

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y MODIFICACIÓN
FUNCIONAL DE LA GLUCOAMILASA DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE VAR. *DIASTATICUS*

LORENA LATORRE GARCÍA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 29 de febrer de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Lucas del Castillo Agudo
- D. Germán Larriba Calle
- D. Francisco I. Javier Pastor Blasco
- D^a. Margarita L. Orejas Suarez
- D^a. María Amelia Murgui Faubel

Va ser dirigida per:
D. Julio Polaina Molina

©Copyright: Servei de Publicacions
Lorena Latorre García

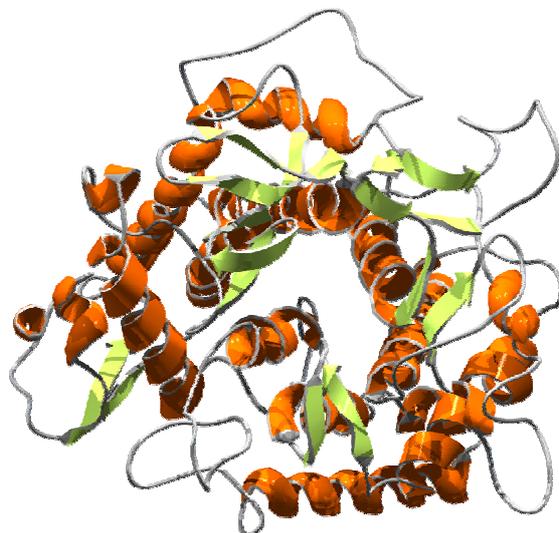
Depòsit legal:
I.S.B.N.: 978-84-370-7161-9
Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

VNIVERSITAT [Logo] VALÈNCIA Facultat de Farmàcia

Análisis Estructural y Modificación Funcional de la Glucoamilasa de *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*.



TESIS DOCTORAL
Lorena Latorre García
Valencia, diciembre de 2007



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

VNIVERSITAT (Q*)
D VALÈNCIA] Facultat de Farmàcia

Análisis Estructural y Modificación Funcional de la Glucoamilasa de *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*.

Trabajo realizado por la Lda. Lorena Latorre García en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universitat de València.

Lorena Latorre García
Valencia, diciembre de 2007



Julio Polaina Molina, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, hace constar que el presente trabajo titulado "Análisis Estructural y Modificación Funcional de la Glucoamilasa de *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*", ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del CSIC, Paterna (Valencia), por la Licenciada en Farmacia Lorena Latorre García, para optar al grado de Doctora en Farmacia por la Universitat de València.

Paterna (Valencia), diciembre de 2007.

Julio Polaina Molina

A mi madre y mi hermana, que siempre me apoyan.

A mi padre.

Agradecimientos

Durante la elaboración de esta tesis he contado con personas que me han apoyado mucho. Creo que sin ellas no lo hubiera conseguido. Aunque resulta imposible dar las gracias a todos citando su nombre, me gustaría mencionar unos pocos.

Al Dr. Julio Polaina, mi director de tesis, le agradezco todo lo que ha hecho por mí durante este tiempo.

Estoy profundamente agradecida a Anacris, Txiqui y Maela por toda su ayuda y colaboración. Las tres, cada una a su manera especial, me han ayudado cuando lo he necesitado y todavía ahora me asombro de la suerte que tuve al encontrarlas por el lab. 003. Fue una alegría trabajar con vosotras.

Me gustaría agradecer a Sergi Maicas y a M^a Carmen Verdeguer su ayuda y sus consejos durante el primer año de elaboración de este trabajo. También durante un año, pero esta vez el último, Álvaro me escuchó y intentó comprenderme, muchas gracias, siento que tuvieras que hacer equilibrios para llevar la situación, pero lo conseguiste.

También quiero agradecer al laboratorio de carnes y a Fidel Toldrá su "adopción" durante los almuerzos en los momentos en los que estuve sola en el laboratorio. Muchas gracias por tratarme siempre tan bien.

A Natalia y a Milagro, gracias por las risas y las charlas en vuestro laboratorio. Milagro muchas gracias por darme el consejo justo en el momento en que lo necesitaba, te agradezco todo.

Gracias a Leticia, Laurita, María y M^a Carmen por los buenos momentos que hemos pasado en el IATA pero sobre todo fuera de él. M^a Carmen gracias por ponerte en mi lugar y buscarme ese huequecito cuando lo necesito.

Gracias Isa, Raquel y María por acordaros de mí y compartir conmigo vuestros momentos de felicidad. Gracias Miguel por ayudarme a buscar otros caminos y acompañarme en el viaje, me alegro tanto que todo haya ido bien para los dos. Geno, no sé como expresar mi gratitud más absoluta y sincera sin que suene cursi, por suerte siempre me entiendes y sabes qué es lo que intento expresar.

Otras personas a las que agradezco todo su apoyo y su amistad, son Amaya, Raquel, Marta, Rocío y Juanjo. Espero que nuestra "citas" más o menos mensuales :-), se sigan manteniendo durante muchos años más.

También quiero dar las gracias a Lucas y Mariela que me acompañaron y apoyaron en lo que considero los momentos decisivos de este ciclo, el principio y el final de la tesis. Pero sobretodo gracias por facilitarme el proceso de conclusión.

Y hablando de ciclos, en este caso nuevos, quiero agradecer a Lorena, Germán, Toni y al resto de compañeros de almuerzo su comprensión y sus bromas durante los procesos de corrección, trámites y defensa de la tesis.

Finalmente, quiero expresar mi amor y mi gratitud a mi madre y mi hermana por creer siempre en mí y por haberme ayudado a superar los momentos difíciles. Y aunque ahora ya no está con nosotras a mi padre, que me acompaña siempre y que es mi guía cuando quiero ser absolutamente generosa.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación BIO2000-1279-CO2-01 y AGL2003-00209, concedidos por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, y por una beca de Formación de Personal Investigador asociada al primero de ellos.

"La vida debe ser una continua educación"

Gustave Flaubert.

Indice

ABREVIATURAS	12
<hr/>	
INTRODUCCIÓN	
<hr/>	
1. ALMIDÓN Y AMILASAS	15
1.1. Estructura química del almidón. Enzimas amilolíticas.	15
1.2. Importancia agronómica y biotecnológica del almidón. Procesado Industrial.	19
1.3. Organismos productores de amilasas	22
2. EL SISTEMA AMILOLÍTICO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	23
2.1. Genes <i>STA</i> .	23
2.2. Estructura y regulación de los genes <i>STA</i> .	24
2.3. Caracterización bioquímica de la glucoamilasa de <i>S. cerevisiae</i> .	25
3. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS GLUCOAMILASAS.	26
3.1. Clasificación estructural de las amilasas.	26
3.2. La familia 15 de glicósido hidrolasas.	30
3.3. Estructura tridimensional de las glucoamilasas.	32
OBJETIVOS	38
<hr/>	
MATERIALES Y MÉTODOS	
<hr/>	
1. ESTIRPES MICROBIANAS.	40
2. PREPARACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO.	44
2.1. Medios y condiciones de cultivo.	
2.1.1. Crecimiento de levaduras.	44
2.1.2. Crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> .	45
2.1.3. Crecimiento del hongo <i>A. niger</i> .	45
2.1.4. Crecimiento de levaduras portadoras de plásmidos episómicos.	45
2.1.5. Crecimiento de levaduras portadoras del gen <i>STA1</i> integrado en su genoma.	46
2.1.6. Crecimiento de levaduras transformadas con versiones mutantes del gen <i>STA1</i> .	47
2.2. Transformación de microorganismos.	

2.2.1. Transformación de la bacteria <i>E. coli</i> .	47
2.2.2. Transformación de levaduras.	47
2.3. Obtención de levaduras amilolíticas de diferente ploidía.	
2.3.1. Conjugación sexual.	48
2.3.2. Esporulación y disección de tétradas.	49
2.3.3. Análisis de las levaduras obtenidas por conjugación y esporulación.	49
2.3.4. Obtención de estirpes diploides homocigóticas para el tipo sexual.	50
3. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA.	50
3.1. Tratamientos enzimáticos de DNA.	50
3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	51
3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	52
3.4. Extracción de DNA a partir de geles de agarosa.	52
3.5. Obtención de DNA.	
3.5.1. Aislamiento de plásmidos a partir de <i>E. coli</i> .	52
3.5.2. Aislamiento de DNA genómico de levadura.	53
4. CONSTRUCCIONES DEL GEN <i>STA1</i> .	53
4.1. Proceso de construcción de plásmidos episómicos.	
4.1.1. Construcción de pS2 y pYS2.	57
4.1.2. Construcción de pKS2.	58
4.1.3. Construcción de pUCS2.	58
4.2. Construcción integrativa pSI2.	58
4.3. Construcción de una versión de <i>STA1</i> con una delección parcial, (pS2Δ).	59
4.4. Construcción de glucoamilasas híbridas de, (pSS2 y pSS4).	60
5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD GLUCOAMILASA.	63
5.1. Determinación semicuantitativa de actividad glucoamilasa.	63
5.2. Determinación cuantitativa de actividad glucoamilasa.	64
5.3. Definición de actividad glucoamilasa.	64
6. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA GLUCOAMILASA.	64
6.1. Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida.	64
6.2. Transferencia de proteínas a filtros de Nitrocelulosa.	65
6.3. Proceso de desglicosilación.	66
6.4. Ensayo de la capacidad de la glucoamilasa para unirse al almidón.	66
7. ANÁLISIS DE SECUENCIA Y MODELADO POR HOMOLOGÍA.	67
8. MUTAGÉNESIS.	68
8.1. Mutagénesis aleatoria.	68
8.1.1. Mutagénesis por <i>error prone-PCR</i> .	68
8.1.2. Mutagénesis por <i>DNA-Shuffling</i> .	69
8.2. Mutagénesis dirigida.	72

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DEL GEN <i>STA1</i> EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BAJO CONTROL DE UN PROMOTOR INDUCIBLE.	74
2. ESTUDIO DE LA REGIÓN AMINO TERMINAL DE LA SECUENCIA PRIMARIA DE LA GLUCOAMILASA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	77
3. CARACTERIZACIÓN DE LA GLUCOAMILASA DE <i>S. cerevisiae</i> (MASA MOLECULAR E HIPERGLICOSILACIÓN DEL ENZIMA).	83
4. MODELADO ESTRUCTURAL DE LA GLUCOAMILASA DE <i>S. cerevisiae</i> .	89
5. CONSTRUCCIÓN DE UNA GLUCOAMILASA HÍBRIDA PORTADORA DE UN DOMINIO DE UNIÓN A ALMIDÓN.	94
6. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD GLUCOAMILASA EN ESTIRPES DE <i>Saccharomyces</i> DE DISTINTO ORIGEN Y CONSTITUCIÓN GENÉTICA.	100
6.1. Estudio de la actividad glucoamilasa en estirpes industriales de <i>S. cerevisiae</i> .	101
6.2. Análisis de estirpes poliploides de <i>S. cerevisiae</i> portadoras del gen <i>STA1</i> en copia múltiple.	104
7. MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE LA GLUCOAMILASA DE <i>S. cerevisiae</i> PARA MEJORAR SU ACTIVIDAD CATALÍTICA.	108
7.1. Mutagénesis dirigida.	108
7.2. Mutagénesis aleatoria.	112

DISCUSIÓN

1. SOBREPDUCCIÓN DE GLUCOAMILASA ENDÓGENA EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	119
1.1. Expresión del gen <i>STA1</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> bajo control de un promotor regulable.	119
1.2. Estudio de la actividad glucoamilasa en estirpes industriales de <i>S. cerevisiae</i> .	120

1.3. Análisis de estirpes poliploides de <i>S. cerevisiae</i> portadoras del gen <i>STA1</i> en copia múltiple.	120
2. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA GLUCOAMILASA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	122
3. HIPERGLICOSILACIÓN.	124
4. CONSTRUCCIÓN DE UNA GLUCOAMILASA HÍBRIDA Y EXPRESIÓN EN <i>S. cerevisiae</i> .	127
5. MEJORA DE LAS PROPIEDADES ENZIMÁTICAS DE LA GLUCOAMILASA POR TÉCNICAS DE INGENIERÍA DE PROTEÍNAS	129
CONCLUSIONES	132
BIBLIOGRAFÍA	135

ABREVIATURAS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool. Programa que permite el alineamiento con secuencias homólogas publicadas.
CAZy	Carbohydrate Active Enzymes. Servidor especializado en el estudio de carbohidrasas.
CBMs	Carbohydrate-binding modules (Módulos de unión a carbohidratos).
CD	Catalytic domain (Dominio catalítico).
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo.
CI24	Estirpe de levadura seleccionada en la búsqueda de mutantes de GA.
CI24p	Glucoamilasa producida por la estirpe CI24 que presenta elevada actividad.
CYCGAL10p	Promotor híbrido formado por el fragmento del promotor de <i>CYC1</i> y el promotor del gen <i>GAL10</i> .
<i>FLO11</i>	Gen que codifica para una mucina esencial para el crecimiento pseudohifal. También denominado <i>MUC1</i> .
15GH	Familia 15 de glicósido hidrolasas que engloban a las glucoamilasas.
G418	Geneticina (Antibiótico).
GA/GAs	Glucoamilasa/Glucoamilasas.
<i>GAL10p</i>	Promotor del gen <i>GAL10</i> .
<i>GAL1p</i>	Promotor del gen <i>GAL1</i> .
<i>GAL4</i>	Gen que codifica para la proteína Gal4p.
Gal4p	Proteína inductora que actúa sobre el promotor del gen <i>GAL10</i> .
GH-L	Clan de glicósido hidrolasas que engloban a la familia 15GH.
<i>KANMX4</i>	Casete de expresión del gen <i>KAN</i> que aporta resistencia a G418.
LB	Medio de Luria-Bertani para el crecimiento de bacterias.
<i>Leu2d</i>	Alelo del gen <i>LEU2</i> (beta-isopropylmalato dehidrogenasa) con una amplia delección en la región promotora, que tiene una expresión reducida y que en condiciones de presión selectiva (carencia de leucina) incrementa el número de células portadoras de más de 100 copias del plásmido que lo contiene.
<i>MATa/MATα</i>	Mating type a o α . (Tipo sexual a o α).
<i>MUC1</i>	Gen que codifica para una mucina esencial para el crecimiento pseudohifal. También denominado <i>FLO11</i> .
NCYC	National Collection of Yeasts Cultures, Norwich, UK.
ORF	Open reading frame (Pauta de lectura abierta).
PDB	Protein Data Bank. Base de datos de proteínas de la web.

