias similares depositadas en las bases de datos de EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/services>) y GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Los alineamientos de las secuencias se llevaron a cabo mediante la herramienta Clustal Omega, proporcionada por el EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

El cálculo de del peso molecular y el coeficiente de extinción molar (ϵ) se analizó con el programa EXPASY (<http://web.expasy.org/protparam/>).

3.3.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para resolver las muestras de ADN se utilizaron geles de agarosa al 0,7 % en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 2 mM, pH 8,0). El mismo tampón se utilizó como electrolito. A las muestras se les añadió un 20 % de su volumen de una solución compuesta por azul de bromofenol al 0,25 % y glicerol al 30 % en agua. La electroforesis se realizó a 110 V y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con GelRedTM Nucleic acid Gel Stain (Biotium) siguiendo las indicaciones del proveedor. Los fragmentos de ADN se vieron utilizando radiación ultravioleta ($\lambda = 302$ nm) en un sistema de captura y análisis de imágenes ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad). Como marcadores de tamaño, se utilizaron ADN del fago Lambda cortado como EcoT14 (Takara) y el marcador de 100 pb *ladder* (Biotools).

3.3.6. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de ADN a partir de geles de agarosa se llevó a cabo mediante el Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) siguiendo las indicaciones suministradas por el proveedor.

3.3.7. Método de clonación independiente de ligación (LIC)

En este trabajo se utilizó el vector de expresión pURI3-Cter de la familia pURI (Curiel et al., 2011) para realizar 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 presenta 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.

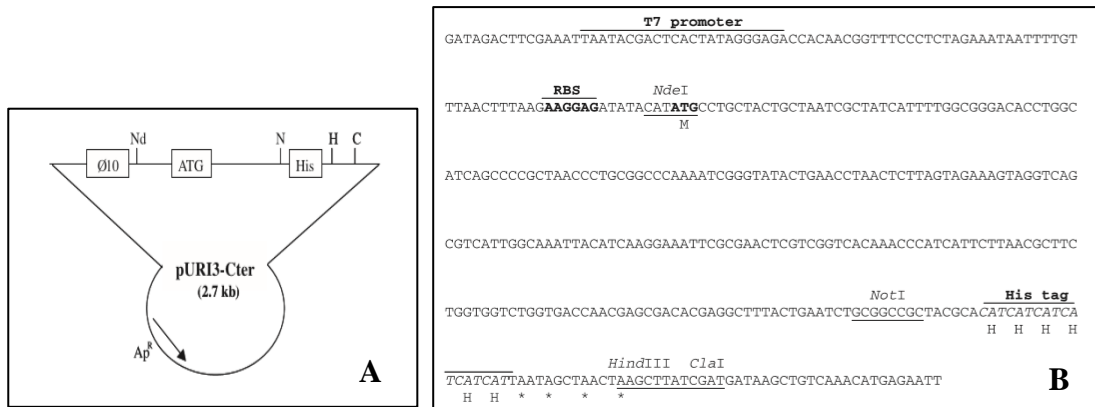


Figura 1: (A) Representación esquemática del vector de expresión pURI3-Cter (2642 bp). (B) Secuencia del vector pURI3-Cter, donde se muestra la cola de 6 His en el extremo C- terminal seguido por los cuatro codones de Stop, que aparecen señalados con asteriscos. La secuencia líder de expresión se encuentra controlada por la polimerasa T7 promotor Ø 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 1798 y 1799 (**Tabla 3**) diseñados con extremos 5' complementarios a regiones presentes en el vector de expresión pURI-3Cter. 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 al 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 los plásmidos artificiales no presentan secuencias metiladas, no son digeridos por dicha enzima. La enzima se inactivó mediante una incubación a 65 °C durante 25 min, y una vez inactivada, las células competentes de E. coli DH10B se transformaron con el producto de la digestión (ver apartado 3.3.8. de Materiales y Métodos). Como medio de selección se utilizaron placas de LB suplementadas con Ampicilina a una concentración de 100 µg/L. Las células transformadas se chequearon como se detalla en el apartado 3.3.2. de Materiales y Métodos.

3.3.8. Transformación genética en *E.coli*

Para la transformación genética de *E. coli*, se utilizaron células competentes obtenidas mediante el método de Cloruro de Rubidio (Hanahan, 1983), que se conservaban a -80°C en una suspensión con glicerol. La transformación de las células se realizó incubándolas con el plásmido (100 ng) durante 15 min en hielo, seguido de 3 min a 37 °C y de 5 min en hielo. Posteriormente, se añadió 1 mL de LB a las células y se incubaron a 37 °C durante una hora para dar tiempo a la expresión de la resistencia al antibiótico. Terminada la incubación se seleccionaron las células transformadas en placas de LB conteniendo Ampicilina a una concentración de 100 µg/L y se incubaron a 37 °C hasta el crecimiento de colonias.

