

**Rediseño de la eficiencia catalítica y de la termorresistencia de la  $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ glucanasa de *Bacillus licheniformis*.**

Memoria presentada por Juan Antonio Cedano Rodríguez para optar al grado de Doctor en ciencias, sección Biológicas.

Trabajo realizado en el Institut de Biotecnologia i Biomedicina “Vicent Villar Palasí” de la Universitat Autònoma de Barcelona bajo la dirección de los Drs. Enrique Querol Murillo y el Dr. Antoni Planas Sauter.

Dr. Enrique Querol

Dr. Antoni Planas

Juan Cedano

Directores de Tesis

Doctorando

Bellaterra, Septiembre del 2001

Escribir los agradecimientos no es para mí una tarea sencilla, no por que no esté profundamente agradecido de sentirme uno más entre toda esa maravillosa gente que me rodea, o me ha rodeado, sino por que no tengo la sana costumbre de expresarlo públicamente -aunque lo piense-. Es obvio que sin la colaboración de mis compañeros de laboratorio del IBB y aledaños, del IQS, y la de mis jefes, Querol y Planas, este trabajo no habría llegado jamás a buen puerto.

En lo que respecta a la gente directamente implicada con la glucanasa, agradezco en primer lugar a mis jefes por la confianza que han depositado en mí, y por los buenos y malos ratos que hemos pasado, tratando de tirar adelante esa nave de rumbo incierto que es un trabajo de investigación. Agradezco a Jaume Pons haberme enseñado de forma relámpago las técnicas necesarias para manejarme con soltura con la glucanasa y transferirme parte de su visión práctica del trabajo experimental. A Mieria me gustaría agradecerle no sólo por compartir conmigo la plomiza tarea de caracterizar los mutantes, sino por ayudarme a superar un periodo bastante duro en mi vida, aunque seguramente ella no se diera ni cuenta. A Antonio por arrimar el hombro en los penúltimos mutantes. A Bego por, entre otras muchas cosas, tener la paciencia de leerse la primera versión de la tesis.

Me cuesta dar nombres concretos ya que seguro me olvido a alguien, más aun teniendo en cuenta la precipitación con la que estoy escribiendo estas líneas. La tesis me ha servido de excusa perfecta para conocer un montón de “especímenes” curiosos, dentro y fuera del IBB. Cada uno de ellos me ha aportado su granito de arena particular, haciendo de mi vida una experiencia enriquecedora y no me refiero únicamente la vertiente científica. Siempre he encontrado un consejo para salir de los múltiples atolladeros en los que me he ido metiendo, y a algún compañero dispuesto a echarme una mano o a permitirme ayudarlo. He encontrado gente que te recuerda que el mundo es como una vagina, o que simplemente está dispuesto a escuchar tus neuras, y a contarte las suyas. Gente en la que me reconozco a mí mismo, con la que discutir y trabajar. Gente de toda índole, depresivos, neuróticos, obsesos, perversos y algún que otro medio cuerdo. Gente con la que he compartido muchos buenos momentos, que es lo que en definitiva te hace sentir bien; que no es poco. Gracias a todos, os quiero.

C/F: tampón citrato fosfato

Da: Dalton

DMSO: Dimetil Sulfoxido

DNS: ácido dinitrosalicílico.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

dNTP: 5' trifosfato de 2'-desoxiribonucleósido

dsDNA: DNA de doble cadena

FUP: *forward universal primer*

G4G3G-MU: 4-Metilumbeliferil O-β-D-glucopiranosil-(1→4) O-β-D-glucopiranosil-(1→3)

O-β-D-glucopiranosido.

IPTG: isopropil- β-tiogalactopiranosido.

nm: nanómetros

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RUP: *reverse universal primer*

SDS: dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

ss-DNA: DNA cadena simple

TAE: tampón tris-acetato/EDTA

TE: tampón tris /EDTA

TEMED: NNN'N'-tetrametiletildiamina

Wt: salvaje (*wild type*)

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indol- β-galactopiranosido.

## Índice

I.- Introducción .....	5
I.A.- Los carbohidratos.....	5
I.A.1.- Los $\beta$ -glucanos .....	5
I.A.2.- Fuente natural de los $\beta$ -glucanos.....	6
I.A.3.- $\beta$ -glucano de cebada .....	7
I.A.4.- Propiedades físico-químicas .....	7
I.B.- GLICOSIDASAS.....	8
I.B.1.- Glucanasas.....	11
I.B.2.- Aplicación biotecnológica de las glucohidrolasas en general.....	13
I.B.3.- Aplicación biotecnológica de las $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ glucanasas .....	14
I.C.- Objetivos.....	16
II.- Material y métodos.....	17
II.A.- Material .....	17
II.A.1.- Equipamiento .....	17
II.A.2.- Cepas de <i>E. coli</i> usadas.....	17
II.A.3.- Vectores.....	18
II.B.- Medios de cultivo .....	19
II.B.1.- Métodos de esterilización .....	19
II.B.2.- Composición de los medios de cultivo .....	19
II.B.3.- Preparación de placas de Petri con X-Gal, IPTG y ampicilina .....	20
II.B.4.- Preparación de placas de Petri con $\beta$ -glucano para el test de actividad de la $\beta$ -glucanasa .....	20
II.C.- Métodos con células.....	21
II.C.1.- Preparación de células competentes.....	21
II.C.2.- Transformación de células competentes .....	21
II.D.- Métodos de DNA recombinante.....	22
II.D.1.- Secuencia clonada de la glucanasa silvestre.....	22
II.D.2.- Normas básicas en la manipulación de DNA.....	23
II.D.3.- Constructo con el que trabajamos.....	23
II.D.4.- Obtención de DNA plasmídico por lisis alcalina.....	23
II.D.5.- Procedimiento de obtención de DNA a pequeña escala .....	24
II.D.6.- Procedimiento de obtención de DNA a gran escala.....	25
II.D.7.- Mutagénesis Dirigida por amplificación de bandas, (método clásico).....	26
II.D.8.- Mutagénesis Dirigida por PCR en un solo paso .....	27
II.D.9.- Selección de clones mutados.....	30
II.D.10.- Secuenciación manual del DNA .....	30
II.D.11.- Secuenciación automática del DNA.....	31
II.E.- Detección de actividad en placa.....	32
II.E.1.- Test de actividad en placas con $\beta$ -glucano .....	32
II.F.- Métodos de producción de la glucanasa .....	32
II.F.1.- Normas básicas de inoculación e incubación de los cultivos.....	32
II.F.2.- Producción de $\beta$ -glucanasa en TGI .....	33
II.G.- Purificación de la glucanasa .....	33
II.G.1.- Primera diálisis.....	33
II.G.2.- Centrifugado.....	34
II.G.3.- Primera cromatografía .....	34
II.G.4.- Lavado y reequilibrado de la columna.....	36
II.G.5.- Detección de la actividad enzimática en disolución.....	36
II.G.6.- Protocolo en tubo de vidrio .....	36
II.G.7.- Protocolo en microplaca .....	36
II.G.8.- Control de pureza, primer SDS-PAGE .....	37
II.G.9.- Segunda diálisis.....	38
II.G.10.- Segunda cromatografía .....	38
II.G.11.- Control de pureza Segundo SDS-PAGE .....	40
II.J.- Conservación de la proteína purificada .....	41
II.J.1.- Tercera diálisis.....	41
II.J.2.- Determinación de la concentración de proteínas.....	41
II.J.3.- Liofilización.....	41
II.J.4.- Conservación de la proteína.....	41