<i>RDN1</i>	Locus del genoma de levadura donde se encuentran repetidas las secuencias correspondientes al rDNA.
rDNA	DNA ribosómico
SBD	Starch binding domain. (Dominio de unión al almidón).
<i>SBD_STA1</i>	Gen <i>STA1</i> fusionado en fase con el fragmento de DNA que codifica el SBD de <i>A. niger</i> en el extremo 5´.
<i>SBD_Sta1p</i>	Proteína híbrida formada por una glucoamilasa y un SBD en su extremo amino terminal.
SD	Synthetic Dextrose. Medio mínimo para el crecimiento de levaduras.
<i>SGA1</i>	Gen que codifica para una Glucoamilasa específica de esporulación.
<i>STA1Δ</i>	Gen <i>STA1</i> al que se le ha deletado una región de su secuencia.
<i>STA1/2/3</i>	Genes de la levadura <i>S. cerevisiae</i> que codifican para glucoamilasas extracelulares.
<i>STA1_SBD</i>	Gen <i>STA1</i> fusionado en fase con el fragmento de DNA que codifica el SBD de <i>A. niger</i> en el extremo 3´.
<i>Sta1_SBDp</i>	Proteína híbrida formada por una glucoamilasa y un SBD en su extremo carboxi terminal.
<i>Sta1dp</i>	Proteína codificada por el gen <i>STA1Δ</i> . Glucoamilasa deletada.
<i>Sta1p</i>	Proteína codificada por el gen <i>STA1</i> . Glucoamilasa.
ufc	Unidades formadoras de colonias.
<i>URA3</i>	Gen que codifica para el enzima orotidina 5-fosfato decarboxilasa, enzima relacionado en la síntesis <i>de novo</i> de los ribonucleótidos pirimidínicos. Se utiliza como marcador de selección en las transformaciones de levadura en cepas <i>ura3</i> .
YPD	Medio rico de crecimiento de levaduras.

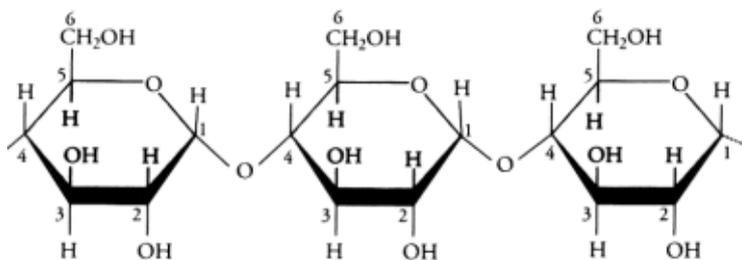
Introducción

1. ALMIDÓN Y AMILASAS.

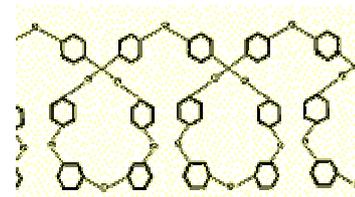
1.1 Estructura química del almidón. Enzimas amilolíticas.

El almidón es un polímero de elevado peso molecular formado por una sucesión de moléculas de α -D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 y que se ramifica en determinados puntos de la cadena mediante enlaces α -1,6. Estos enlaces dan origen a dos polímeros distintos, la amilosa y la amilopectina que a su vez forman los granos de almidón. Los granos de almidón están formados por amilosa en su parte interior y amilopectina en sus capas más externas. La amilosa es un polímero predominantemente lineal constituido por enlaces α -1,4 que adoptan una disposición helicoidal, mientras que la amilopectina es un polímero muy ramificado formado por un número mayor de unidades de glucosa.

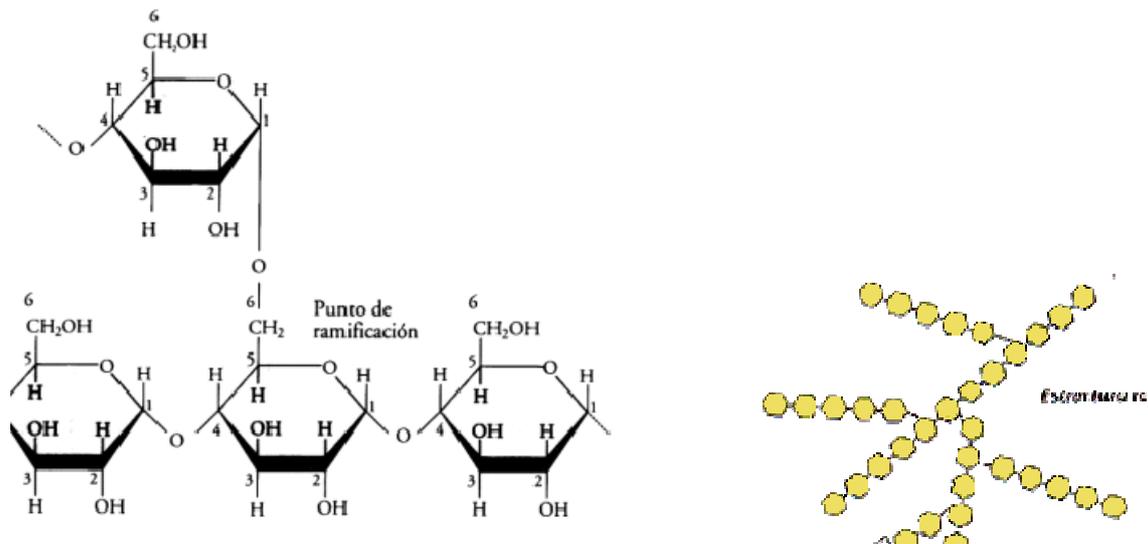
El almidón es el principal polisacárido de reserva de los vegetales, se encuentra, principalmente, en semillas, frutos, legumbres, tubérculos y cereales (figura 1). El almidón se sintetiza a partir de la glucosa generada en los procesos de fotosíntesis y se almacena en los amiloplastos. El contenido relativo de amilosa y amilopectina, así como las características de los granos, varía según la fuente del almidón.



AMILOSA. Polímero lineal de α -D-glucosa unido por enlaces α -1,4.



Adopta una disposición helicoidal.



AMILOPECTINA. Polímero muy ramificado de α -D-glucosa.

Las ramificaciones se originan por la formación de enlaces α -(1,6).



Fuentes naturales de almidón.

Figura 1. Estructura química de las moléculas que forman el almidón (amilosa y amilopectina) y ejemplos de fuentes naturales de almidón.

En la naturaleza existe una amplia variedad de enzimas responsables de la hidrólisis del almidón son los denominados enzimas amilolíticos o amilasas. Su acción da lugar a oligosacáridos, maltosa y finalmente glucosa (Machovic y Janecek, 2007).

Los enzimas amilolíticos pueden clasificarse de diversas formas, por ejemplo, según el tipo de sustrato y el producto que originan se dividen en α -amilasas, β -amilasas, glucoamilasas, pululanasas, isoamilasas, α -glucosidasas y ciclodextringlicosiltransferasas.

Desde un punto de vista funcional se pueden agrupar en 4 grupos básicos: endoamilasas, exoamilasas, enzimas desramificantes y transferasas. Las endoamilasas degradan los enlaces glicosídicos α -1,4

que se encuentran en el interior de la molécula de amilosa y amilopectina, en este grupo destacan las α -amilasas que degradan el almidón de forma aleatoria generando oligosacáridos de longitud variable. Las exoamilasas hidrolizan enlaces α -1,4 desde el extremo no reductor de la molécula, generando productos de bajo peso molecular, en este grupo se incluyen las β -amilasas que generan disacáridos de glucosa (maltosa), las α -glucosidasas y las glucoamilasas que generan residuos de glucosa. Los enzimas desramificantes, que engloban a pululanastas e isoamilasas, son enzimas que hidrolizan exclusivamente los enlaces α -1,6. Las pululanastas, degradan los enlaces α -1,6 de glucógeno, amilopectina y pululano (polisacárido extracelular producido por *Aureobasidium pullulans*) (Okada et al., 1988). Las isoamilasas degradan completamente el glucógeno y se distinguen de las pululanastas en que no tienen capacidad para degradar el pululano. Por último, las ciclodextringlicosiltransferasas degradan enlaces α -1,4 y son capaces de formar nuevos enlaces glicosídicos generando ciclodextrinas. (Ueda et al., 1988; Van der Maarel et al., 2002).

En 1991, Bernard Henrissat propuso una clasificación de los enzimas glicósido hidrolasas. Estos enzimas son los responsables de hidrolizar los enlaces glicosídicos en carbohidratos. La clasificación se basa en la similitud de las secuencias proteicas de las glicósido hidrolasas y agrupa los enzimas dentro de distintas familias. Cada familia refleja las características estructurales y la relación evolutiva del conjunto de enzimas que agrupa. A su vez, las familias se asocian en grupos denominados clanes. Cada clan intenta agrupar a las familias de enzimas que poseen un origen común, que presentan similitudes significativas en su estructura terciaria y que conservan residuos y mecanismos catalíticos (Henrissat, 1991; Henrissat y Bairoch, 1993 y 1996; Davies y Henrissat, 1995; Henrissat y Davies, 1997; Coutinho y Henrissat, 1999.)

Según Henrissat, los enzimas amilolíticos se distribuyen en tres familias: familias 13, 14 y 15 (Tabla 1). La familia 13, que se engloba en

el clan GH-H, incluye la mayoría de enzimas amilolíticas (α -amilasas, α -glucosidasas, pululanasa, isoamilasas y ciclodextrinoglucosiltransferasas). La familia 14 contiene a las β -amilasas y no se engloba en ningún clan. Finalmente, la familia 15, que pertenece al clan GH-L, incluye a las glucoamilasas.

FAMILIA (Clan)	ENZIMA	ACTIVIDAD	PRODUCTOS
13 (GH-H)	α -AMILASA	Endoamilasa. Degrada, aleatoriamente, enlaces α -1,4 en el interior de las moléculas de almidón.	Oligosacáridos de longitud variable.
	α -GLUCOSIDASA	Exoamilasa. Degrada enlaces α -1,4 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón.	Residuos de glucosa, con α -configuración.
	PULULANASA	Enzima desramificante. Degrada, exclusivamente, enlaces α -1,6 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón, pululano y glucógeno.	Oligosacáridos de longitud variable.
	ISOAMILASA	Enzima desramificante. Degrada, exclusivamente, enlaces α -1,6 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón y glucógeno	Oligosacáridos de longitud variable.
	CICLODEXTRIN GLICOSIL-TRANSFERASA	Transferasa. Degrada enlaces α -1,4 en las moléculas de almidón. Posee la capacidad de formar nuevos enlaces glicosídicos.	Ciclodextrinas.
14	β -AMILASA	Exoamilasa. Degrada enlaces α -1,4 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón.	Disacáridos de glucosa (maltosa).
15 (GH-L)	GLUCOAMILASA	Exoamilasa. Degrada enlaces α -1,4 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón	Residuos de glucosa, con β -configuración.

Tabla 1. Esquema de los principales enzimas amilolíticos clasificados funcionalmente y según Henrissat (1991). Se señala la actividad catalítica que poseen y los productos que generan.

1.2 Importancia agronómica y biotecnológica del almidón.

Procesado Industrial.

El almidón es uno de los polisacáridos más abundantes que existen en la naturaleza. Es una fuente de energía ubicua y fácilmente accesible ya que las principales fuentes de almidón son los granos de cereales, legumbres y tubérculos.

Los usos comerciales y tecnológicos del almidón son diversos y numerosos. Una gran proporción del almidón se destina para fines alimentarios. El almidón se adiciona a refrescos, salsas, helados, alimentos precocinados o infantiles, etc., para utilizarlo como estabilizador de emulsiones, agente gelificante o sustituto de grasas. En general, el almidón mejora las propiedades de los alimentos, modificando su estructura y consistencia además de ser fuente de numerosos oligo-, di- y monosacáridos (Synowiecki, 2007).

Además de su aplicación en la industria alimentaria, se utiliza almidón modificado en la industria textil, de destilación, papelera, cosmética y farmacéutica (Pandey et al., 2000; Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1995).

En la actualidad, una de las aplicaciones en la que se están centrando numerosas investigaciones es la producción de bioetanol a partir del almidón. El bioetanol tiene una importancia creciente como alternativa de los combustibles fósiles (Lin y Tanaka, 2006. Gray et al., 2006). Aunque la mayor parte del etanol que se genera actualmente procede del petróleo, cada día aumenta la producción de etanol de origen biológico a partir de la fermentación anaeróbica de residuos agroindustriales. La utilización de estos residuos reduciría los costes de producción y resultaría beneficioso para el medio ambiente (Pandey et al., 2000).

En la mayoría de las aplicaciones, el almidón debe ser hidrolizado a glucosa, maltosa o maltodextrinas. Tradicionalmente, el almidón era procesado mediante hidrólisis ácida, pero este método presentaba

numerosas desventajas (problemas de corrosión de los equipos, formación de numerosos subproductos por ser una hidrólisis no específica, procesos de purificación más complejos, etc.) que provocaban aumentos en los costes de elaboración. En la actualidad, debido al desarrollo biotecnológico, el procesado industrial del almidón a gran escala se basa totalmente en la utilización de enzimas (Van der Maarel et al., 2002, Crabb y Shetty, 1999).

En el procesado del almidón se distinguen dos etapas fundamentales, la licuefacción y la sacarificación (Figura 2).

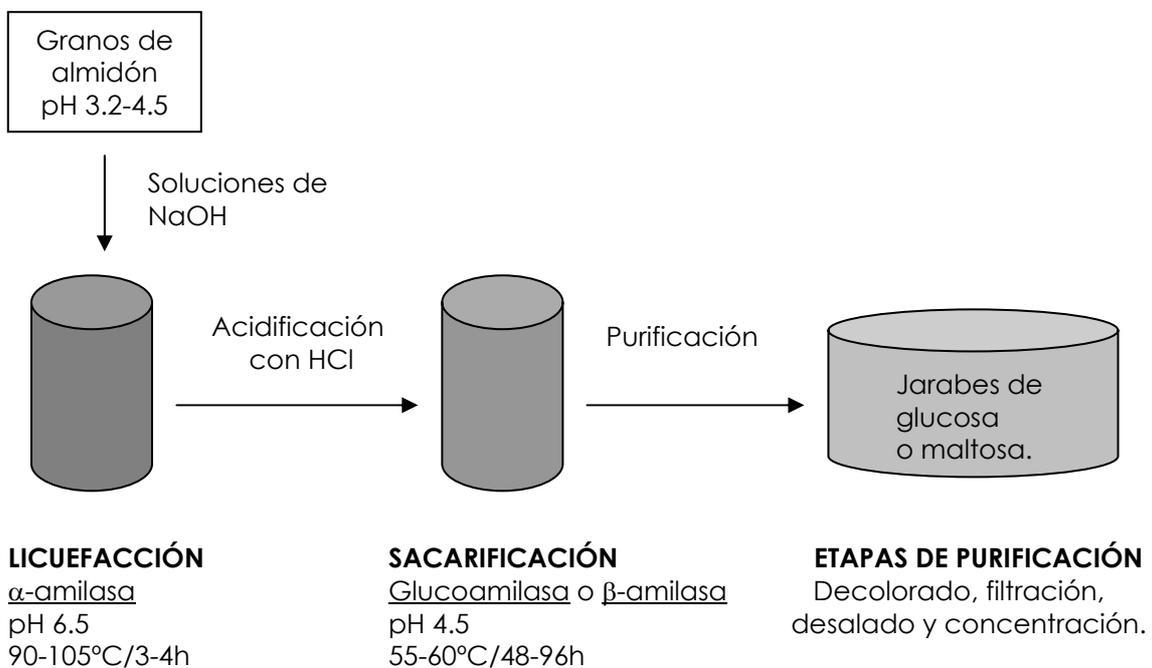


Figura 2. Representación esquemática del procesado industrial del almidón para obtener jarabes de glucosa o maltosa, (Synowiecki, 2007; Crabb y Mitchinson, 1997). Se especifican las condiciones (pH, temperatura y tiempo) y los enzimas utilizados en cada etapa.