3.4. Técnicas de proteínas

3.4.1. Hiperproducción de la proteína recombinante

Para la hiperexpresión del gen de interés insertado en el vector de expresión pURI-3Cter, 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: una vez que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de entre 0,4 y 0,6, se indujo la hiperexpresión del gen mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,4 mM y se dejó incubando a 22°C durante 18 horas.

3.4.2. Purificación de la proteína recombinante

Finalizado el periodo de inducción, las células de *E. coli* BL21 (DE3) se recogieron mediante centrifugación a 7000 rpm durante 10 min a 4°C. Las células se resuspendieron en tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0 y se rompieron realizando 3 pases en una prensa French (Amicon French pressure cell, SLM Instruments) a una presión de 1100 psi. El lisado celular resultante se sometió a centrifugación a 15000 rpm durante 40 min 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) y este homogeneizado se purificó mediante cromatografía de afinidad de unión a metales (IMAC) utilizando la resina TALON® (Clontech). El extracto celular se puso en contacto durante 20 min a temperatura ambiente con 1 mL de la resina con cobalto previamente equilibrada con tampón fosfato sódico 50 mM, 300 mM de NaCl, pH 7.0. Una vez unida la proteína a la columna, se realizó un lavado con tampón fosfato sódico 50 mM, 300 mM de NaCl, pH 7.0 conteniendo 10 mM de imidazol y

posteriormente, la proteína recombinante se eluyó con 150 mM de imidazol en el mismo tampón, recogién dose en fracciones de 1 mL.

La pureza del 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, 300 mM de NaCl, pH 7.0; a 4°C utilizando membranas de diálisis (Cellu Sep[®]) de 3,5 KDa de diámetro de poro. Se realizaron 4 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, $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, 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/protparam/>) para conocer el peso molecular y el coeficiente de extinción molar (ϵ).

3.4.3. 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), usando en este trabajo geles de poliacrilamida al 10 %. Las muestras que contenían la proteína a resolver se trataron durante 5 min a 80 °C en presencia de un tampón Tris-HCl 6.5 mM pH 6.8; SDS 2 %; β -mercaptoetanol 5 %; glicerol 10 % y azul de bromofenol 0.005 %. 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, Alemania). Como marcador de masa molecular se empleó SDS-PAGE *Molecular Weight Standards, Broad Range* (BioRad).

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 (Bio-Rad).

3.5. Ensayos de actividad enzimática: Caracterización bioquímica

Para determinar la actividad glicosidasa del enzima se empleó un método colorimétrico estándar que utiliza el β -D-glucopiranosido sintético unido a 4-nitrofenilo (*p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido, *p*NFG) (Sigma Aldrich[®]) a una concentración final de 1 mM. 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 y hace necesaria una diálisis previa.

Para todas las condiciones ensayadas durante la caracterización bioquímica de la proteína, 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 el enzima.

3.5.1. Efecto del pH.

Para determinar el efecto del pH sobre la actividad enzimática de esta proteína se emplearon a una concentración final de 50 mM, diferentes tampones según el valor de pH a estudiar: tampón citrato para el pH 3, tampón acetato para los pH 4 y 5, tampón MOPS para los pH 6.5 y 7, tampón tris para el pH 8 y tampón glicina para los pH 9 y 10. Los 75 μ L de la mezcla de reacción, que contenía 15 μ L de sustrato *p*NFG 1mM, 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 μ L de tampón carbonato sódico 1M pH 9 y se midió la absorbancia a 420 nm en el lector de placas multipocillo EPOCH |2 MICROPLATE READER (Biotek[®]) y el Software de análisis de datos Gen 5 versión 2.06.

3.5.2. Efecto de la temperatura.

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se analizó ensayando las siguientes temperaturas de incubación: 4, 22, 30, 37, 45 y 65°C durante 10 min. Las mezclas de reacción contenían 60 μ L del tampón MOPS 50 mM pH 7; 15 μ L del sustrato *p*NFG 1 mM y 4 μ g del enzima. Tras la incubación se añadieron 75 μ L de carbonato sódico 1 M pH 9 y se midió la absorbancia a 420 nm en el lector de placas.

3.5.3. Efectos de aditivos.

Se estudió el efecto de los siguientes aditivos sobre la actividad enzimática: ZnCl₂, HgCl₂, CaCl₂, KCl₂ y MgCl₂; los surfactantes no iónicos Tween 20, Tween 80 y Tritón X-100; la urea, el dimetilsulfóxido (DMSO) como agentes desnaturalizantes (caotrópicos), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como agente quelante de cationes divalentes; β-mercaptoetanol como agente reductor que rompe los enlaces disulfuro. Las mezclas de reacción analizadas contenían 4 µg de la proteína en tampón MOPS 50 mM pH 7, 15 µL del sustrato *p*NFG 1 mM y el aditivo a una concentración final de 1mM. Esta reacción se incubó durante 10 minutos a 37 °C. A continuación se añadieron 75 µL de carbonato sódico 1M pH 9 y se midió la absorbancia a 420 nm en el lector de placas.