---

II.K.- Caracterización de cinética de los enzimas.....	42
II.L.- Métodos de estimación de la termorresistencia .....	42
II.L.1.- Termoinactivación en presencia de sustrato .....	42
II.L.2.- Termoinactivación en ausencia de sustrato .....	42
II.M.- Métodos computacionales.....	43
III.- Resultados y discusión.....	44
III.A.- Análisis de la relación estructura/actividad de la glucanasa mediante MUTAGÉNESIS DE saturación en la posición 58.....	44
III.A.1.- Primera serie de mutantes en la posición 58 de la glucanasa .....	44
III.A.2.- Segunda serie de mutantes en la posición 58.....	48
III.A.3.- Conclusiones parciales .....	59
III.B.- Problemas de expresión y obtención de proteína recombinante en algunos mutantes .....	60
III.B.1.- Menor productividad de los mutantes hiperactivos.....	60
III.B.2.- Dobles mutantes de cisteína .....	61
III.C.- Análisis de la termorresistencia: EFECTO DE LA POSICIÓN 58 Y DEL CENTRO DE UNIÓN AL CALCIO.....	64
III.C.1.- Estabilización de las colas N y C-terminales .....	65
III.C.2.- Contribución de los aminoácidos de la posición 58 en la termorresistencia de la proteína .....	66
III.C.3.- Determinación de la termorresistencia en ausencia de sustrato .....	72
III.C.4.- Intento de estabilización del lazo entre la beta 1 y 2 mediante creación de un puente disulfuro.....	79
III.C.5.- Contribución del puente disulfuro en la termorresistencia de la glucanasa .....	81
III.C.6.- Intento de estabilización mediante la creación de los puentes disulfuro N40C+G74C.....	83
III.C.7.- Efecto de la interacción del Ca <sup>++</sup> sobre la termorresistencia de la proteína.....	84
IV.- Conclusiones generales.....	95
IV.A.- El análisis de los mutantes de saturación en la posición 58 de glucanasa .....	95
IV.B.- Expresión y producción.....	95
IV.C.- Termorresistencia.....	95
V.- Referencias.....	96

## Prólogo

Como alguien dijo algún día, -una tesis no se acaba, se abandona.-

Ciertamente es así. Siempre hay algo que repetirías y lo que es peor, montones de ideas que surgen al analizar los datos y que te gustaría probar, pero que irremediablemente quedarán como simples ideas que no acabarán de plasmarse en nada concreto.

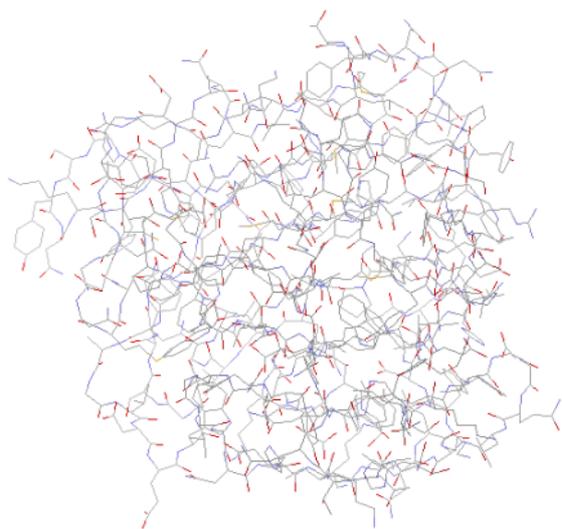
Las siguientes páginas son un resumen de parte de mi trabajo, realizado con la ayuda de mis compañeros, desde que comencé en el tema hasta el día en que decidí abandonarlo. En el texto están muchas de las ideas sobre la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa que durante este tiempo me han rondado por la cabeza, colocadas de una forma más o menos cronológica.

A partir de ahora en el texto, para simplificar, si no es necesario concretar su especificidad de sustratos llamaré tan sólo glucanasa la  $\alpha$ 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa.

Empiezas intentando dar respuestas a algunas preguntas y acabas con más dudas que respuestas.

Hace ya unos cuantos años, Enrique y Toni me preguntaron si quería seguir el trabajo de Jaume Pons sobre la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa. Sin saber demasiado bien con qué me iba a encontrar, le dije que sí.

Fue una especie de boda por poderes, en aquellos momentos tan sólo conocía su nombre, glucanasa. Baldo, a modo de maestro de ceremonias, tecleó una retahíla de letras mágicas que hicieron aparecer en la pantalla de su “Silicon” una imagen en tres dimensiones que no tardaría en convertirse en mi compañera de fatigas.



Baldo parecía emocionado señalando sobre la pantalla diferentes zonas de aquel amasijo de puntos y líneas. Para mí, aquello no era más que un ovillo. Una especie de madeja deshilachada de colores abigarrados.

Por aquel entonces, Jaume Pons estaba escribiendo su tesis y acabando sus últimos experimentos. A la vez que hacía todo esto comenzó a transferirme los conocimientos necesarios para manipular la glucanasa.

Su principal objetivo de tesis había consistido en hacer un “alanine scanning” sobre el lazo mayor de la glucanasa que se sitúa sobre el centro activo. Había encontrado, entre otras cosas, que el mutante M58A presentaba una actividad cerca de 6 veces superior a la del enzima

silvestre. Esto en un primer momento nos sorprendió, ¿cómo era posible que la naturaleza no hubiera optimizado esta posición si las diferencias de actividad eran tan evidentes?

Hago aquí un pequeño paréntesis para especificar que a no ser que se indique lo contrario y hagamos referencia a la posición dentro del cristal, la posición del aminoácido que indicamos con números incluye el péptido señal. Por lo tanto para saber su posición en el cristal, en la que no presenta el péptido señal, tan sólo bastará restar los 29 aminoácidos del péptido señal.

Este hallazgo determinó la orientación de mi trabajo de tesis. Me dedicaría a estudiar esta posición. Su implicación sobre la actividad del enzima y, si era posible, aumentar aun más dicha actividad. Paralelamente, me encargaría de desarrollar otro punto que quedaba pendiente de los objetivos de esta línea de trabajo del grupo, estudiar la termorresistencia del enzima y buscar si se podía mejorar. A ser posible, sin comprometer excesivamente la actividad del mismo.

De la lectura de la tesis de Jaume Pons y de Miquel Juncosa dejaba claro que existían dos aminoácidos esenciales en el funcionamiento de la actividad de centro activo, el aspártico 136 y el glutámico 134, y que el lazo mayor sobre el surco donde se situaba el centro activo influía determinadamente en la actividad del enzima. Pero, mi idea sobre el resto del enzima continuaba próxima a un ovillo representado en una pantalla de ordenador.

Poco a poco, durante estos años de experimentación mi modelo mental de la proteína ha ido adquiriendo progresivamente nuevos matices.

A lo largo de los siguientes capítulos explicaré de qué modo se han ido formando los diferentes modelos a medida que se destilaban datos de los experimentos que se han ido realizando sobre los distintos mutantes de la glucanasa.

Los estudios de actividad y termorresistencia, se han hecho en simultáneamente y aparecerán alternados a lo largo del texto.

Mostraré también alguno de los gráficos con los geles y cromatogramas más típicos, por si alguien quiere, algún día quisiera retomar el tema. De esta manera podrá tener alguna referencia sobre que es lo debería salir al hacer una cromatografía, o qué se debería de observar en un gel si el PCR ha funcionado bien.

## I.- Introducción

### I.A.- LOS CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos son las biomoléculas que más contribuyen a la biomasa del planeta, muy por encima de proteínas, ácidos grasos, ácidos nucleicos o lípidos. En su mayoría, estas moléculas, tienen una función estructural tanto en vegetales (celulosas) como en insectos (quitinas) o energética. Pero su versatilidad en la formación de enlaces les permite generar una gran diversidad de polímeros ramificados (Kobata, 1995). Además existe una enorme variedad de diferentes monómeros. Con tan sólo cuatro monosacáridos diferentes se pueden formar 35560 tetrameros (Cook, 1995), con aminoácidos o nucleótidos tan sólo se pueden obtener 48 tetrameros diferentes.

Pero no sólo presentan una función estructural y energética, también tienen un papel fundamental en los procesos de reconocimiento celular (Sharon y Lis, 1993; Lis y Sharon, 1998), adhesión célula-célula, embriogénesis, morfogénesis, desarrollo y envejecimiento (Kobata, 1995), entre otros procesos celulares.