En la licuefacción se transforman los granos de almidón parcialmente insolubles en una solución soluble de dextrinas mediante la utilización de α -amilasas y elevadas temperaturas. En la sacarificación se obtienen azúcares de bajo peso molecular (glucosa, maltosa o mezclas) a partir de los oligosacáridos o dextrinas. En este paso se utilizan principalmente glucoamilasas termosensibles, por lo que

se deben modificar el pH y la temperatura de los reactores industriales. También se adicionan otros enzimas amilolíticos como β -amilasas o pululaninas que terminan de hidrolizar los polisacáridos generados durante la degradación del almidón. Como se observa, las condiciones de trabajo están limitadas por las propiedades de cada enzima (α -amilasas y glucoamilasas) ya que actúan en condiciones de pH y temperaturas diferentes. Estas limitaciones incrementan los costes, disminuyen la eficiencia del proceso y la calidad de los productos. La eficacia de estos procesos mejoraría con el uso de glucoamilasas termoestables ya que el proceso de hidrólisis se realizaría en un solo paso (Synowiecki et al., 2006).

El objetivo del procesado del almidón para fines alimentarios es obtener jarabes de glucosa, maltosa o elevada concentración de fructosa por lo que las etapas posteriores de purificación incluyen la eliminación de las proteínas, las grasas y el color mediante filtración o purificación con carbón activado y la isomerización de la glucosa a fructosa (Crabb y Mitchinson, 1997; Synowiecki, 2007).

Para la producción de bioetanol tras la hidrólisis para liberar los azúcares de la materia vegetal es necesario realizar una etapa de fermentación que es efectuada por las levaduras.

Numerosas publicaciones describen la obtención de levaduras genéticamente modificadas para la producción de bioetanol a partir de desechos agrícolas (Ma et al., 2000; Marin et al., 2001; Eksteen et al., 2003; Shigechi et al., 2004; Filho et al., 2005; Xu et al., 2005; Seong et al., 2006). El almidón y los residuos agrícolas son recursos renovables de gran interés por razones de sostenibilidad y los procesos de biotransformación, utilizando las levaduras modificadas, son menos contaminantes que los procesos químicos de obtención de etanol.

1.3 Organismos productores de amilasas.

Las amilasas son producidas por un gran número de microorganismos, plantas y animales aunque su comercialización resulta complicada ya que la mayoría las producen en baja proporción (Pandey et al., 2000).

Las α -amilasas son producidas por varias bacterias, levaduras y hongos. Las bacterias del género *Bacillus* se consideran la fuente más importante de α -amilasas. Entre los hongos, los microorganismos del género *Aspergillus* son los principales productores de α -amilasas con aplicación industrial.

Las β -amilasas se obtienen generalmente de plantas. Los estudios basados en la producción microbiana de β -amilasa no son muy abundantes ya que únicamente un número reducido de microorganismos es capaz de producir este enzima. Destacan como productores de β -amilasa las bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Clostridium* sp. (Pandey et al., 2000).

Las glucoamilasas son producidas por numerosos tipos de hongos y algunas bacterias. La principal fuente de glucoamilasas son los hongos filamentosos donde destaca el género *Aspergillus*, y en concreto, *A. niger* y *A. awamory* (Ford, 1999). Algunos cultivos de bacterias y levaduras también se han utilizado como fuente de glucoamilasas, destacando las bacterias *Bacillus coagulans* y *Lactobacillus brevis* y las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomycopsis fibuligera* (Pretorius y Lambrechts, 1991; Pandey et al., 2000).

Los enzimas desramificantes (isoamilasas y pululanastas) son producidas por una amplia variedad de especies. Las isoamilasas se encuentran en bacterias, levaduras y plantas mientras que las pululanastas, generalmente, son producidas por plantas superiores y por microorganismos mesófilos tales como *Klebsiella*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Streptomyces* (Doman-Pytka y Bardowski, 2004).

En general, los microorganismos son los principales productores de enzimas amilolíticas con aplicación industrial. En concreto las bacterias del género *Bacillus* producen las α -amilasas de interés comercial mientras que el hongo *Aspergillus niger* es el productor de las glucoamilasas que se utilizan en la degradación del almidón. En la actualidad, la demanda de amilasas termoestables está aumentando debido a que la realización de los procesos de hidrólisis a elevadas temperaturas minimiza el riesgo de contaminación microbiológica y reduce el tiempo de reacción (Pandey et al., 2000; Bertoldo y Antranikian, 2002).

Como se ha comentado, generalmente los microorganismos producen las amilasas en baja proporción lo que dificulta su producción para aplicaciones industriales posteriores. Para mejorar los bajos niveles de producción del enzima por parte del productor natural se están llevando a cabo diversas aproximaciones biotecnológicas. Entre ellas destaca la clonación de los genes productores de amilasa y su expresión en hospedadores heterólogos. Por otro lado, la obtención de cepas superproductoras de enzimas amilolíticos endógenos más eficaces es una posible vía alternativa que mejoraría las aplicaciones biotecnológicas de estos enzimas.

2. EL SISTEMA AMIOLÍTICO DE *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1 Genes STA.

Saccharomyces cerevisiae var. *diastaticus*, anteriormente considerada como una especie distinta (*S. diastaticus*), es capaz de hidrolizar almidón porque secreta un enzima denominado glucoamilasa (GA). En esta estirpe existen tres genes distintos, no ligados, designados *STA1*, *STA2* y *STA3*, que codifican formas idénticas de glucoamilasa denominadas *GAI*, *GAI1* y *GAI11* (Tamaki, 1978). Los genes repetidos *STA*

constituyen un sistema genético muy similar a otros sistemas de *S. cerevisiae* relacionados con la hidrólisis de sacarosa, maltosa y melibiosa (Carlson y Botstein, 1983; Charron et al., 1989; Naumov et al., 1990).

Además de la glucoamilasa codificada por los genes *STA*, existe otra forma de este enzima, codificada por el gen *SGA1* (Sporulation-specific glucoamylase), que se produce durante los procesos de meiosis y esporulación. Este enzima, que se encuentra en todas las estirpes de *S. cerevisiae* y no sólo en la var. *diastaticus*, es responsable de la degradación del glucógeno intracelular (Colonna y Magee, 1978; Yamashita y Fukui, 1985). El gen *SGA1* tiene elevada homología con los genes *STA* únicamente en la región 3´.

La zona 5´ de los genes *STA* presenta el péptido señal necesario para la secreción (Pretorius y Lambrechts, 1991) y una región caracterizada por ser rica en residuos de serina y treonina. Esta región presenta elevada homología con otro gen de levadura, denominado *MUC1/FLO11* (Figura 3).

2.2 Estructura y regulación de los genes *STA*.

El análisis de la secuencia de *STA1* mostró una única pauta abierta de lectura (ORF) de 2454 nucleótidos que codifica una proteína de 818 aminoácidos. La secuencia reveló la existencia de dos codones de iniciación en la misma pauta, separados por 30 nucleótidos (Yamashita et al., 1985b). Estudios de los transcritos de *STA2* demostraron que los dos codones de inicio de la traducción son funcionales y producen glucoamilasas con un extremo amino terminal distinto (Vivier et al., 1999).

El gen *STA2* (como modelo representativo de la familia multigénica *STA1-3*) tiene un sistema de regulación complejo con numerosos reguladores positivos y negativos. Se caracteriza por poseer un promotor largo, virtualmente igual al del gen *MUC1* (también

denominado *FLO11*), con varias regiones reguladoras. *MUC1/FLO11* es un gen que codifica una mucina esencial para el crecimiento pseudohifal e invasivo. La regulación conjunta de los genes *STA* y *MUC1/FLO11* hace que exista, en algunos casos, un control integrado entre los nutrientes del medio (presencia o no de azúcares fermentables) y el desarrollo diferencial de la levadura (crecimiento pseudohifal e invasivo) (Vivier et al., 1997).

Desde un punto de vista evolutivo, la estructura propia de los genes *STA* sugiere que éstos se generaron por la fusión de dos fragmentos de DNA preexistentes en todas las estirpes de *S. cerevisiae*. Uno de los fragmentos contendría la zona del promotor y la región 5' de los genes *STA* que presenta homología con el gen *MUC1/FLO11* mientras que el otro fragmento provendría del gen *SGA1* (Yamashita et al., 1985a; Yamashita et al., 1987), (Figura 3).

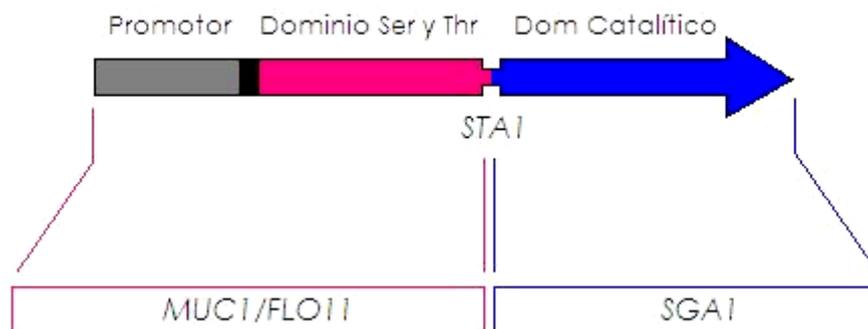


Figura 3. Representación esquemática que muestra las zonas donde el gen *STA1* presenta homología con los genes *SGA1* y *MUC1/FLO11*. Los genes *STA* pudieron originarse por fusión de ambos fragmentos de DNA (Yamashita et al., 1987).

2.3 Caracterización bioquímica de la glucoamilasa de *S. cerevisiae*.

Las glucoamilasas son exoglucosidasas que actúan, a partir del extremo no reductor de la molécula de almidón, liberando residuos sucesivos de glucosa. Degradan principalmente enlaces glicosídicos α -1,4 y como el resto de glucoamilasas de origen fúngico también tiene cierta capacidad para hidrolizar enlaces α -1,6. La glucoamilasa de *S.*

cerevisiae tiene una actividad muy limitada frente a almidón insoluble comparada con la actividad de la glucoamilasa del hongo *Aspergillus niger* que es la utilizada a nivel industrial. Además la GA de *S. cerevisiae* posee escasa capacidad desramificante (White y White, 1997).

Diversos grupos han aislado y estudiado glucoamilasas de *Saccharomyces*, aportando datos heterogéneos y a veces contradictorios en cuanto a su tamaño, existencia de subunidades, pH y temperatura óptimos de actividad. El pH óptimo del enzima oscila, según la fuente, entre 4.5-6.5 y su temperatura óptima oscila entre 50 y 60° C. Existen discrepancias acerca del tamaño y estructura del enzima entre los estudios publicados. El número de subunidades y el peso molecular indicado varían desde un tetrámero con masa alrededor de 250 kDa (Kleinman et al., 1988), dos subunidades no idénticas, denominadas H e Y, de aproximadamente 80 y 66 kDa (Yamashita et al., 1985c) hasta una forma monomérica con tamaño de 250-300 kDa (Modena et al., 1986).

Una de las propiedades más característica del enzima de *S. cerevisiae* es su elevada glicosilación. Según Pretorius y Lambrechts, (1991) la variación en los patrones de hiperglicosilación y la producción del enzima en estirpes diferentes influyen en el peso molecular obtenido para los isoenzimas y en cierta medida podría explicar las diferencias obtenidas por los distintos laboratorios.

3. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS GLUCOAMILASAS.

3.1 Clasificación estructural de las amilasas.

Existen diversos sistemas de clasificación para los enzimas.

El criterio utilizado por la IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) se basa fundamentalmente en la especificidad de sustrato. A cada enzima se le asigna un código que comienza por

las letras EC (*Enzyme Commission*) seguido de una numeración de cuatro dígitos que especifica su actividad enzimática. Así por ejemplo, todas las glicósido hidrolasas (carbohidrasas) se clasifican con el código EC 3.2.1.X, donde X especifica la actividad concreta del enzima (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Dentro de los enzimas amilolíticos, las α -amilasas tienen el código EC 3.2.1.1, las β -amilasas el EC 3.2.1.2 y las glucoamilasas el EC 3.2.1.3. Esta clasificación no refleja las características estructurales de los enzimas.

En 1991, B. Henrissat propuso una clasificación de los enzimas implicados en la transformación de carbohidratos (*carbohydrate-active enzymes*) basada en la homología estructural que presentan, homología que a su vez es reflejo de la relación filogenética (Johnson et al., 1990; Horvathova et al., 2001; Tkaczuk et al., 2007). De manera que aquellos enzimas que muestran homología significativa en su secuencia de aminoácidos se agrupan en una misma familia. La homología de secuencia (estructura primaria) implica similitud a niveles estructurales superiores. Las familias se agrupan a su vez, en clanes o grupos de familias si poseen un ancestro común y si conservan similitudes significativas en su estructura terciaria y en su mecanismo catalítico. Esta clasificación, que se encuentra en el servidor denominado CAZy (por **C**arbohydrate **A**ctive **E**nzymes), disponible en Internet (<http://www.cazy.org/>), se ha convertido en una fuente de información fundamental para el trabajo con carbohidrasas y otros enzimas que actúan en el metabolismo de azúcares.

Los tres tipos fundamentales de amilasas, α -amilasas, β -amilasas y glucoamilasas, constituyen tres familias bien diferenciadas (familias 13, 14 y 15, respectivamente), dentro de las casi 100 familias de glicósido hidrolasas que aparecen definidas en el servidor CAZy (Machovic y Janecek, 2007).

La familia 13 es una de las más grandes dentro de la clasificación de glicósido hidrolasas. Engloba junto a un gran número de α -amilasas, un grupo heterogéneo de enzimas que presentan distintas actividades y

especificidades de sustrato. Incluye enzimas de los tres dominios arquea, bacteria y eucariota, así como numerosas secuencias todavía sin clasificar. Desde hace relativamente poco tiempo, las secuencias de la familia 13, se han reagrupado en 35 subfamilias para reflejar mejor la relación entre secuencia y especificidad enzimática (Stam et al., 2006). En esta familia existen muchos enzimas con estructura tridimensional resuelta.

La familia 14 agrupa enzimas con actividad β -amilasa. No es una familia muy numerosa en cuanto a secuencias descritas, hasta la fecha se han descrito 7 secuencias en bacterias y 120 en eucariotas. Entre las primeras, destacan las β -amilasas de *Bacillus cereus* por ser uno de los pocos microorganismos productores de este enzima. En eucariotas destacan las de *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare* e *Ipomoea batatas*.

La familia 15 engloba a todas las enzimas con actividad glucoamilasa y actividad glucodextranasa.

Los principales organismos productores de amilasas se encuentran recogidos en la tabla 2.