3.5.4. Termoestabilidad.

Para determinar la estabilidad térmica de este enzima, se incubó la proteína a 22, 30, 37, 45 y 65°C durante un periodo total de 24 horas. Se tomaron alícuotas de 4 µg de la proteína incubada a en los tiempos 0 min, 30 min, 1, 2, 4, 6 y 24 horas. Estas alícuotas se añadieron a la mezcla de reacción que contenía tampón MOPS 50 mM pH 7 y sustrato *p*NFG 1 mM. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 10 minutos. A continuación se añadieron 75 µL de carbonato sódico 1M 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 ya citadas, donde la enzima añadida no había sido sometida a incubación y se encontraba a una temperatura de 4°C.

4. Resultados y Discusión

4.1. Búsqueda *in silico* de una β - glucosidasa de *O. oeni*

Con el fin de identificar una β - glucosidasa en *O. oeni* con adecuadas propiedades bioquímicas para ser aplicada durante la vinificación se hizo una búsqueda de proteínas similares a la proteína Bgy2 (LVISKB_0241) de *L. brevis* que ya ha sido previamente caracterizada como una β - glucosidasa (Zhong *et al.*, 2016).

Para ello se hizo una búsqueda de secuencias similares depositadas en las bases de datos de EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/services>) y GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el uso de la herramienta Protein Blast del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>), obteniéndose la secuencia de la proteína OEOE_1569 como la de mayor similitud y un alineamiento entre ambas mediante la herramienta CLUSTAL Omega proporcionada por el EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Ver **Figura 2**). El porcentaje de identidad que se obtuvo entre ambas secuencias proteicas fue del 57,28 %.

```
LVISKB_0241  MTAIPSNDFIDQLTLTEKASLVSGKDFWFTAGVERLNLEKIMMTDGPSGLRKQASSADAL
OEOE_1569    --MSKITSIISGLSLKEKADLVSGKDFWFTAQVSG--LDRMMVSDGPSGLRKQADASNAL
              ..:*. *:*.***.***** * . *:::*****.:::**

LVISKB_0241  GLNQSVKAVTFPASALTASSFDRSALTHGQHLGTAAKAEGVSILLGPGINIKRSPLAGR
OEOE_1569    GLNKSVVAVNFPSSSLTAASFDRALLQELGRNLGQAAKAERVRIILLGPGINIKRSPLAGR
              ***:** *.***::**:*:**: * .**::** ***** * *****:*****

LVISKB_0241  NFEYFSEDPLVAGELGAAYVTGVQSQAVGVSVKHFAANNRENQRFTSSSNMSERALREIY
OEOE_1569    NFEYFSEDPYLTGELASSYVQGVQESGVSVLKRFAANNREDQRFTASSNIDQRSLHELY
              ***** ::**.::** **..**:*:**:*:**:*:**:*:**:..**:*:**

LVISKB_0241  LAAFERIVTKAHPATIMCSYNAINGTLNSQNFRLLTTILRDEWGFDFGVMSDWGAVADHI
OEOE_1569    LSAFEKAVKMARPATIMCSYNAINGTLNSQNQRLLTQILREEWGFKGLVMSDWGAVSDHV
              *:**: * .*:***** ***** **:*:**.*:*****:**:

LVISKB_0241  AALRAGLDLEMPGKGPQSTTEIVEAVQHGDLEATLNIQVAVKRVLKMIEHWVDS-TPHAY
OEOE_1569    AALKAGLDLEMPGKGNSTSEIIEAVNKGQLDEKVLERAASRVIQMVEKWQENKTVISY
              ***:***** :**:*:**:*:**: * .*: *..**:*:**:..* :. * :*

LVISKB_0241  DQEKQHQFARQLAANSFILLKNDHQVLPDNLQDVTILGELAEKPRYQGGGSSHVNAFRV
OEOE_1569    DLEKQHRFARQLVGESIVLLKNEQQLLPLKSNQSLAVIGQLAEKPRYQGGSGSAHVNAFNT
              * *****.*****.:::**:*:**:*:**.. *..:..*:******.**:*****..
```

```

LVISKB_0241  TTPLSVAQA-AGNTTYQAAAYQVNATQSDPNRLAQAVAAAKKAPAVVIFAGVPEALESEGF
OEOE_1569    TTPLKVVQDILPKTAYQAGYQIDSDQIDQQAEQAAVDLAKQADQVVVFSGFFSSYESEGF
              ****.*.*      :*:***.**::: * * :      ** **:*  **:*.*.*.: *****

LVISKB_0241  DKTTMALPENQNTLISQVAAVNNRTVVVLQNGSAIEMPWADDVAAILETYLAGEAVGEAT
OEOE_1569    DKKTISLDPDNQHLLIERLAAVNKKIIVVLENGSALEMPWVGQVEAIVETYLAGEAVGEAT
              **.*.:**:* **.*.:***: :***:***:***..:* **:******

LVISKB_0241  WDVLTGAVNPSGKLAESFFPKLADNPTYGTFNASPLTEDYHEDIFVGYRYDLKQRAVRY
OEOE_1569    WDILFGRVNPSPGKLAESFPIKLDNPTYLTFNADRKNENYHEGLFVGYRYDKKKQEVLF
              **:* * *****:***** *****.  .*:**.:***** **:* * :

LVISKB_0241  PFGFGLSYTHFSYHDLKVTVQDQVTLRYQLTNDGPVDGQEISQIYVANHASHIEVPRRE
OEOE_1569    PFGHGLSYTTFEYRKLELLKSDHEVTVSFEIKNTGSVAGKETAQIYLSNQTSEIEKPLKE
              ***.***** *.*.*.:.  .*:**.: :.* * * *.* :***:*.** * :*

LVISKB_0241  LRDFVKTALRSGETKTITRILTRRDFSWYNARTASWQMDDGNYTISVGQSSRQLNLSQDI
OEOE_1569    LKGFVKVSLNPGQTKQVEIVLDRKRSFWSYNPETDKWQVDNGSYQIQLAASSRDIRLTKNL
              *:.*.*.:*.* **.* :  :* :*.***** .* **:*.*.* *.. ***:..*.:.:

LVISKB_0241  SLTWNPKHLAPITANTYIGDIMARPDLRPALEQTKMATSLDQLANDDTNSELMKNMPLRA
OEOE_1569    LIDWSENKQVALSPDSYLSDILKEQAFKAPLKESGLDKLLEQLAGDENNAAILTNMPLRA
              : * . :.: : : :*.** : . : : * : : . * :***.*.*. :.:*****

LVISKB_0241  AIMVGIDASQLKEFLRLTNQIQ
OEOE_1569    LMMMGVSNHQIQQFIKLANQS-
              :*:*. . * : : : :*.**