Los azúcares están implicados en los mecanismos de plegamiento y exportación de las proteínas del retículo endoplasmático. Los patrones de glicosilación de las proteínas en el retículo endoplasmático van variando a lo largo del proceso de maduración de la proteína y son característicos de la ubicación final de la proteína en la célula.

Los carbohidratos con los que hemos trabajado son los  $\beta$ -glucanos por constituir el sustrato de nuestra enzima.

#### I.A.1.- Los $\beta$ -glucanos

Los  $\beta$ -glucanos son homopolímeros de D-glucopiranososa unidos en configuración  $\beta$ . Pueden ser homoglicanos cuando los enlaces entre glucosas se dan en las mismas posiciones o heteroglicanos si existe diversidad en los enlaces presentes; pudiendo dar lugar a cadenas lineales o ramificadas. El peso molecular de los mismos no es fijo, depende del número de monosacáridos que lo integran. El más abundante de los  $\beta$ -glucanos es la celulosa, aunque existen muchos otros  $\beta$ -glucanos producidos por todo tipo de organismos (Pitson *et al.*, 1993).

Se encuentran en plantas superiores y microorganismos como entidad estructural de las paredes para mantener la rigidez y como elemento de protección. También es común su uso como material de reserva citoplasmática y vacuolar.

### I.A.2.- Fuente natural de los $\beta$ -glucanos

Son muchas las fuentes naturales de las que derivan los  $\beta$ -glucanos, y este origen suele dar lugar a su nombre. Nombrar los glucanos por la fuente de donde se obtienen puede generar ambigüedades, sirva a modo de ejemplo las laminarinas, en las que nos podemos encontrar tanto glucanos con enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6), como glucanos con tan sólo enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3). También puede suceder que presentando el mismo tipo de enlaces y reciban diferente nombre, atendiendo también a su origen. En ocasiones aunque presenten los mismos tipos de enlaces, la proporción en las que se presentan los mismos puede variar considerablemente de unos a otros compuestos.

Los (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$ -glucanos pueden provenir de algas (xantofíceas), líquenes, siendo especialmente abundantes en gramíneas como el arroz, trigo, avena, centeno y cebada.

**Tabla I.1.:** Principales glucanos naturales y aplicaciones (Juncosa, 1995).

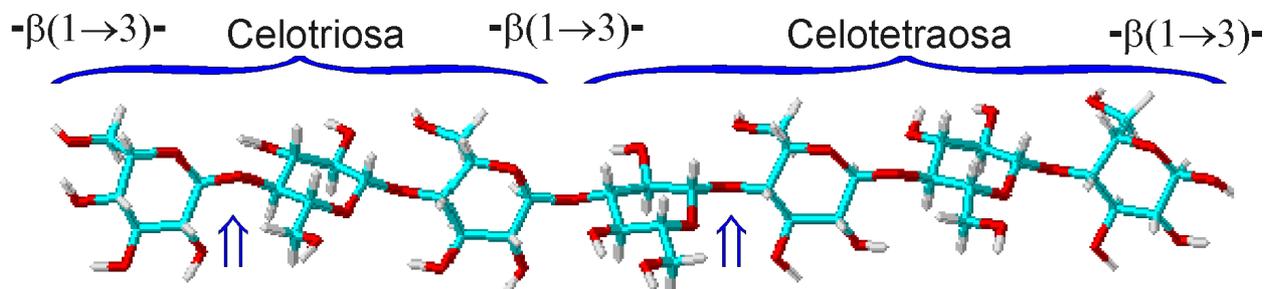
Nombre	Enlaces (relación)	Cadena	*DP/MM(Da)	Fuente	Estructura	Funciones y/o aplicaciones
Curdiano	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)	Lineal	455/	<i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Agrobacterium sp.</i> , <i>Rhizobium sp.</i>	[-G1 $\rightarrow$ 3G-]n	Aditivo alimentario, formador de geles, cambia a cadena triple al calentarlo
Paquimano	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)	Lineal		<i>Poria cocos</i>	[-G1 $\rightarrow$ 3G-]n	Inmunoestimulante
Paraalmidón	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)	Lineal	150/	<i>Euglena gracilis</i>	[-G1 $\rightarrow$ 3G-]n	Reserva energética
Crisolaminarano	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)	Lineal	34/	<i>Chrysophyta</i>	[-G1 $\rightarrow$ 3G-]n	Reserva energética
Laminarina	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6) (7:1)	Muy poco ramificado	30/	<i>Laminaria digitata</i> , <i>L. hyperborea</i>		Reserva energética
Laminarina	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)	Lineal	24/	<i>cloustoni</i>	[-G1 $\rightarrow$ 3G-]n	Reserva energética
Laminarina	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6) (3:2)	Ramificada		<i>Eisenia bicyclis</i>		Reserva energética
Glucano de levadura	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6) (4:1)	Ramificada	1500/2.4x10 <sup>6</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[-G1 $\rightarrow$ 3G-]n	Reserva energética
Esquizofilano	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6) (3:1)	Ramificada		<i>Schizophyllum comune</i>		Estructura en triple hélice. Reduce el efecto carcinogénico de algunas sustancias o virus.
Escleroglucano	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6) (3:1)	Ramificada	110/	<i>Sclerothinia</i>	G1 ↓ [-G1 $\rightarrow$ 3G1 $\rightarrow$ 3 <sup>6</sup> G-]n	Estructura en triple hélice
Lentinano	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6) (5:2)	Ramificada	/4-8x10 <sup>5</sup>	<i>Lentinus edodes</i>	G1 ↓ [-G1 $\rightarrow$ 3G1 $\rightarrow$ 3 <sup>6</sup> G-]n	Inmunoestimulante, reduce el efecto carcinogénico de algunas sustancias o virus. Es de triple hélice dextrógira
Pustulano	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)	Lineal		<i>Umbilicaria pustulata</i>	[-G1 $\rightarrow$ 6G-]n	Formador de geles
Luteano	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)	Lineal		<i>Penicillium sp.</i>	[-G1 $\rightarrow$ 6G-]n	
Glucano RSIII	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 4) (1:1)	Lineal		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	[-G1 $\rightarrow$ 3G1 $\rightarrow$ 4G-]n	
Liquenano	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 4) (2:1)	Lineal		<i>Usnea barbata</i> , <i>Cetraria islandica</i>	[-G1 $\rightarrow$ 4G1 $\rightarrow$ 4G1 $\rightarrow$ 3G1-]n	
Glucano de cebada	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 4) (2.5:1)	Lineal	600-1200/	<i>Hordeum vulgare</i>	[-G1 $\rightarrow$ 4G1 $\rightarrow$ 4G1 $\rightarrow$ 3G1-]n	Muy viscoso en disolución
Celulosa	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)	Lineal	1000-1500/	<i>Acetobacter xylinum</i>	[-G1 $\rightarrow$ 4G-]n	Forma parte de la lignocelulosa, es la forma más abundante de la biomasa de la tierra

\*DP: Grado de polimerización.

Los (1→3),(1→4) β-glucanos de las gramíneas forman parte de las paredes celulares tanto de raíces, tallo, y hojas. Pero es en el grano donde abundan más, siendo el componente mayoritario en su endosperma, concentrándose sobre todo en sus paredes celulares. El grado de polimerización oscila entre los 600 y 1200 unidades con masas moleculares de 100-200 kDa (Bielecki y Galas, 1991).

### I.A.3.- β-glucano de cebada

Desde el punto de vista estructural, el β-glucano de cebada, se puede considerar formado por un 65% de celotriosa ( $-\beta\text{-D-glucapiranos}(\text{1}\rightarrow\text{4})_3-$ ) y el 27 % de celotetraosa ( $-\beta\text{-D-glucapiranos}(\text{1}\rightarrow\text{4})_4-$ ) unidos, aleatoriamente, por enlaces β-(1→3) a lo largo de la molécula (Parrish *et al.*, 1960; Staudte *et al.*, 1983). El 8 % restante corresponde a agrupaciones de hasta 10 unidades de D-glucosa unidas mayoritariamente por enlaces β-(1→4), siendo los enlaces β-(1→3) poco frecuentes y raramente consecutivos (Luchsinger *et al.*, 1965). Corresponden al 10 % del peso seco del grano y el 75 % del las paredes celulares del endosperma. También podemos encontrar en el endosperma celulosa y ligninas íntimamente asociadas al β-glucano que confieren rigidez a la cáscara del grano.