FAMILIA 13	ACTIVIDAD	α -AMILASA α -GLUCOSIDASA PULULANASA CICLODEXTRINGLICOSIL-TRANSFERASA		
ORGANISMOS PRODUCTORES	ARQUEAS	BACTERIAS	EUCARIOTAS	
	<i>Desulfurococcus mucosus</i> <i>Haloarcula marismortui</i> <i>Natronococcus amylolyticus</i> <i>Pyrococcus furiosus</i> " <i>woesei</i> (1MWO) <i>Sulfolobus solfataricus</i> (1EH9) <i>Thermococcus kodakaraensis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> " <i>circulans</i> (1CDG/1CGT) " <i>licheniformis</i> (1BLI) " <i>subtilis</i> (1UD2) <i>Bifidobacterium adolescentis</i> (1R7A) <i>Bordetella pertussis</i> <i>Chlamydomypha pneumoniae</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> (1M7X) <i>Flavobacterium sp</i>	<i>Aedes aegypti</i> <i>Anguilla japonica</i> <i>Anopheles gambiae</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Aspergillus awamori</i> " <i>nidulans</i> " <i>niger</i> (2GUY) " <i>oryzae</i> (2TAA) <i>Avena fatua</i> <i>Crassorea gigas</i> <i>Candida albicans</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Debaryomyces occidentalis</i> <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Homo sapiens</i> (1C8Q/ 1B2Y)	

FAMILIA 13	ACTIVIDAD	α -AMILASA α -GLUCOSIDASA PULULANASA CICLODEXTRINGLICOSIL-TRANSFERASA
-------------------	-----------	--

ORGANISMOS
PRODUCTORES**ARQUEAS****BACTERIAS**

Geobacillus stearothermophilus
(1QHO/ 1JOH/ 1HVW)
Geobacter sulfurreducens
Haemophilus influenzae
Klebsiella pneumoniae
Lactobacillus acidophilus
Lactococcus lactis
Listeria monocytogenes
Mycobacterium tuberculosis
Mycoplasma pulmonis
Neisseria polysaccharae (1G5A)
Paenibacillus polymyxa
Pseudoalteromonas haloplanktis
Pseudomonas putida
“ *saccharophila*
“ *syringae*
Salmonella enterica
“ *typhimurium*
Staphylococcus aureus
Streptococcus bovis
“ *mutans*
“ *pneumoniae*
Streptomyces lividans
Thermoactinomyces vulgaris
(1J11/ 1BVZ)
Thermoanaerobacter
thermohydrosulfuricus
Thermotoga maritima (1IWH)
Thermus thermophilus
Vibrio cholerae
Shigella dysenteriae

EUCARIOTAS

Hordeum vulgare
(1HT6/ 1AMY)
Kluyveromyces fragilis
Lypomyces spencermartinsiae
Mus musculus
Oryza sativa
Saccharomyces cerevisiae
Saccharomycopsis
fibuligera(1AYX)
Schizosaccharomyces pombe
Solanum tuberosum
Vigna radiata
Yarrowia lipolytica

FAMILIA 14

ACTIVIDAD

 β -AMILASAORGANISMOS
PRODUCTORES**BACTERIAS**

Bacillus cereus (1B9O)
Clostridium thermosulfurogenes
Paenibacillus polymyxa

EUCARIOTAS

Arabidopsis thaliana
Castanea crenata
Glycine max (1BFN)
Hordeum vulgare (1B1Y)
Ipomoea batatas (1FA2)
Oryza sativa
Solanum tuberosum
Triticum aestivum
Vigna unguiculata
Zea mays

FAMILIA 15	ACTIVIDAD	GLUCOAMILASA GLUCODEXTRANASA	
ORGANISMOS PRODUCTORES	ARQUEAS	BACTERIAS	EUCARIOTAS
	<i>Methanococcus jannaschii</i> <i>Sulfolobus solfataricus</i>	<i>Arthrobacter globiformis</i> (1UG9) <i>Clostridium thermoamylolyticum</i> <i>Streptomyces hygrosopicus</i> <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> (Crist) <i>Thermoanaerobacterium</i> <i>thermosaccharolyticum</i> (1LF6) <i>Xantomononas oryzae</i>	<i>Arxula adeninivorans</i> <i>Aspergillus awamori</i> (1AGM) " <i>niger</i> " <i>oryzae</i> <i>Athelia rolfsii</i> <i>Fusarium venenatum</i> <i>Hormoconis resiniae</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> (1AYX) <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Talaromyces emersonii</i> <i>Thermoascus crustaceus</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>

Tabla 2. Organismos productores de enzimas amilolíticas pertenecientes a las familias 13, 14 y 15, según la clasificación de Henrissat, 1991. Los códigos entre paréntesis, por ejemplo (1AGM), indican la clave de acceso al *Protein Data Bank* (PDB).

3.2 La familia 15 de glicósido hidrolasas.

Las glucoamilasas con relevancia biotecnológica son, en general, enzimas de origen fúngico, aunque bacterias y arqueas también producen este enzima. Junto con otros enzimas relacionados (glucodextranasas) se clasifican en la familia 15 de glicósido hidrolasas (familia 15GH). Esta familia constituye junto a la familia 65GH el clan denominado GH-L.

Entre las arqueas, se han caracterizado glucoamilasas pertenecientes a organismos termorresistentes como *Sulfolobus solfataricus* (Kim et al., 2004) y *Methanococcus jannaschii* (Uotsu-Tomita et al., 2001). Entre las glucomilasas de bacterias destacan las de *Clostridium thermosaccharolyticum* (Specka et al., 1991), *Thermoactinomyces vulgaris* (Uotsu-Tomita et al., 2001) y *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* cuya estructura tridimensional ha sido resuelta (Ducki et al., 1998). Dentro de eucariotas el grupo de glucoamilasas fúngicas es uno de los más numerosos,

destacan especialmente las glucoamilasas del género *Aspergillus* por su interés industrial (Bhella y Altosaar, 1987; Wallis et al., 1999; Paldi et al., 2003; Nakamura et al., 2006) y la GA de la levadura *Saccharomycopsis fibuligera* que se ha expresado en bacteria (Solovicova et al., 1996) y está resuelta tridimensionalmente (Sevcik et al., 1998).

La hidrólisis del enlace glicosídico llevada a cabo por carbohidrasas de distinto tipo, tiene lugar mediante una catálisis ácida que requiere de la actuación de dos residuos aminoacídicos localizados en el centro activo de la enzima, en la mayor parte de los casos aspártico o glutámico. Uno de ellos actúa como donador de un protón y el otro como nucleófilo/base. Esta hidrólisis puede ocurrir a través de dos mecanismos diferentes que dan como resultado la retención o la inversión de la configuración del carbono anomérico (Zechel y Withers, 2000; Rye y Withers, 2000). La disposición espacial y distancia entre los residuos catalíticos es diferente según sea el mecanismo de hidrólisis del enlace (Figura 4).

Los enzimas de la familia 15GH actúan mediante el mecanismo de inversión de configuración del carbono anomérico y presentan dos ácidos glutámicos como residuos catalíticos.

Existe, en eucariotas, un tipo distinto de glucoamilasas que se agrupan en la familia 31GH que pertenece al clan GH-D. Esta familia incluye la glucoamilasa intestinal humana (Naim et al., 1991; Nichols et al., 1998; Nichols et al., 2003). Las glucoamilasas de la familia 31GH se caracterizan porque actúan con un mecanismo de retención de configuración del carbono anomérico.

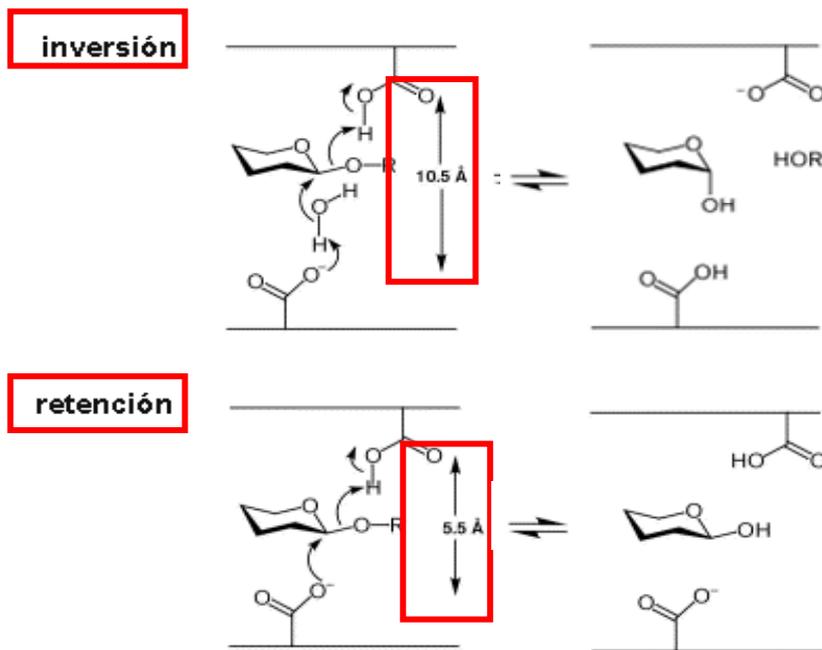
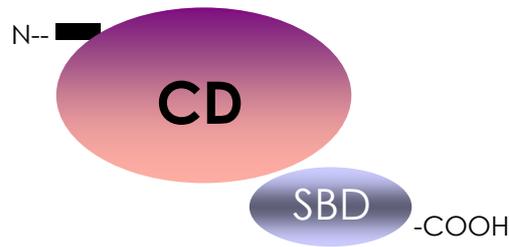


Figura 4. Mecanismos de hidrólisis del enlace glicosídico. La distancia y disposición de los residuos catalíticos difiere según sea el mecanismo de inversión o retención (Adaptación de Rye y Withers, 2000).

3.3 Estructura tridimensional de glucoamilasas.

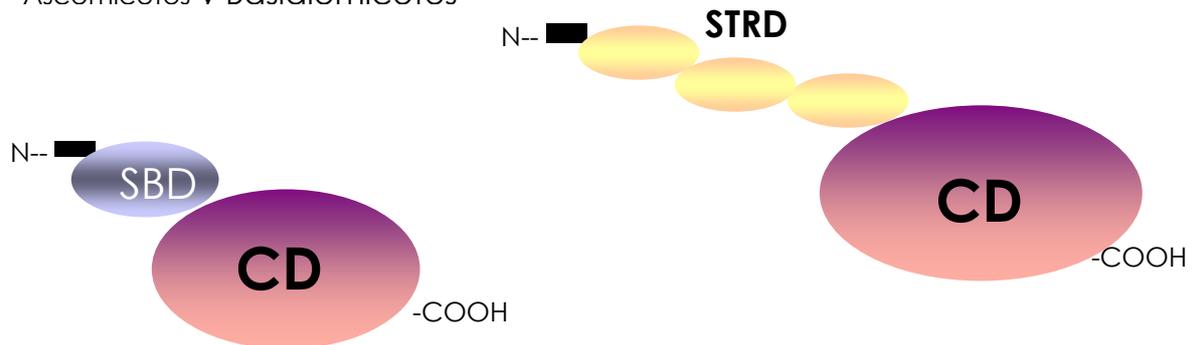
La mayoría de glucoamilasas son enzimas multidominio, constituidas por un dominio catalítico (CD, **catalytic domain**) conectado mediante una región glicosilada de longitud variable, a un dominio de unión al almidón (SBD, **starch binding domain**). Las GAs de ascomicetos y basidiomicetos tienen generalmente el CD localizado en el extremo amino de la proteína y el SBD en el extremo carboxilo (Coutinho y Reilly, 1997); sin embargo, en algunos casos estos dos dominios se disponen en orden inverso, como en el ascomiceto *Arxula adenivorans* (Bui et al., 1996) y en dos zygomycetes, *Rhizopus oryzae* (Ashikari et al., 1986) y *Mucor circinelloides* (Houghton-Larsen y Pedersen, 2003). La glucoamilasa de *S. cerevisiae* se caracteriza por poseer un dominio rico en serina y treonina en lugar de un dominio de unión al almidón en su región amino terminal (Figura 5).

Glucoamilasas fúngicas



Glucoamilasa de *S.cerevisiae*

Ascomicetos v Basidiomicetos



Arxula adenivorans,
Rhizopus oryzae y
Mucor circinelloides

Figura 5. Representación de la posición relativa que ocupan los dominios que forman las glucoamilasas fúngicas y la glucoamilasa de *S. cerevisiae*. Donde CD se refiere al dominio catalítico; SBD es el dominio de unión al almidón y STRD es el dominio rico en serina y treonina. -COOH y -N representan a los extremos carboxi y amino terminal de la proteína, respectivamente. Y el péptido señal se representa por un cuadrado negro.

La información estructural de las proteínas se obtiene fundamentalmente por cristalografía de Rayos X y, en determinados casos, por resonancia magnética nuclear. En la familia 15GH se conoce la estructura tridimensional de cinco enzimas. De ellas, dos son GAs fúngicas (*Aspergillus awamori* y *Saccharomycopsis fibuligera*) y tres bacterianas (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Arthrobacter globiformis* y *Thermoactinomyces vulgaris*) (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/fam/GH15.html>).

La información aportada por las estructuras resueltas indica que la mayoría de los dominios catalíticos de glucoamilasas presentan una arquitectura similar que comprende como mínimo doce hélices alfa,

que se presentan apareadas dos a dos formando un barril $(\alpha/\alpha)_6$. La GA de *Saccharomycopsis fibuligera* contiene catorce hélices, doce de las cuales constituyen el motivo $(\alpha/\alpha)_6$, idéntico en su organización al de *A. awamori* y *A. niger* (Coutinho y Reilly, 1997). Existen en el dominio catalítico regiones muy conservadas de la secuencia que comprenden los bucles o *loops* que rodean al centro activo (Coutinho y Reilly, 1994a). Estos *loops*, que carecen de estructura secundaria definida, se han relacionado, por sus diferencias en longitud y composición, con la estabilidad y especificidad de sustrato que presentan las diversas GAs (Coutinho y Reilly, 1997).

Las características estructurales de las proteínas no resueltas tridimensionalmente se estudian en base a los alineamientos tanto de estructura primaria como secundaria. Los alineamientos de las diferentes glucoamilasas existentes muestran una homología clara entre las glucoamilasas de *Aspergillus* sp, y cierta relación entre las GAs de *Rhizopus* y *Arxula*. Las GAs de *Methanococcus* y *Clostridium* son significativamente distintas al resto y tienen como punto en común la localización de importantes deleciones en regiones presentes en el resto de glucoamilasas lo que podría tener implicaciones en su estabilidad y función. Las glucoamilasas de *Saccharomycopsis* y *Saccharomyces* presentan una estrecha relación ya que las inserciones y deleciones se han producido en los mismos sitios y además ambas carecen de un dominio de unión al almidón (Coutinho y Reilly, 1997).

Los módulos de unión a carbohidratos (CBMs) se han clasificado, al igual que los dominios catalíticos en familias que intentan reflejar las similitudes en su secuencia aminoacídica y en su estructura tridimensional. La función primordial de los CBMs es la de incrementar la eficiencia catalítica del enzima frente a sustratos insolubles. Actúan, principalmente, aproximando espacialmente enzima y sustrato, y alterando la superficie del polímero a degradar (Boraston et al., 2004; Hashimoto, 2006).

Los dominios de unión al almidón (SBDs) se encuentran clasificados en varias familias de CBMs. La familia CBM20, una de las más estudiadas, engloba los SBDs en posición C-terminal de las amilasas microbianas (Machovic y Janecek, 2006). En esta familia destaca la estructura, resuelta por espectroscopía de RMN, del SBD de *Aspergillus niger* (Sorimachi et al., 1997; Sorimachi et al., 1996). En contraste con el alto contenido en α -hélices del dominio catalítico de glucoamilasas, el SBD está compuesto por un conjunto de ocho cadenas β formando un motivo denominado β -sandwich. Este motivo es el plegamiento dominante entre los módulos de unión a substrato encontrados en glicosil hidrolasas.