```

Figura 2: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas LVISKB_0241 y OEOE_1569. Se indica (*) aminoácidos idénticos; (:) aminoácidos con propiedades físico-químicas similares semiconservados y (.) aminoácidos conservados con baja similitud en sus propiedades físico-químicas.

4.2. Clonación y transformación del gen

Basándonos en los resultados obtenidos tras la comparación de secuencias frente a la β -glucosidasa Bgy2 de *L. brevis* se decidió clonar el gen de *O. oeni* que codifica la proteína OEOE_1569 ya que posee el mayor porcentaje de identidad con Bgy2. El gen *OEOE_1569* contiene 2240 pb y fue clonado en el vector pURI3-Cter utilizando los oligonucleótidos 1798 y 1799 (**Tabla 3**), que fueron diseñados para amplificar el gen añadiendo a sus extremos 5' nucleótidos capaces de hibridar con el vector de expresión pURI3-Cter utilizando una estrategia de clonación independiente de

ligación (de las Rivas et al. ,2007) como previamente se ha descrito en el apartado 3.3.7. de Materiales y Métodos.

En la **Figura 3A** se muestra el fragmento de ADN correspondiente al gen *OEOE_1569* amplificado mediante PCR. Se trata de un gel de agarosa al 0,7 % donde se aprecia cómo la altura de la banda se encuentra entre las medidas de 2,69 y 1,88 Kpb, más concretamente a la altura de las 2,2 Kpb correspondientes al tamaño de este gen.

Después se llevó a cabo la transformación del plásmido con el inserto del gen en la cepa *E. coli* DH10B. Las células transformadas se chequearon en un gel al 0,7 % de agarosa para buscar aquellas que contenían el plásmido recombinante pURI3-Cter-*OEOE_1569* (Figura 3B). En ella se pueden diferenciar claramente bandas a dos alturas distintas: la del carril 5 donde la banda ha migrado más lejos debido a su menor tamaño, lo cual señala que para esa colonia la transformación del plásmido recombinante no se realizó con éxito porque el gen no quedó insertado en el plásmido. Además se aprecia que coincide de tamaño con la banda del carril 2, perteneciente al control del plásmido pURI3-Cter, y las bandas correspondientes a los carriles 3, 4, 6, 7 y 8 cuyas colonias transformaron el plásmido con el gen incluido, por lo que el fragmento final es de mayor tamaño por lo que la migración es menor y la banda queda a mayor altura dentro del gel.

Posteriormente se secuenció el plásmido recombinante y una vez verificada su secuencia, con el fin de hiperproducir la proteína correspondiente, se transformó con dicho plásmido la cepa *E. coli* BL21 (DE3).