**Figura I.1.:** Estructura del β-glucano de cebada. Las flechas en azul indicamos los enlaces hidrolizados por la β-(1→3),(1→4)glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Es decir por los enlaces β-(1→4) adyacentes a enlaces β-(1→3).

### I.A.4.- Propiedades físico-químicas

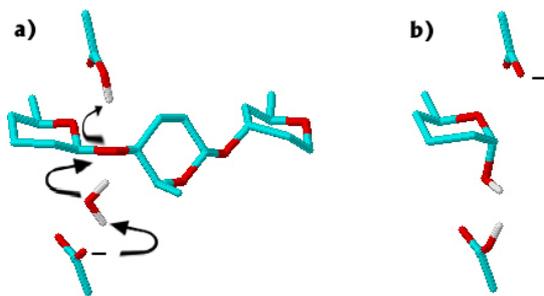
A diferencia de los polisacáridos que tan sólo presentan un tipo de enlace como la celulosa, β-(1→4), o la laminarina, β-(1→3), la presencia de diferentes enlaces glicosídicos en los β-(1→3),(1→4) glucanos dificulta la formación de puentes intermoleculares impidiendo el plegamiento compacto de la molécula. Esto facilita la interacción con el agua a la vez que conserva algunas interacciones con otros glucanos, especialmente por las regiones en que los β-(1→4) consecutivos abundan.

De estas propiedades se derivan la doble función que, según Bamforth (1982), desempeña en la planta: estructural, osmoreguladora (las plantas en condiciones de sequia presentan mayor contenido de  $\beta$ -glucano), a parte de servir como material de reserva.

Presenta unas propiedades fisico-químicas interesantes para modificar el flujo de fluidos como son emulsinar, encapsular, flocular, estabilizar o incluso actuar como quelante. También pueden actuar como soporte hidrofílico, absorbentes, transportadores, intercambiadores iónicos, conductores, geles y lubricantes (Bielecki y Galas, 1991).

## I.B.- GLICOSIDASAS

Las glicohidrolasas catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos por un mecanismo ácido-base general. Podemos dividir las en dos grandes grupos según la geometría que presenten los dos aminoácidos catalíticos de su centro activo (McCarter y Withers, 1994; Davies y Henrissat, 1995). Los enzimas que actúan con retención de configuración presentan los oxígenos del carboxilato de sus aminoácidos del centro activo separados por alrededor de 5.5 Å. En aquellos enzimas que actúan por inversión de configuración esta separación es de alrededor de 9.5 Å (Sinnott, 1987; Sinnott, 1990; McCarter y Withers, 1994). Los aminoácidos catalíticos suelen ser aspártico o glutámico, aunque puede presentarse tirosina en contadas ocasiones, por ejemplo, en la  $\beta$ -galactosidasa (Ring *et al.*, 1988; Ring y Hubber, 1990), neuramidasa viral (Burmeister *et al.*, 1992) y sialidasa bacteriana (Crennell *et al.*, 1993), pero nunca histidina.

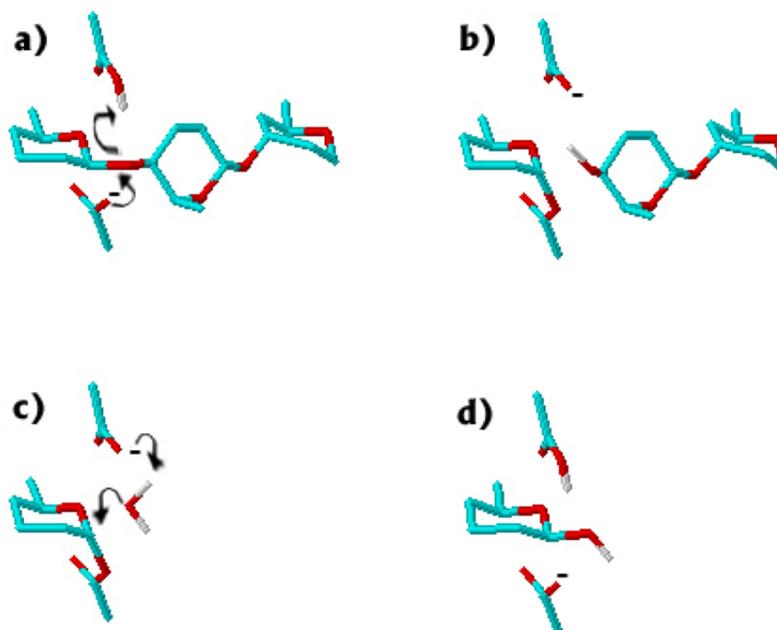


**Figura I.2.:** Mecanismo catalítico por inversión de configuración.

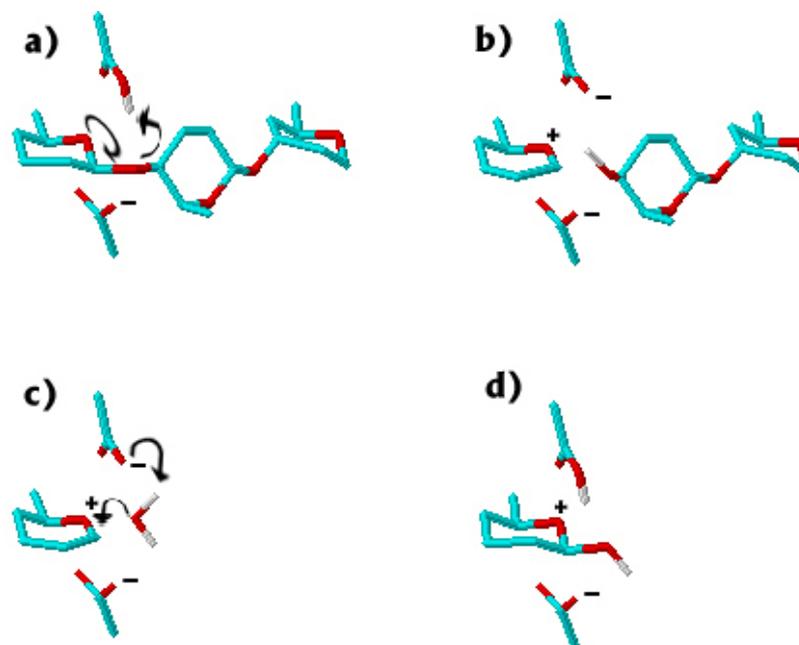
El mecanismo propuesto para las glucosidasas que actúan con inversión de configuración, figura I.2, opera a través de un mecanismo de desplazamiento simple con una molécula de agua cuya nucleofilia se ve aumentada por base general del enzima (Koshland, 1953; Sinnott, 1990). Este agua ataca al carbono anomérico del grupo saliente, a la vez que el oxígeno glicosídico es protonado por el ácido general.

El modelo propuesto para los enzimas que actúan con retención de configuración, es un mecanismo ácido/base general de doble desplazamiento en dos etapas formándose e hidrolizándose un intermediario enzima glicosil (Koshland, 1953). La primera etapa, la glucosidación, el residuo que actúa como ácido general protona el oxígeno glicosídico de forma simultánea a la rotura del enlace glicosídico a escindir. Mientras el carboxilato desprotonado,

que actúa de nucleófilo, estabiliza el intermediario oxocarbocatiónico mediante interacción electrostática, figura I.1, o por formación de un intermediario covalente, figura I.2.



**Figura I.3.:** Mecanismo catalítico por retención de configuración, con intermediario covalente.



**Figura I.4.:** Mecanismo catalítico por retención de configuración, con intermediario oxocarbenionico. Este posible mecanismo catalítico, esta perdiendo peso a favor de la hipótesis del intermediario covalente.