Si bien la mayoría de las glucoamilasas de la familia 15GH poseen un SBD, una característica estructural, muy importante desde el punto de vista funcional, de las GAs de levadura es la ausencia de este dominio (Sevcik et al., 1998). La falta del SBD no reduce la eficacia de los enzimas cuando actúan sobre almidón soluble, pero diversos estudios han confirmado la importancia de este elemento en la degradación de moléculas grandes de almidón insoluble (Cornett et al., 2003; Boraston et al., 2004).

Las GAs que presentan los dos dominios poseen una región que los conecta. La estructura y longitud de la región conectora varia sustancialmente entre glucoamilasas, lo que sugiere una independencia funcional entre el CD y el SBD (Coutinho y Reilly, 1994a y 1997).

La glicosilación es una importante característica estructural de las GAs fúngicas, En algunos casos, como ocurre en la GA de *Saccharomyces cerevisiae*, puede alcanzar un grado extremo (Adam et al. 2004). En la GA de *A. niger*, la mayor densidad de glicosilación la presenta la región conectora, lo que contribuye a aumentar la separación física del CD y el SBD (Coutinho y Reilly, 1997).

Aunque las GAs presentan múltiples sitios potenciales de N-glicosilación, solo tres de ellos aparecen conservados en las GAs de distintas subfamilias y los tres están localizados en el CD, en concreto, en

loops de la cadena polipeptídica desprovistos de estructura secundaria (Coutinho y Reilly, 1997).

Los carbohidratos asociados a glucamilasas parecen que tienen un efecto estabilizador y que, además, dirigen el correcto plegamiento de la proteína (Coutinho y Reilly, 1997). Estudios de la GA de *Saccharomyces fibuliger*, que comparan los parámetros cinéticos del enzima glicosilado y no glicosilado, permiten deducir que la glicosilación no juega un papel crítico en la actividad enzimática pero que es importante en la estabilidad térmica del enzima (Solovicova et al., 1999). Estudios adicionales con la GA de *A. niger* también confirman el papel estabilizador de la glicosilación (Jafari-Aghdam et al., 2005).

Objetivos

Como hipótesis de partida, la combinación de la capacidad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* con la capacidad amilolítica de las cepas pertenecientes a la variedad *diastaticus* podría resultar una estrategia eficaz para producir bioetanol industrial con mayor eficacia.

Debido a que *S. cerevisiae* secreta la glucoamilasa en baja cantidad y a que este enzima posee una actividad muy limitada frente a almidón insoluble, los dos objetivos principales planteados en esta tesis son, por un lado, la obtención de nuevas estirpes de *S. cerevisiae* productoras de mayor actividad amilolítica y por otro, la mejora de las propiedades catalíticas de este enzima.

Los aspectos fundamentales que se abordan en este trabajo son los siguientes:

1. Estudio y selección de cepas de levadura, de distintos orígenes, que actúen como hospedador adecuado para la sobreproducción de la glucoamilasa de *S. cerevisiae*.

2. Construcción y análisis de versiones modificadas de la glucoamilasa de superior capacidad hidrolítica frente a almidón insoluble, dotando al enzima de la capacidad de unirse al almidón por la adición de un dominio de unión al substrato.

3. Mejora de la actividad hidrolítica del enzima y de su capacidad desramificante sobre los enlaces α -1,6 de la molécula de almidón por técnicas de mutagénesis dirigida y aleatoria.

Materiales y Métodos

1. ESTIRPES MICROBIANAS.

Las cepas de *Saccharomyces* utilizadas en este trabajo aparecen listadas en la tabla 3.

ESTIRPE	PROCEDENCIA	GENOTIPO
<i>S. cerevisiae</i>		
SPX15-3D	Polaina y Wiggs, 1983.	<i>MATα, leu1, thr1, STA1, sta10.</i>
X180184C-1A	J Polaina	<i>MATα, ade2, lys7, trp1, sta10, ura3, sta^o.</i>
IVPX2-1C	Adam y Polaina, 1991.	<i>MATα, ilv2, ura3, trp1, STA10, sta^o.</i>
Sc340	Mylin et al., 1990.	<i>MATα, ade1, leu2, ura3, his3::(GAL10pGAL4, URA3), sta^o.</i>
BY4741	Brachmann et al., 1998.	<i>MATα, his3, leu2, met15, ura3, sta^o.</i>
BY4741 mnn9	"	<i>MATα, his3, leu2, met15, ura3, (ypl050c::Kan MX4), sta^o.</i>
Y427	Este trabajo	<i>MATα, trp1, ilv2, his3::(GAL10pGAL4, URA3), sta^o.</i>
X180184C-1Δ [STA1]_n	"	Cepa X180184C-1 Δ transformada con el plásmido pS2.
IVPX2-1C [STA1]_n	"	Cepa IVPX2-1C transformada con el plásmido pS2.
Sc 340 [STA1]_n	"	Cepa Sc340 transformada con el plásmido pS2.
BY4741 [STA1]_n	"	Cepa BY4741 transformada con el plásmido pS2.
BY4741 [GAL1p_STA1]_n	"	Cepa BY4741 transformada con el plásmido pYS2.
BY4741 mnn9 [STA1]_n	"	Cepa BY4741 mnn9 transformada con el plásmido pS2.
BY4741 [STA1Δ]_n	"	Cepa BY4741 transformada con el plásmido pS2 Δ .
BY4741 [SBD_STA1]_n	"	Cepa BY4741 transformada con el plásmido pSS4.
BY4741 [STA1_SBD]_n	"	Cepa BY4741 transformada con el plásmido pSS2.
Y453	"	Cepa BY4741 transformada con el plásmido pSI2. <i>MATα, his3, leu2, met15, ura3, RDN1::(leu2d, STA1).</i>
Y455	Y453 x Y427	<i>MATα/MATα, his3/his 3::(GAL10pGAL4::URA3), RDN1::(leu2d, STA1).</i>
Y456	Este trabajo	<i>MATα, met5, his 3::(GAL10pGAL4, URA3), RDN1::(leu2d, STA1).</i>
Y457	"	<i>MATα, ilv2, his 3::(GAL10pGAL4, URA3), RDN1::(leu2d, STA1).</i>

ESTIRPE	PROCEDENCIA	GENOTIPO
Y459	Y456 x Y457	<i>MATa/MATα, his3/his 3::(GAL10pGAL4, URA3), RDN1::(leu2d, STA1).</i>
Y466	Este trabajo	<i>MATa/MATa, his3/his 3::(GAL10pGAL4, URA3), RDN1::(leu2d, STA1).</i>
Y468	"	<i>MATα/MATα, his3/his 3::(GAL10pGAL4, URA3), RDN1::(leu2d, STA1).</i>
Y469	Y466 x Y468	<i>MATaa/MAT$\alpha\alpha$, his3/his 3::(GAL10pGAL4, URA3), RDN1::(leu2d, STA1).</i>
FJF135	Benítez et al., 1983	Cepa Vínica. Jerez, <i>sta</i> ^o .
FJF305	"	Cepa Vínica. Jerez, <i>sta</i> ^o .
YKP1	Latorre-García et al., 2007.	Cepa procedente de Kéfir, <i>sta</i> ^o .
Y370	Cedida por J.A. Prieto.	Cepa Panadera, <i>sta</i> ^o .
FJF135 [KAN STA1]_n	Este trabajo	Cepa FJF135 transformada con el plásmido pSK2.
FJF305 [KAN STA1]_n	"	Cepa FJF305 transformada con el plásmido pSK2.
YKP1 [KAN STA1]_n	"	Cepa YKP1 transformada con el plásmido pSK2.
Y370 [KAN STA1]_n	"	Cepa Y370 transformada con el plásmido pSK2.
<hr/> <i>S. pastorianus</i> <hr/>		
NCYC452	National Collection of Yeasts Cultures. UK.	Cepa Cervecera, <i>sta</i> ^o .
NCYC512	"	Cepa Cervecera, <i>sta</i> ^o .
NCYC519	"	Cepa Cervecera, <i>sta</i> ^o .
NCYC520	"	Cepa Cervecera, <i>sta</i> ^o .
NCYC529	"	Cepa Cervecera, <i>sta</i> ^o .
NYCY719	"	Cepa Cervecera, <i>sta</i> ^o .
NYCY985	"	Cepa Cervecera, <i>sta</i> ^o .
NYCY1295	"	Cepa Cervecera, <i>sta</i> ^o .
NYCY1296	"	Cepa Cervecera, <i>sta</i> ^o .
NCYC452 [KAN STA1]_n	Este trabajo.	Cepa NCYC452 transformada con el plásmido pSK2.
NCYC512 [KAN STA1]_n	"	Cepa NCYC512 transformada con el plásmido pSK2.

ESTIRPE	PROCEDENCIA	GENOTIPO
NCYC519 [KAN STA1] _n	"	Cepa NCYC519 transformada con el plásmido pSK2.
NCYC520 [KAN STA1] _n	"	Cepa NCYC520 transformada con el plásmido pSK2.
NCYC529 [KAN STA1] _n	"	Cepa NCYC529 transformada con el plásmido pSK2.
NYCY719 [KAN STA1] _n	"	Cepa NYCY719 transformada con el plásmido pSK2.
NYCY985 [KAN STA1] _n	"	Cepa NYCY985 transformada con el plásmido pSK2.
NYCY1295 [KAN STA1] _n	"	Cepa NYCY1295 transformada con el plásmido pSK2.
NYCY1296 [KAN STA1] _n	"	Cepa NYCY1296 transformada con el plásmido pSK2.
<i>S. bayanus</i>		
NYCY1324 [KAN STA1] _n	National Collection of Yeasts Cultures. UK.	Cepa laboratorio, <i>sta</i> ^o .
NYCY1324 [KAN STA1] _n	Este trabajo	Cepa NYCY1324 transformada con el plásmido pSK2.
<i>S. boulardii</i>		
Y111 [KAN STA1] _n	Ultralevura liofilizada. Bristol_Myers, SAE.	Probiótico, <i>sta</i> ^o .
Y111 [KAN STA1] _n	Este trabajo	Cepa Y111 transformada con el plásmido pSK2.

Tabla 3. Estirpes de *Saccharomyces* utilizadas en este trabajo. La notación *sta*^o hace referencia a la ausencia de una copia del gen *STA1* en el genoma de esa estirpe. NCYC: National Collection of Yeasts Cultures, Norwich, UK

En este estudio se ha utilizado la cepa SPX15-3D como control de actividad glucoamilasa. Esta estirpe contiene una copia genómica del gen *STA1* y carece del gen *STA10*, que ha sido descrito como un represor transcripcional de la expresión del gen *STA1* en *S. cerevisiae* (Polaina y Wiggs, 1983).

Todas las estirpes utilizadas son isogénicas de la cepa silvestre estándar de *S. cerevisiae* S288C, a excepción de las cepas industriales.

Las estirpes X180184C-11A, IVPX2-1C, Sc340, BY4741 y BY4741 *mnn9* se utilizaron como posibles cepas productoras de glucoamilasas ya que

poseían características diferenciales que podían modificar el patrón de producción de la glucoamilasa. En concreto X180184C-11A es una estirpe de laboratorio *sta10* mientras que IVPX2-1C contiene el gen *STA10* activo.

La estirpe Sc340 se utilizó para incrementar la expresión de los genes clonados bajo control de los promotores inducibles por galactosa *GAL1p* y *GAL10p*. Para la inducción de estos promotores se necesita la interacción con la proteína Gal4p. Esta proteína es poco abundante y en algunos casos limita la expresión de los genes de interés. La estirpe Sc 340 tiene integrado en su genoma un casete de expresión del gen *GAL4* integrado en el locus *his3*, regulado por el promotor del gen *GAL10*. Esta construcción aumenta la síntesis de la proteína inductora (Gal4p) lo que a su vez favorece la producción de las proteínas reguladas por los promotores *GAL*. Tanto el gen de interés como el gen *GAL4* se regulan por la adición galactosa (Mylin et al., 1990; Johnston y Hopper, 1982).

Las estirpes BY4741 (Brachmann et al., 1998) e *BY4741mnn9* son cepas isogénicas que fueron suministradas por *S. cerevisiae*-EUROFAN (consorcio europeo para el análisis funcional de *Saccharomyces cerevisiae*). La estirpe mutante *BY4741 mnn9* es incapaz de extender las cadenas de manosa en los procesos de hiperglicosilación (Tsai et al., 1984).

Las estirpes industriales tienen orígenes diversos: cerveza, vino, pan y kéfir.

La cepa de *Aspergillus niger*, CECT 2775, utilizada como fuente de glucoamilasa control, se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (<http://www.cect.org/>).

En los procesos de clonación de ácidos nucleicos se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α , cuyo fenotipo es *supE44*, Δ *lacU169*[Φ 80 *lacZ* Δ M15], *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1* (Hanahan, 1983).

2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

2.1 Medios y condiciones de cultivo.

2.1.1 Crecimiento de levaduras.

Los medios para el crecimiento de levaduras en condiciones de laboratorio se describen a continuación. En todos los casos, el crecimiento de cultivos en medio líquido se estimó inicialmente realizando una curva de crecimiento para ello se midió la densidad óptica del cultivo a 600nm de longitud de onda (DO_{600}) a distintos tiempos.

Medio rico (YP): Se compone de extracto de levadura 1% (p/v), bactopectona 2% (p/v), y como fuente de carbono, glucosa al 2% (p/v) (medio rico YPD). Y en algunos casos, galactosa al 1% (p/v) (medio de inducción YP,1%D,1%Gal). Las placas de medio sólido contenían además 2% (p/v) de agar bacteriológico.

Para la selección de transformantes de levadura industrial, el medio rico se suplementó con geneticina o G418 (GIBCO) 200 mg/l según el marcador utilizado en el DNA transformante.

Medio mínimo (SD): Se compone de base nitrogenada para levadura (YNB) sin aminoácidos 0,17% (p/v), y sulfato amónico, $(NH_4)_2SO_4$, 0,5% (p/v) suplementado con glucosa al 2% (p/v). En los casos en los que la cepa albergaba auxotrofías, los requerimientos necesarios fueron añadidos a una concentración final de 20 mg/l (histidina, triptófano, adenina, uracilo y metionina), 30 mg/l (Isoleucina y lisina) o 100 mg/l (leucina). Las placas de medio sólido contenían además 2% (p/v) de agar bacteriológico.

Medio de esporulación: Se compone de Acetato potásico 1% (p/v) y agar bacteriológico 2% (p/v). En los casos necesarios se añadían los requerimientos necesarios para la cepa.

Los cultivos se incubaron a 30°C y en el caso de crecimiento en medio líquido se utilizó agitación orbital a 200rpm.

2.1.2 Crecimiento de la bacteria *E. coli*.

Como se ha indicado anteriormente, en todas las construcciones de plásmidos se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli*. Para cultivar esta cepa se utilizó medio de Luria-Bertani (LB) compuesto por extracto de levadura 0.5% (p/v), peptona 1% (p/v) y cloruro sódico 1% (p/v) (Sambrook et al., 1989). Las placas de cultivo se solidificaron con 2% (p/v) de agar bacteriológico.