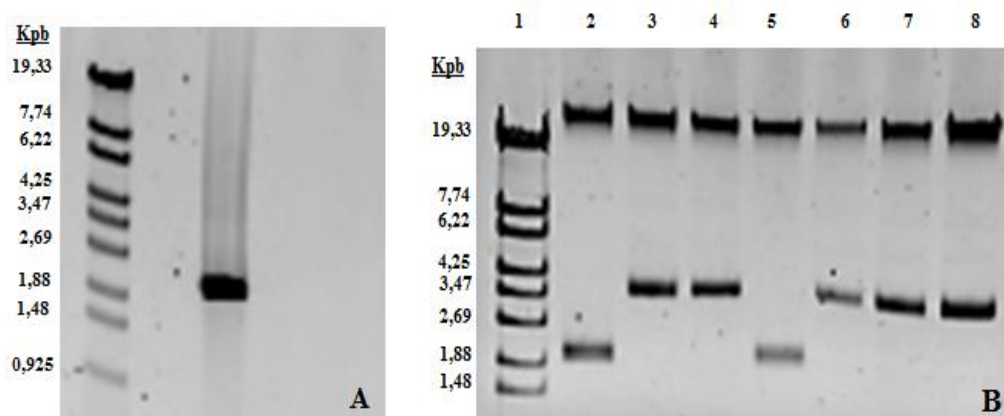


Figura 3: (A) Amplificación mediante PCR del fragmento del gen *OEOE_1569* utilizando los oligonucleótidos 1798 y 1799. En el primer carril se encuentra el marcador de tamaños λ T14 (Takara) y en el segundo se aprecia la banda correspondiente al gen *OEOE_1569*; (B) Chequeo de las construcciones pURI3-Cter-*OEOE_1569* 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.

4.3. Hiperproducción y purificación.

La cepa BL21 (DE3) con el plásmido recombinante pURI3-Cter-OEOE_1569 se cultivó en medio LB con Ampicilina (100µg/mL). Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,4 se indujo con IPTG 0,4 mM durante 18 horas y las células se recogieron por centrifugación tal y como se describe en el apartado 3.4.1. de Materiales y Métodos. Tras romperlas con una prensa de French se llevó a cabo la purificación de la proteína OEOE_1569. Esta purificación consistió en una cromatografía de afinidad al cobalto que permite la purificación en un sólo paso debido a la cola de 6 histidinas presente en el C- terminal de la proteína. La elución de la proteína se llevó a cabo con imidazol 150 mM y se recogió en fracciones de 1 mL. Se realizó una diálisis de la proteína para eliminar el exceso de imidazol. Después se realizó una electroforesis en geles SDS-PAGE con 10 % de acrilamida para comprobar la hiperproducción del enzima recombinante en las células transformantes de *E. coli* BL21 (DE3).

En la **Figura 4** se puede comprobar que, tanto en el extracto proteico obtenido de las células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido recombinante, como en las diferentes fracciones eluidas con imidazol de la columna de afinidad, aparece la banda correspondiente a la proteína OEOE_1569 recombinante, con un tamaño aproximado de 81.8 KDa. Corroborando los resultados esperados, la fracción proteica de interés no aparece en el carril 4, perteneciente a la primera elución de la columna, que contiene todos los cuerpos de la muestra que no presentan afinidad por la resina. Esto señala que la cromatografía funcionó correctamente, ya que toda la fracción proteica ha interactuado con la resina de cobalto, de manera que al provocar su elución con imidazol 150 mM se obtiene un volumen de proteína pura.

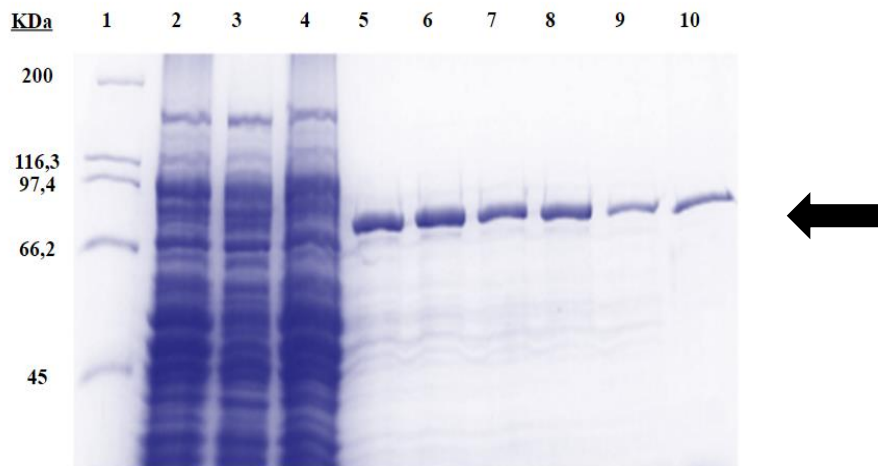


Figura 4: Hiperproducción y expresión de la proteína OEOE_1569 recombinante de *Oenococcus oeni* en gel SDS-PAGE con un 10 % de acrilamida. (1) Marcador de peso molecular Broad Range (Bio-Rad); (2) Control negativo: extractos proteicos de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pURI3-Cter sin inserto, inducidas con IPTG en las mismas condiciones ya descritas; (3) extracto proteico procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) pURI3-Cter con el inserto del gen de interés, inducida con IPTG en las condiciones mencionadas anteriormente; (4) fracción eluída no retenida en la resina de afinidad; (5-10) fracciones eluídas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). La proteína OEOE_1569 está señalada con una flecha.