El paso previo a la hidrólisis es la unión del sustrato al enzima. Después de esta unión pueden producirse, según de la topología del enzima, la separación completa del complejo enzima sustrato o producirse un ataque repetitivo del sustrato avanzando a lo largo de la cadena

glucosídica hasta que otra región hidrolizable del sustrato de sitúe sobre el centro activo. Al cabo de un determinado número de cortes el complejo enzima sustrato acaba por disociarse totalmente.

Según la topología de su centro activo, las glicosidasas se pueden clasificar en tres categorías, ya sea en bolsillo (pocket), surco (cleft) y tunel (tunnel).

La topología en tunel es común en las exopolisacaridasas, ya que es óptima para reconocer el extremo de los polisacaridos. Se encuentra en exopolisacaridasas como la glucoamilasa y la  $\beta$ -amilasa y también en monosacaridasas como las  $\beta$ -galactosidasas,  $\beta$ -glucosidasas, sialidasas y neuraminidasas.

La topología en surco permite acceder aleatoriamente a los azúcares internos del polisacarido, por ello es común entre endopolisacaridasas, lisozimas, endocelulasas, quitinasas,  $\alpha$ -amilases, xilanasas,  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)glucanasas y  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) glucanasas.

La topología de tunel deriva de la tipo surco, pero con la variación en la longitud de los lazos exteriores del surco los cuales son mucho mayores llegando a cubrir el centro activo. Este tipo de estructura tan sólo se han encontrado en las celobiohidrolasas, enzimas con actividad exo que liberan progresivamente unidades de celobiosa.

Los enzimas en general, se clasifican usando un código asignado por la Enzyme Commission (E.C.) de la International Union of Biochemistry. En el caso de las  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4) glucanasas estarían clasificadas con el código E.C. 3.2.1.73. Dicha clasificación tiene que ver con el tipo de reacción que realiza el enzima. El 3 corresponde a las hidrolasas, el 2 glicosidasas, el 1 al heteroátomo del enlace glicosídico hidrolizado (1 para enlaces O-glicosídicos, 2 para enlaces N-glicosídicos, 3 para enlaces S-glicosídicos), y el 73 a la especificidad de sustrato. Ahora bien, en el caso de las glicosidasas, también pueden presentar actividad sobre otros sustratos, por lo que esta clasificación puede resultar insuficiente. Debido a esto Henrissat (1991) propuso una clasificación basada en la secuencia aminoacídica de las 301 glicosidasas conocidas en aquel momento, aprovechando la correlación entre secuencia y estructura, subclasificándolas. En la actualidad ya se han identificado en 87 familias, que son periódicamente actualizadas en la página web (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/ghf.html>).

Ahora bien, en esta clasificación se observa como enzimas estructuralmente diferentes tienen especificidad por sustratos similares por evolución convergente y enzimas de la misma familia presentan especificidades diferentes, fruto de una evolución divergente, por lo que esta clasificación puede darnos información mecanicista sobre el enzima y ciertos indicios sobre la especificidad por sustrato.

### I.B.1.- Glucanasas

La  $\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow4)$  glucanasa de *Bacillus licheniformis* pertenece a la familia 16 de las glucosidasas. Las  $\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow4)$  glucanasas (EC 3.2.1.73) bacterianas aisladas hasta la fecha se encuentran mayoritariamente en el género *Bacillus*, pero también se han aislado de *Clostridium thermocellum*, *Fibrobacter succinogenes* y *Rhodothermus marinus*. A esta familia también pertenecen otras glucohidrolasas como la  $\beta(1\rightarrow3)$  glucanasa (EC 3.2.1.39) de *B. circulans*, la laminarinasa (EC 3.2.1.39) de *C.thermocellum*, la agarasa (EC 3.2.1.81) de *Streptomyces coelicolor* y la  $\kappa$ -carragenasa (EC 3.2.1.83) de *Alteromonas carrageenovora*.

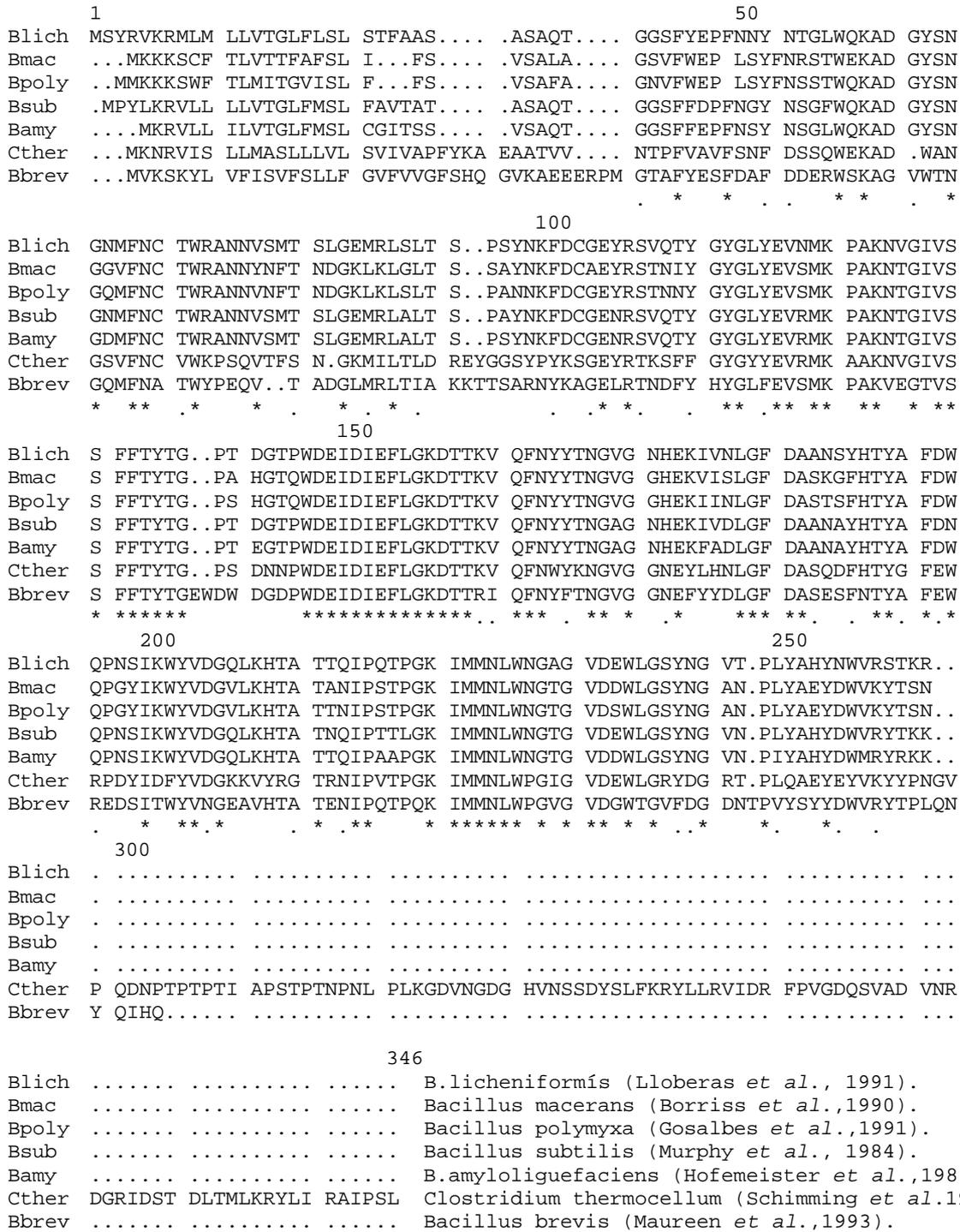
También encontramos en la familia 17 las  $\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow4)$  glucanasas, y las  $\beta(1\rightarrow3)$  glucanasas (EC 3.2.1.39) de plantas (*Hordeum vulgare*, *Oryza sativam*, *Avena sativa*, *Triticum aestivum* y *Nicotiniana glauca*), así como la exo- $\beta(1\rightarrow3)$ glucanasas (EC 3,2.1,58) de levadura.