Para el cultivo de bacterias con plásmidos portadores del gen *Amp^R* se añadió ampicilina al medio LB, a una concentración final de 50mg/l. Los cultivos líquidos se incubaron a 37°C y 200rpm de agitación orbital. Los cultivos sólidos se incubaron en estufa a 37°C.

2.1.3 Crecimiento del hongo *A. niger*.

Aspergillus niger CECT 2775, se cultivó en un medio rico que contenía almidón soluble 1% (p/v) como fuente de carbono, peptona 0.2% (p/v), extracto de levadura 0.1% (p/v), Casaminoácidos 0.15% (p/v) y una solución compleja de sales y vitaminas descritas por Cove (1966).

2.1.4 Crecimiento de levaduras portadoras de plásmidos episómicos.

La producción de glucoamilasa por estirpes portadoras del gen *STA1* en un plásmido episómico se realizó, en todos los casos, en medio líquido a 30°C con una agitación orbital de 200rpm. En cada caso según la composición del medio y las características de la estirpe, el cultivo se creció en el medio de crecimiento el tiempo adecuado para llevarlo hasta saturación, posteriormente se pasó al medio de inducción y se adicionó la galactosa (inductor).

En los casos en los que el transformante contenía un plásmido con un marcador auxotrófico seleccionable (generalmente el gen *URA3* o *Leu2d*) se refrescó la estirpe transformada sembrándola en placas de medio mínimo, con los requerimientos auxotróficos necesarios para cada estirpe a excepción de uracilo o leucina, e incubándola durante

48h/30°C. Posteriormente se realizó un preinoculo del transformante en 5ml de medio mínimo sin uracilo que creció durante 24 horas. Se inoculó 1ml de este cultivo a 25ml de medio mínimo sin uracilo y se dejó crecer durante 48h. Las células se recogieron por centrifugación (6000rpm/10min) y se resuspendieron en 25ml de medio de inducción (YP,1%D,1%Gal) creciendo durante 24h. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron (6000rpm/10min) y se recogió el sobrenadante de cultivo para determinar la actividad glucoamilasa. En general las muestras se recogieron a las 24horas desde el momento de la inducción con galactosa. En algunos casos, los cultivos se almacenaron a -80° C para su análisis posterior. Previo al análisis de actividad, las muestras fueron dializadas frente a tampón citrato/fosfato 100mM pH 5.5 para eliminar posibles restos de glucosa o galactosa en el medio.

En los casos que las estirpes contuvieran el gen *STA1* en un plásmido episómico portador de un marcador dominante de resistencia al antibiótico geneticina las placas para refrescar los transformantes contenían YPD y G418 (200 mg/l) y se incubaron durante 24h. Los preinoculos se realizaron en 5ml de medio rico, YPD, con el antibiótico geneticina a la misma concentración y se cultivaron durante toda la noche. Posteriormente se transfirió 1ml del preinoculo a 50ml de YPD con G418. El cultivo, tras 8 o 12h de crecimiento a 30°C, se indujo con galactosa con concentración final de 1%. Los sobrenadantes se recogieron a las 24 y 48h para realizar los ensayos de actividad.

2.1.5 Crecimiento de levaduras portadoras del gen *STA1* integrado en su genoma.

La producción de glucoamilasa en estirpes con el gen *STA1* integrado en el genoma se realizó en las mismas condiciones que los transformantes que contenían un plásmido con un marcador auxotrófico seleccionable (Apartado 2.1.4). En el caso de los estudios de inducción para comprobar si el promotor *GAL* funcionaba

correctamente, se recogieron muestras a las 24, 48 y 72 horas desde el momento de la inducción con galactosa.

2.1.6 Crecimiento de levaduras transformadas con versiones mutantes del gen *STA1*.

Las condiciones de cultivo de las levaduras transformadas con versiones mutantes de *STA1* se adaptaron para facilitar la búsqueda y selección de estirpes que presentaran mayor actividad glucoamilasa. Los crecimientos se realizaron en medio líquido a 30°C con una agitación orbital de 200rpm.

Las estirpes transformadas se sembraron en 5ml de medio mínimo sin uracilo y con los requerimientos auxotróficos necesarios y se incubaron durante 48h/30°C. Posteriormente las células se recogieron por centrifugación (6000rpm/10min), se pasaron a 5ml de medio de inducción (YP,1%D,1%Gal) cultivándose durante 24h. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron (6000rpm/10min) y se recogió el sobrenadante de cultivo para determinar la actividad glucoamilasa.

2.2 Transformación de microorganismos.

2.2.1 Transformación de la bacteria *E. coli*.

Las transformaciones de cepas de *E. coli* se realizaron siguiendo el sistema de transformación biológica artificial descrito por Hanahan (1983).

2.2.2 Transformación de levaduras.

Las distintas cepas de *S. cerevisiae* se transformaron siguiendo el protocolo basado en la incubación con acetato de litio optimizado por Gietz et al., (2002). En el caso de la transformación de levaduras con la técnica de recombinación *in vivo* (Cherry et al., 1999) se transformó la levadura con una mezcla (en proporción molar 1:5) del vector previamente linealizado por amplificación por PCR junto con el DNA a transformar en vez de transformar con un plásmido circular. En el caso

de las transformaciones con plásmidos que complementaban auxotrofías propias de la cepa, tras el choque térmico, la selección se llevó a cabo en medio mínimo SD sin el complemento nutricional objeto de la selección.

En el proceso de transformación de levaduras industriales se utilizó tanto el método de acetato de litio (Gietz et al., 2002) como el método de protoplastos (Adams et al., 1997), dependiendo de la capacidad de transformación de la cepa receptora. En el método de protoplastos se utilizó Zymolyase™-20T (Seikagaku Co., Tokyo, Japan) a concentración final de 2 U/ml para degradar la pared celular de *S. cerevisiae*. En las transformaciones de levaduras industriales el plásmido poseía un marcador dominante de resistencia al antibiótico geneticina por lo que las células se sembraron en medio YPD con G418 (200mg/l).

2.3 Obtención de levaduras amilolíticas con diferente ploidía.

Para la obtención de estirpes diploides y tetraploides con actividad amilolítica se realizaron los siguientes procesos.

2.3.1 Conjugación sexual.

Las levaduras se refrescaron en medio mínimo con los requerimientos necesarios excepto el marcador de selección y se dejaron crecer 48h/30°C. Una vez crecidas, se mezcló un inóculo de células de cada estirpe en placa de medio rico (YPD) incubando toda la noche a 30°C. Posteriormente se pasó el inóculo a una placa con medio de selección (medio mínimo con los requerimientos necesarios si se produce la conjugación) y se incubó durante 48h/30°C. Las colonias que crecieron (presuntos diploides) se sembraron para colonias aisladas en medio mínimo con requerimientos y se comprobaron las auxotrofías y la actividad glucoamilasa.

2.3.2 Esporulación y disección de tétradas.

Los diploides más activos se sembraron en medio de esporulación con los requerimientos necesarios y se incubaron durante 24h/30°C. La esporulación se comprobó observando la formación de tétradas de esporas (ascas) al microscopio. Para la disección de las ascas se digirió un inóculo de biomasa esporulada con jugo digestivo de caracol, (Glusulasa de Roche) durante 15 minutos a temperatura ambiente con el objeto de degradar la pared de las ascas. Posteriormente se separaron las 4 esporas con ayuda de un micromanipulador (Lawrence Precision Machine. Co., Hayward. California). Se crecieron en medio YPD a 30°C hasta aparición de colonias. El análisis posterior de las cepas obtenidas consistió en comprobar sus auxotrofías, tipo sexual y actividad glucoamilasa.

2.3.3 Análisis de las levaduras obtenidas por conjugación y esporulación.

Para comprobar las auxotrofías, las levaduras se sembraron en placa de medio mínimo con todos los requerimientos excepto uno y se comprobó el crecimiento en esas condiciones, tras una incubación de 48h a 30°C.

El tipo sexual de cada cepa se comprobó cruzándola, por separado, con otras dos estirpes de tipo sexual conocido (cepas *tester*, α y α), en placa de YPD, durante 2-3h/30°C y observando al microscopio óptico la formación de zigotos, que sólo tiene lugar con una de ellas.

La integración del casete de expresión de la proteína Gal4p en las levaduras obtenidas por cruzamiento se comprobó por amplificación de un fragmento de DNA de 1.7kb del casete. Para ello se diseñaron los oligonucleótidos LL407 y LL408 (tabla 5) y se utilizó como molde el DNA genómico de las levaduras de interés.

2.3.4 Obtención de estirpes diploides homocigóticas para el tipo sexual.

Los diploides con mayor actividad amilolítica fueron crecidos en 5ml de YPD líquido a 30°C durante toda la noche. El cultivo se sembró en placas de YPD para obtener colonias aisladas. Inmediatamente, estas placas se sometieron a una dosis subletal de radiación ultravioleta durante un tiempo variable (0, 5, 15, 30s y 1min), comprobándose el crecimiento tras 48-72h a 30°C.

Por otro lado, a partir de una suspensión de dos estirpes haploides de tipo sexual conocido, se sembraron placas de YPD en césped y se incubaron durante 24h/30°C.

Las levaduras irradiadas se cruzaron con las levaduras *tester* α y α replicando ambas placas con terciopelo estéril a placas de medio selectivo, que se dejaron crecer durante 48h/30°C. Los diploides homocigóticos para el tipo sexual se identificaron porque eran capaces de crecer en ese medio.

Las colonias que conjugaron se recuperaron de las placas de YPD originales, se sembraron para colonias aisladas y se comprobó de nuevo el tipo sexual, auxotrofías y la actividad glucoamilasa. Los tetraploides se construyeron por cruzamiento de los diploides homocigóticos para el tipo sexual.

3. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA.

3.1 Tratamientos enzimáticos del DNA.

Los tratamientos de digestión con endonucleasas de restricción, desfosforilación de los extremos de vectores de clonación con fosfatasa alcalina, fosforilación de los extremos de DNA amplificados por PCR con T4 polinucleótido quinasa, rellenado de los extremos de DNA con el fragmento *klenow* (Fragmento grande de la DNA polimerasa I) y las

reacciones de ligación con la T4 ligasa se realizaron siguiendo las recomendaciones descritas en Sambrook et al., 1989.

3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación por PCR se utilizó para la obtención de fragmentos de DNA que posteriormente se clonaron en los plásmidos correspondientes. Estas reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ l o 50 μ l según fuese a escala analítica o preparativa, respectivamente.

La amplificación se realizó en un termociclador "Gene Amp PCR System 2400" de Perkin Elmer. Las reacciones de amplificación contenían DNA molde a concentración 1-10 ng/ml, 3-5 unidades de la polimerasa correspondiente (Tabla 4), y el tampón de reacción apropiado para el enzima. La concentración final de dNTPs fue 0.2 mM y la de oligonucleótidos iniciadores fue 0.2 μ M. La concentración de MgCl₂ varió, según el enzima utilizado para amplificar, entre 1 y 5 mM.

Enzima	Casa comercial	Características		
		Actividad exonucleasa 3'-5'	Capacidad amplificación	Actividad transferasa terminal
Expand High Fidelity DNA polymerase mix	Roche	SI	Hasta 9 kb	SI
<i>Pfu</i> DNA polymerase	Stratagene	SI	Hasta 5 kb	NO
<i>Pfu Turbo</i> ® DNA polymerase	Stratagene	SI	Hasta 15 kb	NO
Netzyme® DNA polymerase	Need	NO	Hasta 5 kb	SI

Tabla 4. Polimerasas de ADN utilizadas para la amplificación de fragmentos mediante PCR.

El programa tipo estándar, que fue modificado en función del molde y los cebadores, consta de una desnaturalización inicial de 5min a 95°C, 25 ciclos de amplificación compuestos por tres procesos: desnaturalización, 30s a 95°C; hibridación, 1min a 55-60°C (según los oligonucleótidos iniciadores) y extensión a 72°C o 68°C (el tiempo de extensión varia según el tamaño de DNA molde y la temperatura según el enzima utilizado para amplificar). El programa finaliza con un periodo de extensión de 10min a 72°C o 68°C.

3.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa a una concentración de 0,7 % (p/v). En la preparación de los geles se utilizó tampón TBE (0,5x) compuesto por Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1,25 mM, que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Las muestras se disolvieron en tampón de carga (azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilene cianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (p/v)). La electroforesis se realizó a voltaje constante entre 2 y 10 V/cm.

3.4 Extracción de DNA a partir de geles de agarosa.

Las electroforesis con fines preparativos se efectuaron en tampón TAE 1x (p/v) (Tris 40 mM, ácido acético glacial 4 M, EDTA 1 mM, pH 8,0) que también fue usado como tampón de electroforesis. La agarosa utilizada fue de bajo punto de fusión para facilitar la recuperación del DNA. Para la obtención de los fragmentos se utilizó el kit comercial "QIAquick Gel extraction kit" de Qiagen.

3.5 Obtención de DNA.

3.5.1 Aislamiento de plásmidos a partir de *E. coli*.

Para la extracción de plásmidos a pequeña escala, se inocularon cultivos de 5ml en medio LB con ampicilina, y se siguió el método de lisis

alcalina descrita por Sambrook et al.,(1989). Para la extracción a mayor escala se partió de cultivos de 50ml y se utilizó un kit comercial de extracción de plásmidos de Roche o Quiagen, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

3.5.2 Aislamiento de DNA genómico de levadura.

La obtención de DNA genómico de levadura se llevó a cabo a partir de 5ml de cultivo en medio YPD siguiendo el método rápido de aislamiento descrito por Polaina y Adam (1991).

4. CONSTRUCCIONES DEL GEN *STA1*.

La relación de plásmidos utilizados o construidos en este trabajo se describe en la Tabla 5.

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	PROCEDENCIA
pUC18	Vector de clonación utilizado para <i>E. coli</i> . Contiene un marcador de selección de resistencia a ampicilina.	Sambrook et al., 1989.
pYES2	Plásmido episómico que contiene el marcador de selección <i>URA3</i> . Los genes clonados están bajo control del promotor del gen <i>GAL1</i> .	Invitrogen.
pEMBLyex4	Plásmido episómico que contiene los genes marcadores <i>URA3</i> y <i>Leu2d</i> . Los genes clonados están bajo el control del promotor <i>CYCGAL10</i> .	Cesareni y Murray, 1987.
YEplac195	Plásmido episómico que contiene el gen marcador <i>URA3</i> .	Gietz y Sugino, 1988.

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	PROCEDENCIA
p3003	Plásmido episómico basado en YEplac195 (Wach et al., 1994) con el marcador KANMX4 que contiene el gen de resistencia a geneticina (G418).	Colección del laboratorio.
pAA11	Plásmido basado en pUC18 construido para dirigir la integración del gen de interés en copia múltiple en el locus <i>RDN1</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	Adam et al., 1995.
pUCS2	Plásmido pUC18 con un inserto <i>SacI/XbaI</i> de 2.5 kb que contiene el gen <i>STA1</i> .	Este trabajo.
pUCS2Δ	Plásmido pUC18 con un inserto <i>SacI/XbaI</i> de 1.8 kb que contiene el gen <i>STA1Δ</i> .	Este trabajo.
pYS2	Plásmido pYES2 con un inserto <i>SacI/XbaI</i> de 2.5 kb que contiene el gen <i>STA1</i> .	Este trabajo.
pKS2	Plásmido p3003 con un inserto <i>StuI/XbaI</i> de 3.5 kb que contiene el fragmento CYCGALp- <i>STA1</i> .	Este trabajo.
pSI2	Plásmido pAA11 con un inserto <i>SacI/XbaI</i> de 3.5 kb que contiene el fragmento CYCGALp- <i>STA1</i> .	Este trabajo.
pS2	Plásmido pEMBLYex4 con un inserto <i>SacI/XbaI</i> de 2.5 kb que contiene el gen <i>STA1</i> .	Este trabajo.
pS2Δ	Plásmido pEMBLYex4 con un inserto <i>SacI/XbaI</i> de 1.8 kb que contiene el gen <i>STA1Δ</i> .	Este trabajo.