Una vez comprobada la pureza de la proteína, se procedió a dializarla 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, calcular qué cantidad de proteína se obtiene a partir del cultivo realizado (1L). Para ello se utilizó la ecuación de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot C$) como se muestra a continuación:

$$\frac{\text{Abs (280 nm)} \cdot 1 \text{ cm (paso óptico)}}{\epsilon} \cdot P_m \text{ (Da)} \cdot n^{\circ} \text{ de fracciones purificadas} = \text{mg proteína/L}$$

$$\frac{2,01 \cdot 1}{0,823 \cdot 10^5} \cdot 81,8 \cdot 10^3 \cdot 5 = 9,98 \approx 10 \text{ mg de proteína OEOE}_{1569} \text{ por cada L de cultivo}$$

4.4. Caracterización bioquímica

Una vez purificada la proteína, se realizaron los ensayos de temperatura óptima, pH óptimo, estabilidad térmica y efecto de aditivos utilizando para ello como sustrato *p*NFG (ver apartado 3.5. de Métodos y Materiales). Los datos muestran el valor medio de tres experimentos independientes, junto con su error relativo.

La **Figura 5** presenta los resultados obtenidos al estudiar la variación de la actividad enzimática de la proteína OEOE_1569 al modificar las condiciones de temperatura y pH. Estos ensayos permiten conocer sus condiciones óptimas de actividad catalítica.

En la **Figura 5A** aparecen los datos obtenidos en los ensayos de temperatura óptima. Se observa que la proteína OEOE_1569 presenta un intervalo de temperatura óptima para su actividad glucosidasa entre los 20 y 45°C, mostrando en 45°C el mayor punto de actividad. La **Figura 5B** muestra el comportamiento de la proteína OEOE_1569 a diferentes pHs. En la figura se observa que la proteína presenta en el rango entre pH 4 y 7 un elevado nivel de actividad, manteniéndose por encima de un 90 %.

Resulta interesante observar cómo las condiciones más extremas probadas en ambos ensayos no parecen afectar en gran medida a la actividad del enzima. Incluso los valores más bajos recogidos en ambas pruebas (un 66 % y un 71 % de actividad relativa para los ensayos de temperatura óptima a 4° y 65° C correspondientemente y alrededor de un 60 % de actividad relativa para pH 3 y 10) resultan destacables frente a lo comúnmente obtenido al caracterizar bioquímicamente enzimas con actividad β -glucosidasa (Riou et al., 1998; Saha and Bothast, 1996; King, 1986), ya que los resultados de estos estudios, tanto en el ensayo de pH como en el de temperatura óptima, coinciden al representar en forma de pico la variación de la actividad enzimática, es decir, que este tipo de enzima generalmente si se ve notablemente afectada por condiciones de pH y/o temperaturas extremas.

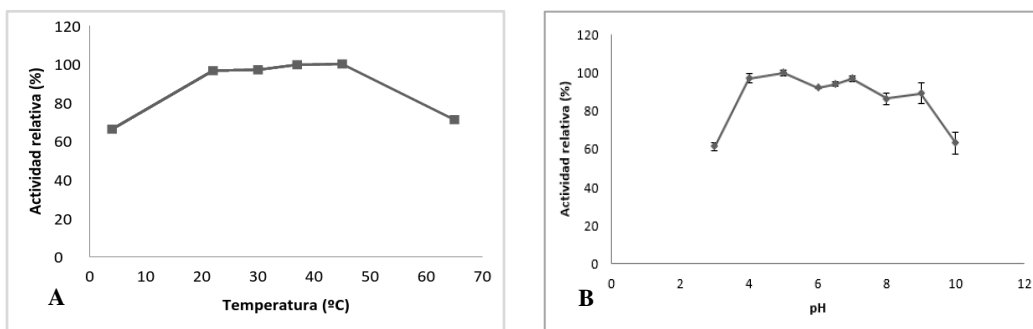


Figura 5: Propiedades bioquímicas de la enzima OEOE_1569. Ensayos de actividad relativa frente a temperatura y pH (A) Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis del sustrato pNFG 1mM. (B) Efecto del pH sobre la hidrólisis del sustrato pNFG 1mM.

En la **Figura 6** se ha representado el efecto que tienen distintos aditivos a una concentración 1mM (ver apartado 3.5.1. de Métodos y Materiales) sobre la actividad β -glucosidasa de la proteína OEOE_1569, pudiendo comprobar así su potencial como catalizador en medios con diversas condiciones.