En los cereales intervienen en el metabolismo de los  $\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow4)$ glucanos de los cereales durante el proceso de germinación. Estos son producidos en la aleurona, la capa más externa del endosperma, y son secretados hacia el interior del endosperma donde degradan las paredes celulares y permiten el acceso a los enzima almidolíticos a los gránulos de almidón que actúan como fuente de energía (Ballance *et al.*, 1976). También podrían actuar en los procesos de formación de tejidos vegetativos jóvenes (Slakeski *et al.*, 1990).

Los dos isoenzimas de  $\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow4)$  glucanasa de cebada que se conocen son monoméricos, y tienen un peso molecular de unos 30 kDa y contienen un sitio de glicosidación.

Las  $\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow4)$  glucanasas de cebada presentan una estructura en barril ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub> con una elevada identidad (50%) a las  $\beta(1\rightarrow3)$  glucanasas expresadas por las plantas en mecanismo de defensa ante infecciones microbianas (Dixon y Lamb, 1990), actuando principalmente en la digestión de paredes celulares de hongos (Hrmova y Fincher, 1993). También sus estructuras cristalográfica son tremendamente similar y la posición de sus residuos catalíticos (Chen *et al.*, 1993) está conservada. Esto podría hacer pensar que han evolucionado a partir de un ancestro común hacia especificidades de sustrato diferentes (Varghese *et al.*, 1994; figura 4b).

Las  $\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow4)$  glucanasas bacterianas son secretadas al medio extracelular por lo que se les supone una función en la degradación de diferentes sustratos para la obtención de energía por parte de la célula. Se trata de enzima con estructura en “jellroll”  $\beta$ -sandwich de entre 25 a 30 kDa (Borriss *et al.*, 1990; Gosalbes *et al.*, 1991; Louw *et al.* 1993; Juncosa *et al.*, 1994b), con punto isoelectrico básico, alta tolerancia de pH y alta termorresistencia.



**Figura I.5.:** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de isoformas de la familia de las  $\alpha(1\rightarrow3),(1\rightarrow4)$  glucanasas microbianas. Símbolos: \* la identidad entre los diferentes residuos. . cambio conservativo.

Las  $\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow4)$  glucanasas del género *Bacillus* son las mejor caracterizadas. Han sido clonados los genes de *B. subtilis* (Cantwell y McConnell,1983), *B. amyloliquefaciens* (Hofemeister et al., 1986; Borriss et al., 1990) *B. macerans* (Borriss et al., 1988; Borriss et al. 1990), *B. circulans* (Bueno et al., 1990; Yahata et al., 1990), *B. polymyxa* (Gosalbes et al.,

1991), *B. licheniformis* (Lloberas *et al.*, 1991) y *B. brevis* (Louw *et al.*, 1993). Aunque también se conocen otras como las de *Fibrobacter succinogenes* (Teather y Erfle, 1990), de *Clostridium thermocellum* (Schimming *et al.*, 1992), de *Ruminococcus flavefaciens* (Flint *et al.*, 1993) y de *Rhodothermus marinus* (Spilliaert *et al.*, 1994).

En nuestro grupo se trabaja principalmente con la  $\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow4)$ glucanasa de *B. licheniformis*, una proteína de 214 aminoácidos y 24370 Da y un punto isoeléctrico básico (pI 8.5-8.7). Con este enzima se realizan estudios de estructura/función, termostabilidad y mecanísticos. El enzima fue aislado a partir de residuos de la industria papeleras (Lloberas *et al.*, 1988), posteriormente se clonó, secuenció y expresó en *E. coli* (Lloberas *et al.*, 1991), caracterizando cinéticamente la proteína purificada (Planas *et al.*, 1992a), y posteriormente se mejoró el proceso de expresión y purificación (Planas *et al.*, 1992b). En un primer momento se realizó una aproximación a su estructura por espectroscopía de infrarojos con transformada de Fourier (Querol *et al.*, 1992), aunque posteriormente se consiguió cristalizar y resolver su estructura por difracción por rayos X (Hahn *et al.*, 1995). Presenta su actividad máxima a pH 7.2 y 55 ° C (Pons, 1996; Pons *et al.*, 1997b).

Las actividades observadas para sustratos naturales como liquenano de musgo (*Cretaria islandica*) o el  $\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow4)$ glucano de cebada son muy similares a las observadas en los enzimas de *B. amyloquefaciens* o *B. macerans* (Planas *et al.*, 1992; Malet *et al.*, 1993). Ahora bien, el elevado error que se derivaban de medir las actividades usando sustratos naturales, alrededor del 25 % se intentó subsanar usando como sustratos oligosacaridos cromofóricos de bajo peso molecular (Malet y Planas, 1997).

Mediante mutagénesis dirigida se determinaron los aminoácidos catalíticos esenciales que resultaron ser el Glu134 y Glu138 (Planas *et al.*, 1992b; Juncosa *et al.*, 1994a). También se determinó que un tercer residuo, el Asp136, aun no siendo esencial, si es tremendamente importante pues contribuye a modular el pK en el microentorno de los residuos catalíticos. Estos mismos residuos fueron posteriormente identificados en *B. macerans* (Hahn *et al.*, 1995b). Posteriormente se asignó el papel de nucleófilo catalítico al Glu134 y el de base general al Glu138 mediante rescate químico de mutantes inactivos (Viladot *et al.* 1999, Viladot 1999).

### I.B.2.- Aplicación biotecnológica de las glucohidrolasas en general

Harinas : Las amilasas se usan para degradar los almidones y las pentosanasas para degradar polímeros de arabinosas y xilosa. Las amilasas se usan para unificar las cualidades de la harina, ya que el trigo puede presentar contenidos muy diversos de fibra y almidón. Eso permite

controlar las propiedades de la masa del pan. Las  $\alpha$ -amilasas de origen fúngico son las más utilizadas todo y que las de origen bacteriano confieren menor rigidez al producto final (Van Oort y Hamer, 1991).

Vitivinícola y zumos de frutas: Los compuestos más usados son las pectinasas, proteasas, celulasas y hemicelulasas. Esto permite la mejora en la extracción de los mostos o zumos de las vacuolas del interior de las células y la filtración de los mostros o zumos.

Textil: La primera aplicación fue el lavado a la piedra de los pantalones tejanos. Mejoraba los rendimientos ya que el lavado físico a la piedra deterioraba las prendas y las maquinaria. El bioblanqueo producido por las  $\beta(1\rightarrow4)$  glucanasas es debido a que cortan las cadenas más externas de las microfibrillas. Esta característica puede ser usada para desteñir el producto ya que las fibras externas son las que acumulan la mayor parte del tinte. El efecto de desencrudado de la fibra de algodón producido por  $\beta(1\rightarrow4)$  glucanasas produce un tacto más suave de la tela y reduce la formación de bolas con el uso de la prenda. Todo ello contribuye a conseguir un producto final más uniforme (West, 1991).

Farmacía: Aplicaciones para tests de determinación de desordenes intestinales, por ejemplo la celobiasa (West, 1991).

Química: Permite modificar o sintetizar nuevos azúcares complejos aprovechando la estereoselectividad de los enzimas. Es en muchos casos una buena alternativa a la síntesis química.

Otros: A partir de paredes de levaduras hidrolizadas se pueden producir adhesivos, bioemulsificadores, hidrolizados de celulosa para galletas bajas en calorías, producción de combustibles líquidos a partir de residuos agrícolas, urbanos e industriales, sobre todo en la industria papelera (Bielecki y Galas, 1991; Pitson, 1993; Gilkes, 1991; Warren, 1993).