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	PROCEDENCIA
pSS2	Plásmido pEMBLyex4 con un inserto <i>SacI/XbaI</i> de 3.0 kb que contiene el fragmento <i>STA1_SBD</i> .	Este trabajo.
pSS4	Plásmido pEMBLyex4 con un inserto <i>SacI/XbaI</i> de 3.0 kb que contiene el fragmento <i>SBD_STA1</i> .	Este trabajo.

Tabla 5. Plásmidos utilizados o construidos en este trabajo. Se describen brevemente las características más importantes de cada construcción y su procedencia.

Los oligonucleótidos diseñados en este trabajo se usaron como cebadores en reacciones de PCR, y se adquirieron a la casa comercial Isogen (Life Science, Barcelona).

La secuencia y el uso concreto de cada uno de ellos se detalla en la Tabla 6.

OLIGO NUCLEÓTIDO	SECUENCIA (Dirección 5'→3')	APLICACIÓN
AC271	GTGACGCAATAACCGTAGAAG AAAC	Cebador para secuenciar el gen <i>STA1</i> .
AC272	GTTTCTTCTACGGTATT GCGTCA C	Cebador para secuenciar el gen <i>STA1</i> .
AC282	CGGGGTACCTACAGCACG	Cebador en 5' para la amplificación del fragmento SBD.
AC283	CGCICTAGACAATTCCGTCGGT CG	Cebador en 3' para la amplificación del fragmento SBD.
AC284	CGGGGTACCCAAACTCTGTAA AAC	Cebador en 3' para la clonación <i>STA1</i> _fragmento SBD.
AC329	CTTCATTCTGGGATGCCTATC	Cebador para secuenciar la zona de unión del híbrido <i>STA1_SBD</i> .
AC357	TTGACTTTGGCAAGGGCATT	Cebador en 5' para construir <i>STA1Δ</i> .
AC358	TGTAGAAGAAACAGAAGTTTC	Cebador en 3' para construir <i>STA1Δ</i> .

OLIGO NUCLEÓTIDO	SECUENCIA (Dirección 5'→3')	APLICACIÓN
LL330	CGCGAGCTCACCATGGTAGG CCTCAA	Cebador en 5' para la clonación de <i>STA1</i> en pEMBLyex4.
LL407	CCACTGTCACCTGGTTGGACG	Comprobación de la integración del casete <i>his 3::(GAL10pGAL4, URA3)</i> en estirpes con diferente ploidía.
LL408	CCACAATAACTTTTTCCCG	Comprobación de la integración del casete <i>his 3::(GAL10pGAL4, URA3)</i> en estirpes con diferente ploidía.
LL442	CGGGGTACCAGTATCGTGGCT	Cebador en 5' para la clonación del fragmento SBD en pS2.
LL454	ACTTACGCGTCTTCTTTCTTTACTTT ACTGGTACAACCTGTCTGC	Cebador en 5' para la mutagénesis dirigida del loop 3 del gen <i>STA1</i> .
LL455	TTCTCCCATAGATCAAATCCG G	Cebador en 3' para la mutagénesis dirigida del loop 3 del gen <i>STA1</i> .
LL456	GAGGACGTCTATATGGGAGGT GGCGTTGGCGAGGGAAATCC CTGGGTCCTGG	Cebador en 5' para la mutagénesis dirigida del loop 5 del gen <i>STA1</i> .
LL457	CGCATAACCGGCCACGGCA ATACCCGTTGCATTTTGGAGCT ATCG	Cebador en 3' para la mutagénesis dirigida del loop 5 del gen <i>STA1</i> .
LL458	GCAGATATCTTTGATGATATTGTA CG	Cebador para secuenciar el loop 3 del gen <i>STA1</i> .
LL460	CCTGCCGTCCTGAACACGTTG C	Cebador para secuenciar el loop 5 del gen <i>STA1</i> .
LL461	GCGTTCGATATACCCCATCAAC GATAGCTCC	Cebador para secuenciar el gen <i>STA1</i> .
LL462	CGCTGGAAGTGTACTTGTGACG ACTCAGAGC	Cebador para secuenciar el gen <i>STA1</i> .
LL464	TCCCATATAGACGTCCTCCGC ATACCG	Cebador en 3' para la delección del loop 5 del gen <i>STA1</i> .
LL465	TCCCATATAGACGTCCTCCGC ATACCGGCCAGGGCAATAC CCGTTGC	Cebador en 5' para la delección del loop 5 del gen <i>STA1</i> .

OLIGO NUCLEÓTIDO	SECUENCIA (Dirección 5'→3')	APLICACIÓN
LL470	GCGGATCCCCGCCAGGTGTA CGTCACCGTCGCGG	Cebador en 3' para la amplificación del fragmento SBD en pS2.
LL477	GCGCTAGCGGAACTTTTTCTG TCGCTGG	Cebador para secuenciar el gen <i>STA1</i> .
LL481	GGTTTGTACTTCTTATCAAAT GTAAT	Cebador en 5' para la amplificación de <i>STA1</i> desde pYS2.
LL482	TACTAACATAACTATAAAAAAAT AAATAGG	Cebador en 3' para la amplificación de <i>STA1</i> desde pYS2.
LL483	GCTCGGTACCAAGCTTAATATT CCCTATAG	Cebador en 5' para la amplificación de pYES2.
LL484	GCATCATGTAATTAGTTATGTCA CGCTTAC	Cebador en 3' para la amplificación de pYES2.
PB161	GCTCTAGAGGAAATACACTTGT G	Cebador en 3' para la clonación de <i>STA1</i> en pEMBLyex4.

Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Las secuencias subrayadas indican los sitios de restricción utilizados para clonar.

A continuación se detalla el proceso de construcción de cada uno de los plásmidos descritos en la tabla 5.

4.1 Proceso de construcción de plásmidos episómicos.

4.1.1 Construcción de pS2 y pYS2.

La región codificante del gen *STA1* fue amplificada con el kit *Expand High Fidelity PCR System* a partir de DNA genómico de la cepa SPX15-3D. La secuencia amplificada corresponde a la descrita por Yamashita et al., (1985b) con correcciones introducidas por Henrissat et al., (1994). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen fueron LL330 y PB161 (Tabla 6). Estos oligonucleótidos contienen los sitios de restricción *SacI* y *XbaI* respectivamente. El fragmento de DNA amplificado, de 2.5 kb de tamaño, fue clonado en los plásmidos

pEMBLyex4 (Murray et al., 1987) y pYES2 (Invitrogen), vectores lanzaderas capaces de replicarse en *E. coli* y *S. cerevisiae*. En estas construcciones, el gen *STA1* queda bajo control de promotores inducibles por galactosa, en concreto el promotor *CYCGAL10* para pEMBLyex4 y *GAL1* para pYES2. Las construcciones resultantes se denominaron pS2 y pYS2, respectivamente.

4.1.2 Construcción de pKS2.

La construcción pKS2 se obtuvo para transformar estirpes de levadura de origen industrial usando como marcador de selección la resistencia a geneticina (G418). Para ello se clonó el fragmento portador de *CYCGALp-STA1*, de 3.5 kb de tamaño, obtenido de pS2 mediante digestión parcial con *StuI* y *XbaI*, en el vector p3003, en los sitios de restricción *SmaI/SacI*. p3003 es un vector basado en el plásmido YEplac195 (Gietz y Sugino, 1988) que contiene el módulo *KANMX4* (Wach et al., 1994) que aporta la resistencia a G418.

4.1.3 Construcción de pUCS2.

El gen *STA1* fue amplificada con el kit *Expand High Fidelity PCR System* a partir de la construcción pS2 utilizando los oligonucleótidos LL330 y PB161 (Tabla 6) que contienen los sitios de restricción *SacI* y *XbaI* respectivamente. El fragmento de DNA amplificado, de 2.5 kb de tamaño, se digirió y fue clonado en el plásmido pUC18 (Sambrook et al., 1989) para que fuera capaz de replicarse en *E. coli*. La construcción resultante se denominó pUCS2 y se utilizó como molde para realizar otras construcciones.

4.2 Construcción integrativa (pSI2).

Para la integración de *STA1* en el genoma de *S. cerevisiae* se realizó la construcción denominada pSI2 que dirige la integración del gen en copia múltiple al locus *RDN1*, en concreto a las secuencias

repetidas del DNA ribosómico. Para ello el fragmento *CYCGALp-STA1* obtenido como en la construcción *pKS2*, se clonó en el vector *pAA11* (Adam et al., 1995) que había sido digerido con *SacI*, tratado con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa (Fermentas) para dejar romos los extremos digeridos y digestión posterior con *XbaI*.

4.3 Construcción de una versión de *STA1* con una deleción parcial (*pS2Δ*).

Para construir una versión del gen *STA1* (denominada *STA1Δ*), portadora de una deleción correspondiente al dominio N-terminal de la proteína, se amplificó el plásmido *pUCS2* completo con un par de oligonucleótidos con orientación divergente, que flanqueaban la zona a deleccionar). Los oligonucleótidos usados fueron AC357 y AC358 (Tabla 6). Las amplificaciones fueron llevadas a cabo con la DNA polimerasa *Pfu*, enzima polimerasa sin actividad transferasa terminal y que por tanto deja los extremos sin colas de Adenina. (La Figura 6 muestra un esquema del proceso).

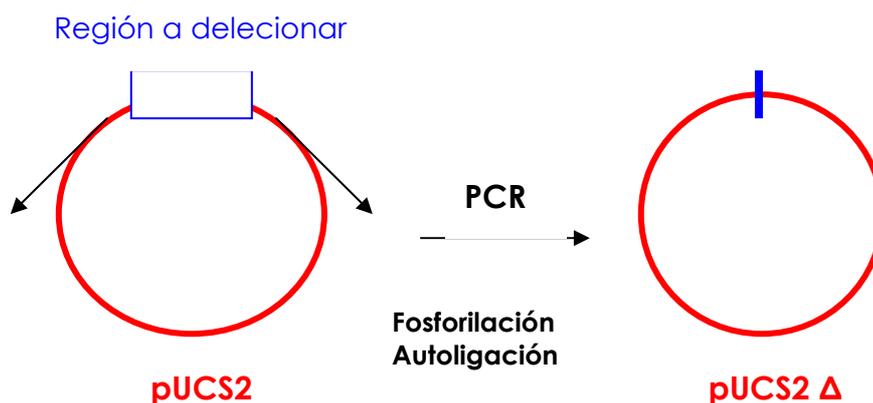


Figura 6. Esquema del proceso de deleción de *pUCS2*, (Los círculos rojos, son los plásmidos indicados). Se diseñaron dos oligonucleótidos divergentes (Flechas negras) y que flanqueaban a la zona a deleccionar (cuadrado azul). Se amplificó el plásmido completo y se obtuvo la construcción *pUCS2Δ* tras fosforilar y autoligar el fragmento amplificado (Hemsley et al., 1989).

El fragmento lineal de DNA producto de la amplificación fue tratado con PNK (enzima polinucleótido quinasa de Roche) para fosforilar sus extremos, posteriormente se autoligó (con T4 DNA ligasa de Fermentas) para generar un plásmido circular y portador del alelo *STA1Δ* denominado pUCS2Δ. La versión *STA1Δ* fue transferida posteriormente a pEMBLyex4, mediante obtención del gen modificado *STA1Δ* por digestión *SacI/XbaI*. La construcción resultante se denominó pS2Δ.

4.4 Construcción de glucoamilasas híbridas (pSS2 y pSS4).

El esquema de la construcción de las GAs híbridas se muestra en la Figura 7, al final de este apartado.

Para la construcción pSS2, se realizó una amplificación de *STA1* con los oligonucleótidos LL330 y AC284 (Tabla 6). El oligonucleótido AC284 introduce un sitio de restricción *KpnI* que permite la fusión en fase de *STA1* con un fragmento de DNA de *Aspergillus niger*. Este fragmento codifica el dominio de unión al almidón (SBD o Starch Binding Domain) de la glucoamilasa del hongo junto con la región conectora de éste con su dominio catalítico. El fragmento de 600pb, se amplificó a partir de DNA genómico de *A. niger* CECT 2775 con los oligonucleótidos AC282 y AC283 (Tabla 6), introduciendo los sitios de restricción *KpnI* y *XbaI*, respectivamente. El fragmento de DNA que contenía el dominio se definió en base a la estructura tridimensional resuelta del SBD (Sorimachi et al., 1997; Sauer et al., 2000) y a la secuencia conocida de la glucoamilasa de *A. niger* (Boel et al., 1984).

Los fragmentos que contenían *STA1* y el SBD de *A. niger* fueron posteriormente digeridos con los enzimas correspondientes y ligados simultáneamente en pEMBLyex4 en los sitios *SacI* y *XbaI*.

El plásmido resultante, denominado pSS2, contiene una glucoamilasa híbrida bajo control del promotor *CYCGAL10*. La secuencia de la proteína híbrida, en el lugar donde se produce la fusión, es VLQSLGTYSS, en la que los cinco primeros aminoácidos

corresponden al extremo carboxi terminal de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* y los cinco últimos pertenecen a la glucoamilasa de *A. niger*. Esta zona fue secuenciada, utilizando el oligonucleótido AC329 (Tabla 6), para comprobar que la pauta de lectura del gen híbrido era correcta.

Para la construcción pSS4 se utilizaron los sitios de restricción *Bam*HI que se encuentran al final del péptido señal del gen *STA1* y al principio del SBD de *A. niger*. Para ello se digirió la construcción pS2 con *Bam*HI y se trató con fosfatasa alcalina, que elimina los grupos fosfatos de los extremos del fragmento de DNA para evitar la autoligación. A la vez se amplificó el SBD de *A. niger*, usando como molde la construcción pSS2, con el oligonucleótido LL442 y LL470 (Tabla 6), que introduce un sitio *Bam*HI al final del SBD. Posteriormente se ligó el inserto (SBD) digerido y el vector (pS2) abierto y se comprobó la construcción por análisis de restricción.

Todos las amplificaciones de fragmentos de DNA se realizaron con la mezcla de enzimas *DNA polimerasa* del kit *Expand High Fidelity PCR System*(Roche).

La Figura 7 muestra el esquema de construcción de las GAs híbridas.