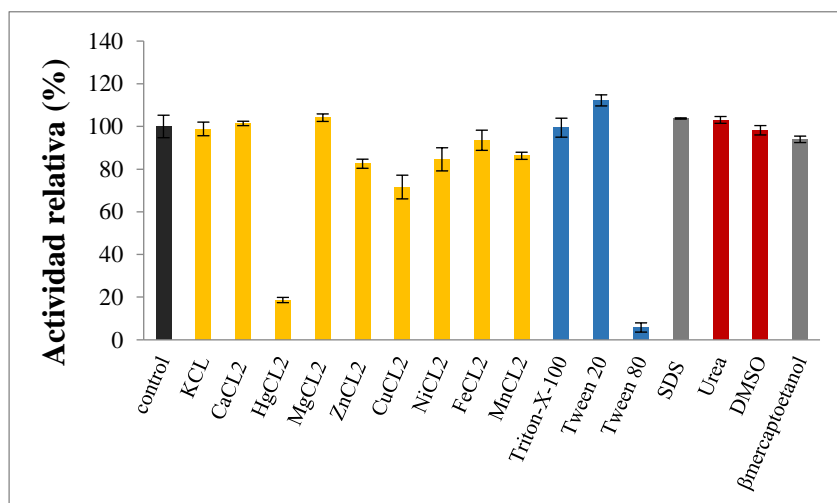


Figura 6: Actividad enzimática relativa frente a aditivos: ■ Control sin aditivo, ■ iones metálicos, ■ detergentes, ■ agentes caiotrópicos, dodecilsulfato sódico (SDS) y agente reductor (β -mercaptoetanol). La actividad enzimática del control (sin aditivo) se consideró el 100 % de la actividad.

Los resultados obtenidos sugieren que la proteína utiliza iones metálicos para trabajar de manera óptima, sobre todo el $MgCl_2$ (104 % de actividad relativa). Se aprecia sin embargo, el caso del ión $HgCl_2$, que redujo notablemente la actividad relativa del enzima a un 18 %.

La estabilidad de la proteína frente a detergentes muestra la posibilidad de utilizar la proteína en la composición de los detergentes o usarse en procesos de biotransformación, donde por adición de surfactantes se solubilizan sustratos lipofílicos. En los ensayos, la proteína de interés ha demostrado su gran nivel catalítico en dos de los tres detergentes estudiados, pudiéndose apreciar el aumento de actividad en el caso del Tween 20, donde se obtuvo un 112 % de actividad enzimática, y dando un valor mínimo para el compuesto Tween-80 (5,78 % de actividad enzimática). La diferencia obtenida entre estos dos detergentes tan similares se debe probablemente a la concentración de fracción de polisorbato monolaurato que lleva cada uno, que en el Tween 20 constituye un 40-60 % de la mezcla y en el Tween 80 constituye más del 58 % de la mezcla. El aumento de actividad en presencia de los detergentes puede deberse a su efecto de despliegue parcial de la proteína, lo cual aumenta la flexibilidad y la actividad de esta. Sin embargo también podría deberse a que provocan un plegamiento parcial de proteínas recombinantes mal plegadas.

Los agentes caotrópicos son sustancias que desorganizan la red tridimensional en macromoléculas como proteínas, ADN o ARN y las desnaturaliza. Esto es el resultado de su acción sobre las interacciones intramoleculares no covalentes, que tendrían un papel estabilizador en la molécula; algunos ejemplos de estas interacciones son los puentes de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals. En los ensayos llevados a cabo se puede observar que tanto la urea como el DMSO, a la concentración empleada, apenas han tenido efecto alguno sobre la actividad relativa del enzima.

La inhibición de la actividad por β -mercaptoetanol implicaría que los puentes disulfuro participan en la estabilidad y la actividad global del enzima, pero en este estudio el β -mercaptoetanol ha dado resultados muy positivos, por lo que se descarta el papel de los puentes disulfuro en la estabilidad enzimática.

La **Figura 7** muestra en forma de gráfico los resultados obtenidos en el ensayo de termoestabilidad. Las medidas se realizaron a 5 temperaturas diferentes durante un periodo de incubación de 24 horas (0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h). El ensayo se realizó en condiciones estándar utilizando 4 μg de proteína. La actividad de la enzima a 4°C (sin incubación) se consideró el valor de 100 % de actividad relativa.

Los resultados presentados en el gráfico permiten apreciar como la enzima se mantiene casi a pleno rendimiento tras incubaciones de hasta 24 horas para las temperaturas de 22°, 30° y 37° C, pero en la

prueba realizada a 45 °C su nivel de actividad enzimática empieza a descender en picado tras la media hora de incubación. Se observa también como el enzima se encuentra prácticamente inactivado a las 4 horas de incubación.

En el caso de la incubación a 65°C, la elevada temperatura tuvo un rápido efecto desnaturizante sobre la proteína, ya que como se aprecia en la gráfica, tras media hora de incubación la enzima ya daba señal de encontrarse inactiva.