### I.B.3.- Aplicación biotecnológica de las $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ glucanasas

El uso de estos enzimas en cuanto a volumen de consumo se concentra básicamente en dos industrias: la cervecera y la industria de fabricación de piensos. La industria usa estos enzimas para la producción de piensos dirigidos a animales con estómagos monogástricos, principalmente cerdos y aves. A estos animales les es imposible realizar una degradación completa de los  $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ glucanos provenientes del endosperma del grano y al tratarse este de uno de los componentes de la pared celular su presencia dificulta el acceso al interior celular, impidiendo el acceso a los granulos de almidón, lípidos y otras reservas proteíca de las células del grano. Esto produce además un aumento en la viscosidad que no tan sólo se traduce en una

pobre asimilación de estos azúcares, sino que además se produce un complejamiento con algunas enzimas digestivas (Ikeda y Kusano, 1983) que pierden parcialmente su eficacia. Esta masa viscosa dificulta la asimilación de los diferentes nutrientes por parte del intestino. Además estos glucanos son responsables de un problema conocido como heces líquidas (Pérez-Vendrell y Francesch, 1991) entre los avicultores, ya que aumentan el contenido de agua de las heces produciendo enfermedades en las extremidades de las aves y salpicaduras de heces en los huevos con la consiguiente pérdida de valor comercial.

Los glucanos provenientes de las maltas contribuyen a dar cuerpo a la cerveza contribuyendo a proporcionar aroma y estabilizar la espuma. Pero también generan problemas derivados de la barrera física que los glucanos (Bamforth 1982) suponen para el acceso de las amilasas al gránulo de almidón del endosperma, retardando y bajando el rendimiento del proceso de extracción de los azúcares para la fermentación. Aumenta la viscosidad y turbidez del producto reduciendo la velocidad de filtración del producto. Además los filtros se saturan con mayor facilidad encareciendo considerablemente el proceso.

En definitiva, el uso de glucanasas puede minimizar todos estos problemas.

El lazo entre las posiciones 51 y 67 fue estudiado en nuestro grupo por Jaume Pons. Se trata de un gran lazo que se sitúa lateralmente a lo largo de surco del centro activo de la  $\beta$ -glucanasa. Debido a su gran tamaño y por encontrarse dentro del centro activo, se creyó interesante estudiar detenidamente este lazo. Ya que estas dos características hacían pensar que podía tener un papel relevante tanto en la catálisis como en la estabilidad térmica del enzima. El papel de los aminoácidos en cada una de sus posiciones en el lazo se estudió mediante la técnica “alanine scanning mutagenesis” (Cunningham y Wells, 1989), cambiando cada posición aminoacídica por alanina.

De todas las posiciones aminoacídicas estudiadas, la que resultó más interesante fue la posición 58, que se encuentra precisamente en el vértice del lazo, en la posición más próxima a los aminoácidos del centro activo. El mutante M58A, representante de la posición 58, presentaba una actividad cerca de 6 veces mayor a la del enzima silvestre. Este hecho reafirmó el interés del grupo por el lazo y más concretamente por estudiar la posición 58.

## **I.C.- OBJETIVOS**

El objetivo general se engloba dentro de la línea de investigación del grupo en ingeniería de proteínas de las glucosidas para analizar la relación entre estructura y función de las proteínas y rediseñar su actividad y estabilidad.

Como objetivos específicos de esta tesis esta :

1. Rediseñar el enzima con objeto de tratar de mejorar la actividad enzimática y determinar la función del lazo mayor del centro activo en dicho proceso.
2. Análisis y rediseño de la estabilidad térmica del enzima, en particular determinar la influencia del lazo mayor en la desnaturalización térmica, relacionándolo con el proceso y tipo de plegamiento. Asimismo del de unión de  $\text{Ca}^{++}$ .

## II.- Material y métodos

### II.A.- MATERIAL

#### II.A.1.- Equipamiento

Agitador vórtex Heidolp Top-mix 94323  
 Autoclave Matachana 140 L2  
 Balanzas Sartorius R200 y PTI200  
 Baño termostático bioblock 92617  
 Baño termostático de agua Huber Polystat  
 Baño termostático de agua LKB 2219.Multitemp II  
 Campana de flujo laminar Telstar CAM 1400-I  
 Centrífuga Heraeus Minifuge T  
 Centrífuga Sorvall RCSC  
 Contador Geiger Minimotor G-M tube  
 Cubetas de electroforesis para geles de agarosa BioRad  
 Desionizador de agua Milli-Qplus  
 Equipo de secuenciación Macrophor, Pharmacia  
 Espectrofotómetro Varian, Cary 1E y Cary 4  
 Estufa de cultivos Memmert  
 Estufa de secado Heraeus  
 Fuentes de alimentación Atom 502, BioRad 200/2.0 y LKB 2297 Macrodrive 5  
 Incubador de aire con agitación orbital Braun, modelo Centromat  
 Lámpara de iluminación UV Atom, Uvatom-70  
 Medidor de pH Radiometer, pH Meter 26  
 Microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415 C  
 Rotores SS34, GSA y SW.27  
 Transiluminadores de radiación ultravioleta Ultra-Violet Products, TM-36 y TC-365-A  
 Termociclador MiniCycler  
 Ultracentrífuga preparativa Beckman L8-M  
 Ordenador Gráfico "Silicom Graphics Indigo 2"

#### II.A.2.- Cepas de *E. coli* usadas

TG1 [*supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F' (traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15)*]  
 XL1-Blue [*r<sub>k</sub><sup>-</sup> recA<sup>-</sup>*] es una cepa *recA<sup>-</sup>* permisiva supresora de mutaciones -ambar que modifica pero no restringe el DNA transfectedo y que permite la selección con β-galactosidasa. El genotipo de la cepa es *supE<sup>+</sup> lac<sup>-</sup> hsdR17 recA 1 F'proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15* (Bullock *et al.*, 1987).

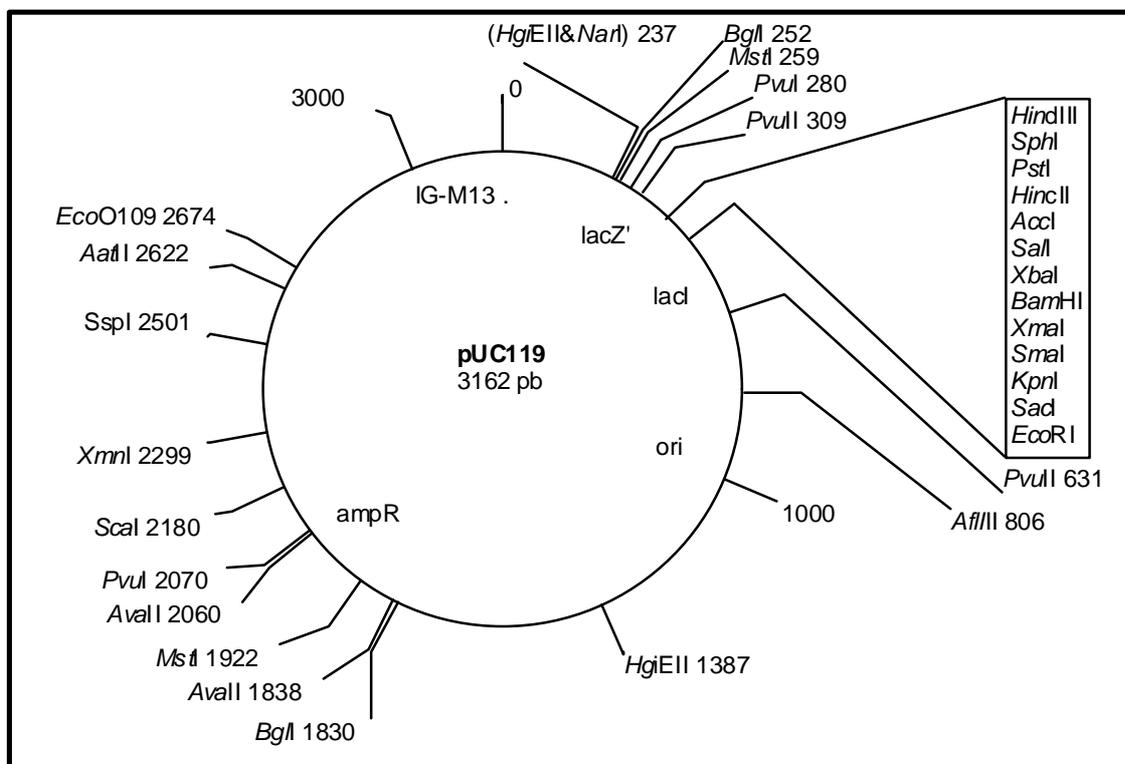
BL21(DE3). Es una cepa para expresión, lisógena del fago λDE3, que incorpora el gen de la T7-RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG. Deficiente en TrxB (Tioredoxina). Resistencia a Kanamicina.

### II.A.3.- Vectores

Tanto la expresión como clonaje se han realizado usando el plásmido pUC119. Aunque también se usó PET21, con unos niveles de expresión altísimos pero en los que casi toda la proteína se encontraba en la fracción insoluble del cultivo. Esta proteína se podía recuperar usando urea, pero la proteína así obtenida no era muy recomendable usarla para caracterizar los parámetros cinéticos del enzima. Por lo que se dejó de lado la expresión PET21.

El plásmido pUC119 es un fagémido, es decir, deriva del plásmido pUC19 al que se le ha añadido secuencia de iniciación, terminación y empaquetamiento del fago M13KO7. Esta característica permitiría la obtención de un DNA monohebra (ss-DNA), que serviría para secuenciarlo o para usarlo en mutagénesis dirigida.

Se trata de un plásmido de alto número de copias, esto a parte de conseguir un nivel de expresión de proteína clonada aceptable, permite purificar gran cantidad de DNA de los cultivos. Este alto número de copias (Sambrook, J. *et al.*, 1989), alrededor de unas 600, es debido a que carece del gen *rop* que controla el número de copias y que se sitúa al lado del origen de replicación (*ori*).



**Figura II.1.:** Esquema del plásmido pUC119, se indica también la posición de sus dianas únicas.

## II.B.- MEDIOS DE CULTIVO

### II.B.1.- Métodos de esterilización

Todos los medios de cultivos y soluciones que no se degradan a altas temperaturas, han sido autoclavados a 120 °C durante a 20 minutos.

En el caso de antibióticos, el X-gal o el IPTG que no soportan estas temperaturas la esterilización se realiza usando un filtro de 0.22 µm de diámetro de poro.

### II.B.2.- Composición de los medios de cultivo

Las concentraciones de antibióticos, básicamente ampicilina, tanto en medio sólido como en líquido suele ser 100 µg/L Aunque ocasionalmente para mutantes que expresan poca proteína puede llegarse a 200 µg/L.

Medio LB (Luria-Bertani)

Medio rico usado normalmente como medio sólido en placas de Petri.

Bactotripton (Adsa-Micro)	10 g
Extracto de levadura (Adsa-Micro)	5 g
NaCl (Fluka)	10 g
Agar (Adsa-Micro)	15 g

Enrasar hasta 1 L con agua destilada

Nutrient Agar (Adsa-Micro)

Medio rico ya preparado, también muy usado para cultivo sólido en placas de Petri.

Extracto de carne	1 g
Extracto de levadura	2 g
Peptona	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g

Proporciones por litro de medio.

Medio 2YT

Medio líquido rico para obtener un alto título de células, y por ende mucho DNA o proteínas.

Bactotripton (Adsa-Micro)	10 g
Extracto de levadura (Adsa-Micro)	5 g
NaCl (Fluka)	10 g
Agar (Adsa-Micro)	15 g

Enrasar hasta 1 L con agua destilada.

### Medio 2SB Broth (Scharlau)

Medio líquido muy rico, lo usamos para producir grandes cantidades de proteínas.

Peptona (caseína triptomizada)	24 g
Extracto de levadura	48 g
Fosfato dipotásico	15 g
Fosfato potásico	1.7 g

Proporciones por litro de medio.

### II.B.3.- Preparación de placas de Petri con X-Gal, IPTG y ampicilina

Usando como base el medio LB, ya esterilizado, pero antes de que solidifique, se le añaden X-Gal, IPTG y ampicilina, esterilizados usando un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro

El X-Gal es un sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa y sirve para identificar las bacterias *LacZ*<sup>+</sup>. Cuando es prodesado bira a azul. Se suele preparar a una concentración de 20 mg/ml en dimetilformamida en la disolución de Stock. La disolución final en el medio será de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Su conservación ha de ser a 4°C en ausencia de luz.

El IPTG permite liberar el represor de *LacZ*. Se prepara a una concentración Stock de 20 mg/ml en H<sub>2</sub>O. La concentración final en el medio será de 50  $\mu\text{g/ml}$ .

La ampicilina es el antibiotico usado con el PUC119. Se prepara a una concentración Stock de 100 mg/ml en H<sub>2</sub>O. La concentración final en el medio será de 50  $\mu\text{g/ml}$ .

### II.B.4.- Preparación de placas de Petri con $\beta$ -glucano para el test de actividad de la $\beta$ -glucanasa

El  $\beta$ -glucano, que añadiremos al litro de medio, se solubiliza en agua ( $\cong$  50ml) por litro a una temperatura de 65°C y sonicando si fuera necesario. La solubilización toma su tiempo y es conveniente emprender la tarea de solubilizar el  $\beta$ -glucano, justo después de preparar el medio mientras este se autoclava.

Una vez solubilizado debe ser "pasteurizado" aprovechando la temperatura del medio después de salir del autoclave, cuando este medio está alrededor de 80 °C. La disolución final del  $\beta$ -glucano en el medio ha de ser de 0.04 %, en la disolución final.

## **II.C.- MÉTODOS CON CÉLULAS**

### **II.C.1.- Preparación de células competentes**

- 1-** Inocular 3 ml de 2xYT con una colonia única procedente de una placa. Incubar durante 12 horas a 37°C.
- 2-** Inocular 2 frascos Erlenmeyer que contengan 100ml de medio 2xYT con 300 µl del pre-cultivo anterior. Incubar hasta alcanzar una  $A_{600}=0,6$ .
- 3-** Enfriar los Erlenmeyers a 0°C en un baño de agua con hielo picado.
- 4-** Enfriar tubos de 50 ml estériles.
- 5-** Transferir asépticamente los cultivos a los tubos. Centrifugar a 4.000 *g* durante 10 minutos a 4°C.
- 6-** Eliminar completamente el medio sobrenadante y resuspender el sedimento 1/2 del volumen inicial con CaCl<sub>2</sub> 50 mM estéril.
- 7-** Mantenerlo de 15 a 30 minutos en hielo picado a 0°C.
- 8-** Centrifugar a 4.000*g* 10 minutos a 4°C.
- 9-** Eliminar completamente el sobrenadante y resuspender el sedimento en 1/15 del volumen original con CaCl<sub>2</sub> 50 mM estéril.
- 10-** Mantener 1 hora en hielo picado a 4°C.
- 11-** Añadir glicerol hasta el 15% (v/v) y distribuir la disolución en tubos Eppendorf en alícuotas de 150 µl.

### **II.C.2.- Transformación de células competentes**

- 1-** Partimos de alícuotas de 150 µl de células competentes.
- 2-** Se le añade una disolución de DNA plasmídico, generalmente procedente de una reacción de ligación:
  - a: 150 µl de competentes + 100 ng de plásmido en 1-5 µl de TE.
  - b: " +100 ng de plásmido no recombinante en 1-5 µl de TE (control positivo).
  - c: " +5 µl de TE (control negativo).
- 3-** Incubar en hielo picado durante 30 minutos.
- 4-** Transferir a un baño a 42°C durante 2 minutos (temperatura y tiempo exactos).
- 5-** Transferir inmediatamente a hielo picado.
- 6-** Añadir 400 µl de medio rico (LB o 2xYT) e incubar a 37°C 1 hora, para permitir la expresión del fenotipo.
- 7-** Extender las células transformadas en una placa de Petri con LB+ampicilina.
- 8-** Incubar las placas invertidas durante 14 horas a 37°C.