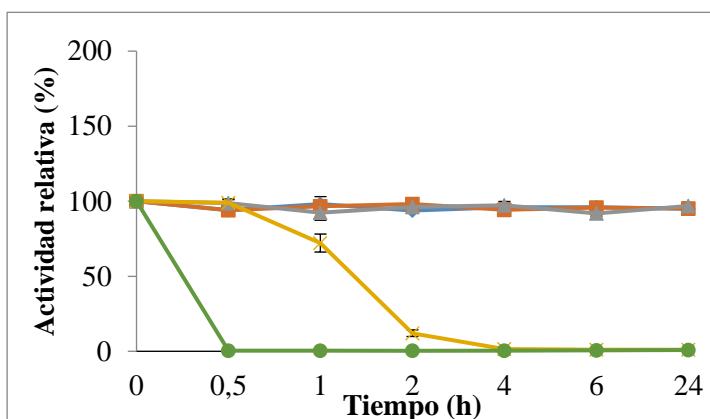


Figura 7: Ensayo de estabilidad térmica. Las medidas de actividad enzimática se realizaron a 5 temperaturas distintas: \blacklozenge 22 °C, \blacksquare 30 °C, \blacktriangle 37 °C, \blacklozenge 45 °C y \bullet 65 °C durante un periodo de incubación de 24 horas tomando mediciones a las 0´30, 1, 2, 4, 6 y 24 horas. El ensayo se realizó en condiciones estándar utilizando 4 μ g de proteína. Los datos representan los valores medios de tres experimentos independientes, incluyéndose el error relativo. La actividad del enzima sin incubación (a 4 °C) se consideró el valor 100 % de la actividad relativa.

5. Conclusiones

En este trabajo se ha identificado y caracterizado una enzima con actividad β -glucosidasa procedente de *Oenococcus oeni* PSU-1, una bacteria importante en enología. La enzima descrita posee unas características bioquímicas interesantes para su posible uso durante el proceso de vinificación lo que permitiría la mejora del aroma de los vinos y por tanto su calidad final.

6. Bibliografía

Bojarova, P., and Ken, V. (2009) Glycosidases: a key to tailored carbohydrates. *Trends Biotechnol* **27**: 199-209

Cho C-W., Jeong H-C., Hong H-D et al. (2012) Bioconversion of isoflavones during the fermentation of Samsó-Eum with *Lactobacillus* strains. *Biotechnol Bioprocess Eng* **17**: 1062-1067.

Curiel, J.A., De las Rivas, B., Mancheño, J.M., and Muñoz, R. (2011). The pURI family of expression vectors: A versatile set of ligation independent cloning plasmids for producing recombinant His-fusion proteins. *Protein Express Purif* **76**: 44-53.

Dicks, L. M. T., Dellaglio, F., Collins, M.D, (1995). Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, p. 395-397

European Molecular Biology Laboratory- European Bioinformatics Institute (EMBL/EBI). URL <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Expert Protein Analysis

Ghabbour N., Lamzira Z., Thonart P., Cidalia P., Mmarkaoui M & Asehraou A. (2011) Selection of oleuropein-degrading lactic acid bacteria strains isolated from fermenting moroccan green olives. *Grasas Aceites* **62**: 84-89.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**: 557-580.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.

Matthews, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P., & Jinarek, V. (2004). Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 5715-5731.

Pal, S., Banik, S.P., Ghorai, S., Chordhury, S. , and Khowala, S. (2010) Purification and characterization of a thermostable intra-cellular beta-glucosidase with transglycosilation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. *Bioresour Technol* **101**: 2412-2420.

Poli, A., Nicolaus, B., Fiorentino, G., Anzelmo, G., Tommonaro, G., and Di Donato, P. (2011) Polysaccharides from wastes of vegetable industrial processing: new opportunities for their eco-friendly re-use. In *Biotechnology of biopolymers*. Elnashar, M. (ed). Croatia: In Tech, pp. 33-56.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Manniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.

Sekar, V. (1987). A rapid screening procedure for identification of recombinant bacterial clones. *Biotechniques* 5, 11–13.

Siebert TE, Smythe HE, Capone DL, Neuwöher C, Pardon KH, Skouromounis GK, Herderich MJ, Sefton MA, Pollnitz AP (2005) Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS=SPME-GC-MS. *Anal Bioanal Chem*. **381**:937-947

System (ExPASy). Bioinformatics Resource Portal. URL <http://web.expasy.org/protparam/>.

de las Rivas, B., Curiel, J.A., Mancheño, J.M. y Muñoz, R. (2007). Expression vectors for enzyme restriction- and ligation-independent cloning for producing recombinant his-fusion proteins. *Biotechnology Progress*. **23**: 680-686.

King, G. M. (1986) 'Characterization of β -Glucosidase Activity in Intertidal Marine Sediments', *Applied and Environmental Microbiology*, 51(2), pp. 373–380. Available at: <http://aem.asm.org/content/51/2/373.abstract>.

Ley, C. P. and Yates, M. H. (2008) 'Technical Notes', 12(I), pp. 120–124. doi: 10.1115/1.1571088.

Riou, C., Salmon, J. M., Vallier, M. J., Günata, Z. and Barre, P. (1998) 'Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus oryzae*.'. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), pp. 3607–3614. doi: 10.1002/adsc.200700082.

Saha, B. C. and Bothast, R. J. (1996) 'Production, purification, and characterization of a highly glucose- tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*', *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), pp. 3165–3170.

Zhong, F. L., Ma, R., Jiang, M., Dong, W. W., Jiang, J., Wu, S., Li, D. and Quan, L. H. (2016) 'Cloning and characterization of ginsenoside-hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus brevis* that transforms ginsenosides Rb1 and F2 into ginsenoside Rd and compound K', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(10), pp. 1661–1667. doi: 10.4014/jmb.1605.05052.