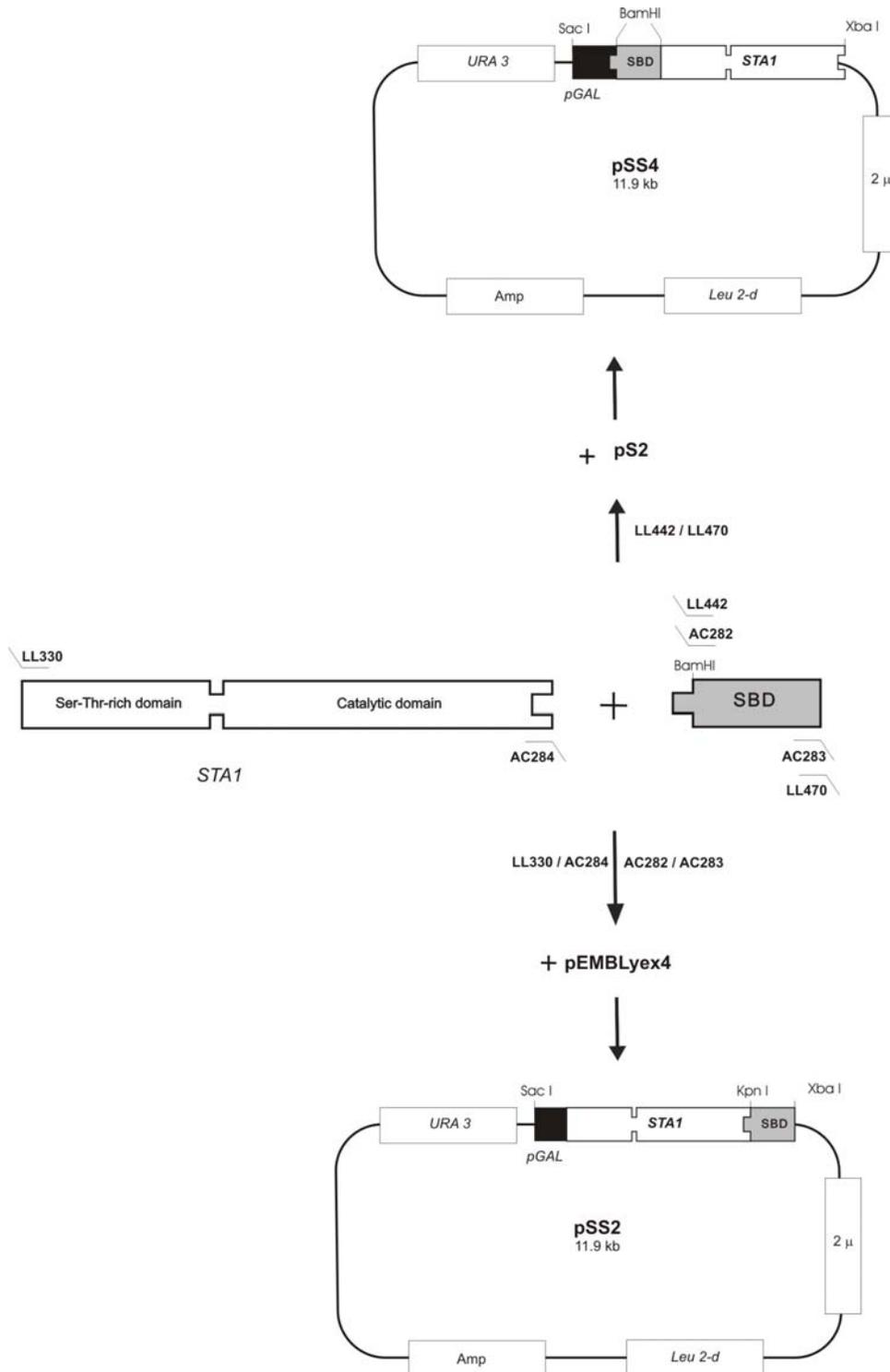


Figura 7. Esquema de construcción de pSS2 y pSS4. *STA1* y el fragmento que contiene el SBD de *A. niger* (en el centro de la figura) se amplificaron con los oligonucleótidos que se indica y se ligaron con los plásmidos pEMBLyex4 y pS2, para dar las construcciones pSS2 y pSS4 respectivamente (Modificado de Latorre-García et al., 2005).

5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD GLUCOAMILASA.

Uno de los objetivos de la tesis es obtener estirpes con elevada capacidad amilolítica capaz de degradar eficientemente almidón, por lo tanto una de las características más importante a determinar para cada estirpe es su actividad glucoamilasa. Una forma indirecta de cuantificar la cantidad de proteína sintetizada, y por tanto la expresión endógena del gen es calcular la actividad glucoamilasa específica (por ml de cultivo) de cada cepa en condiciones de crecimiento e inducción idénticas para que resulten comparables.

La actividad enzimática de la glucoamilasa producida por *S. cerevisiae* fue detectada y evaluada tanto de forma semicuantitativa como cuantitativa.

5.1 Determinación semicuantitativa de actividad glucoamilasa.

La determinación semicuantitativa se realizó observando los halos de hidrólisis alrededor de las colonias transformadas u obtenidas por conjugación, en placas de YP1%D1%Gal y almidón insoluble al 1%. La observación de los halos mejora precipitando el almidón en frío o con etanol (Polaina and Wiggs 1983). Los ensayos para la búsqueda de variantes mutantes del enzima con actividad desramificante se realizaron de forma similar, sobre medio sólido que contenía pululano al 1% en vez de almidón.

El ensayo de actividad en placa resulta muy útil para seleccionar estirpes con actividad en el caso de la búsqueda de mutantes de glucoamilasa y para comprobar la actividad de las levadura transformadas con plásmidos que contienen el gen *STA1* o versiones de este gen.

5.2 Determinación cuantitativa de actividad glucoamilasa.

Los análisis cuantitativos de actividad enzimática se realizaron midiendo la cantidad de glucosa liberada a partir de almidón soluble al 0.5%, almidón insoluble o pululano al 1%. La glucosa se determinó con el ensayo de glucosa oxidasa-peroxidasa y o-dianisidina (Sigma). Además se empleó para la determinación de glucosa, la cromatografía de intercambio aniónico usando un sistema Dionex (Sunnyvale, CA, USA) equipado con una columna CarboPaxPA-1 y una unidad de detección de pulso amperiométrico. Utilizando para la elución un sistema isocrático de 16 mM NaOH a un flujo de 1 ml min⁻¹.

5.3 Definición de actividad.

Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 mol de glucosa por minuto a 37°C.

La actividad enzimática se expresó como unidades por ml de cultivo, en lugar de usar la actividad específica, ya que las proteínas glicosiladas no pueden ser cuantificadas mediante procesos convencionales de determinación proteica (Fountoulakis et al., 1992).

6. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA GLUCOAMILASA.

6.1 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

La proteína presente en los sobrenadantes de cultivo de las estirpes de *S. cerevisiae* transformadas con plásmidos que contenían el gen *STA1* o versiones de éste, se recuperaron en forma sólida por liofilización. Para ello muestras del volumen adecuado se congelaron a -80°C y se sometieron a liofilización durante 8-12h.

Las muestras para el ensayo eran pequeñas alícuotas del material liofilizado (aproximadamente 200-500µl de sobrenadante) resuspendidas en tampón citrato-fosfato 50 mM pH 5.5, tampón de carga de proteínas 1x y β-mercaptoetanol al 0.1% que se incubaron 5min/100°C.

Estas alícuotas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (1h/100mV y 60mA). Los geles se prepararon con sistema comercial de electroforesis de proteínas de BioRad según la composición indicada por Sambrook et al., (1989).

Los geles se analizaron por tinción con un tampón con Coomassie R250 (Coomassie brilliant blue R250 0.25% (p/v), metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)) en agitación durante 20min y destinción con la solución de destinción (Metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)) hasta observación de las bandas.

6.2 Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa.

Para los análisis *western blot*, las proteínas se separaron por electroforesis y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (1h, 100V) con el sistema comercial de transferencia Mini Trans-Blot[®] (BioRad).

Después de un tratamiento de bloqueo con leche en polvo al 5% en Tween/PBS (0.1% de Tween 80 en tampón PBS, Sambrook et al., 1989) durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, los filtros se incubaron con antisuero de conejo frente a las glucoamilasas de *S. cerevisiae* o de *A. niger*, diluido 1:1000 en Tween/PBS/1%Leche, durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.

Tras varios lavados con Tween/PBS se realizó la incubación con el anticuerpo secundario, inmunoglobulina G anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina, diluida 1:2000 en Tween/PBS, durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.

Tras los lavados con Tween/PBS se utilizaron Nitro blue tetrazolium chloride (NBT) y 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate (BCIP), como sustratos para la detección colorimétrica con fosfatasa alcalina.

Los anticuerpos contra la glucoamilasa de *S. cerevisiae* se produjeron por inoculación al conejo con un péptido conjugado sintético que contenía la secuencia VEELRQTRRDISK, correspondiente a las posiciones 555-567 de la proteína Sta1p. El antisuero contra la glucoamilasa de *A. niger* fue un obsequio de B. Svensson, Laboratorios Carlsberg, Copenhague, Dinamarca.

6.3 Proceso de desglucosilación.

Para comprobar la importancia de la glicosilación en Sta1p se realizó un proceso de desglucosilación. La desglucosilación se realizó tratando el enzima desnaturalizado con endoglucosidasa H (endo H) de *Streptomyces plicatus*. Para ello muestras de sobrenadantes de cultivo liofilizadas y resuspendidas en tampón citrato-fosfato 50 mM pH 5.5, SDS al 0.4% y β -mercaptoetanol al 1% se hirvieron durante 10min con agitación. La desnaturalización de la proteína facilita el acceso al enzima endo H. Posteriormente se añadió 1mM de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) y 5mU del enzima EndoH y se incubó a 37°C durante 16 horas con agitación. Tras la incubación las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida (Apartado 6.1).

6.4 Ensayo de la capacidad de la glucoamilasa para unirse al almidón.

El ensayo de unión de la glucoamilasa a almidón insoluble se realizó incubando a 0° C durante 10 minutos y con agitación una cantidad conocida de glucoamilasa con una suspensión de almidón de maíz al 1% en tampón citrato-fosfato 50 mM, pH 5.5, Cl_2Ca 5 mM y BSA 0.5%.

El almidón utilizado es de elevado peso molecular y resulta insoluble en agua. Después de la incubación, se centrifugó la suspensión

para separar dos fases: una inferior, correspondiente al almidón sedimentado y una fase acuosa superior que contenía el material soluble. Se determinó la actividad glucoamilasa en la fase superior, la actividad de la fracción unida al almidón se obtuvo calculando la diferencia entre la actividad inicial y la obtenida en la fracción soluble. La Figura 8 muestra un esquema del método seguido para valorar la unión del enzima al almidón.

Actividad inicial = Actividad en el sobrenadante de cultivo

1.-Incubación del Enzima + el Almidón Insoluble (0°C/10min/200rpm)

2.-Separación de fases por centrifugación (13000rpm/5min):

Fase superior: Enzima no unido

Fase inferior: Almidón insoluble y enzima unido

3.-Determinación de la actividad:

Actividad del enzima no unido = Ensayo de Actv de la fase superior.

Actividad del enzima unido = Actv inicial - Actv enzima no unido.

Figura 8. Ensayo de la capacidad de unión de la GA al almidón insoluble. Actv, se refiere a actividad. Se determina experimentalmente la actividad inicial del enzima y la actividad en la fase acuosa (enzima no unido a sustrato). La actividad del enzima unido al almidón se calcula por la diferencia entre ambos valores.

7. ANÁLISIS DE SECUENCIA Y MODELADO POR HOMOLOGÍA.

Para el análisis de las secuencias del gen *STA1* y las diferentes versiones, se utilizó el programa DNAMAN Versión 4.03 (Lynnon Biosoft®).

La búsqueda de secuencias homólogas a los dominios que componen la glucoamilasa codificada por el gen *STA1* se realizó mediante análisis BLAST (Altschul et al., 1997).

Para la búsqueda de estructuras resueltas relacionadas con las regiones de Sta1p se utilizó el programa GenTHREADER (Jones, 1999a).

Los modelos estructurales se obtuvieron haciendo uso del servidor Swiss-Model (Guex y Peitsch, 1997; Guex et al., 1999). El modelado del dominio catalítico de Sta1p se realizó utilizando como molde la estructura de la glucoamilasa de *Saccharomyces fibuligera* (Identificador PDB: 1AYX). Para el modelado de la región rica en serina y treonina se escogió como molde la estructura de la invasina de *Yersinia pseudotuberculosis* (Identificador PDB: 1CWV). (En la Figura 3 se presentan ambas regiones en el gen *STA1*).

Las estructuras proteicas modelizadas fueron analizadas con el programa gráfico Swiss-PDB Viewer (Guex y Peitsch, 1997).

8. MUTAGÉNESIS .

La mutagénesis del gen *STA1* fue generada mediante técnicas de mutagénesis aleatoria y dirigida tal como se detalla a continuación.

8.1 Mutagénesis Aleatoria.

La mutagénesis aleatoria del gen *STA1* se realizó por *error prone-PCR* y recombinación de DNA *in vitro* (también denominado *DNA-shuffling*).

8.1.1 Mutagénesis por *error prone-PCR*.

La mutagénesis por *error prone-PCR* se inició utilizando como DNA molde el plásmido pYS2 que contiene *STA1* (Tabla 5). El gen se amplificó utilizando como cebadores los oligonucleótidos LL481 y LL482 (Tabla 5). Se llevaron a cabo cuatro reacciones paralelas de PCR, cada una de las cuales contenía un dNTP en exceso a una concentración final de 0,5 mM frente a los demás dNTPs que fueron utilizados a la concentración estándar, 0.2 mM.

La amplificación se realizó mediante 25 ciclos con las siguientes etapas: 30s a 94°C (desnaturalización), 30s a 55°C (hibridación) y 3min a

72°C (extensión). El enzima empleado fue la Taq DNA polimerasa (Netzyme).

Se comprobó la amplificación del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa.

8.1.2 Mutagénesis por *DNA-Shuffling*.

El material amplificado se sometió a un procedimiento adicional de mutagénesis aleatoria mediante *DNA-Shuffling* (Stemmer, 1994a y b).

El DNA de partida se digirió con DNAsa I (Roche), a concentración de 5u/μl, durante un tiempo variable de entre 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, dependiendo de la concentración inicial de DNA. El proceso de digestión se monitorizó tomando alícuotas a diferentes tiempos (4, 6 ,8 y 10min) y observando la reducción de tamaño de los fragmentos de DNA en un gel de agarosa a concentración 1.5%. Cuando la digestión generó mayoritariamente los fragmentos del tamaño deseado (entre 250 y 500 pares de bases) se inactivó el enzima añadiendo EDTA a concentración 0.05M y calentando 10min a 80°C. Los fragmentos de DNA digeridos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y se purificaron utilizando un kit comercial (QIAGEN).

Tomando como DNA molde estos fragmentos, se realizó una segunda reacción de amplificación en ausencia de oligonucleótidos iniciadores. Esta etapa pretende la obtención de fragmentos autoensamblados de mayor peso molecular, mediante la hibridación de zonas complementarias. La cantidad de DNA molde utilizada fue de 50 a 100ng. La amplificación por PCR se realizó en 20 ciclos, con etapas de 30s a 94°C (desnaturalización), 30s a 55°C (hibridación) y 40s a 72°C (extensión). El material resultante se analizó por electroforesis en un gel de agarosa para comprobar el aumento de tamaño producido por el autoensamblaje de los fragmentos. En los casos en los que el rendimiento de este proceso de PCR se consideraba insuficiente, se continuó la amplificación con 25 ciclos adicionales, aumentando el

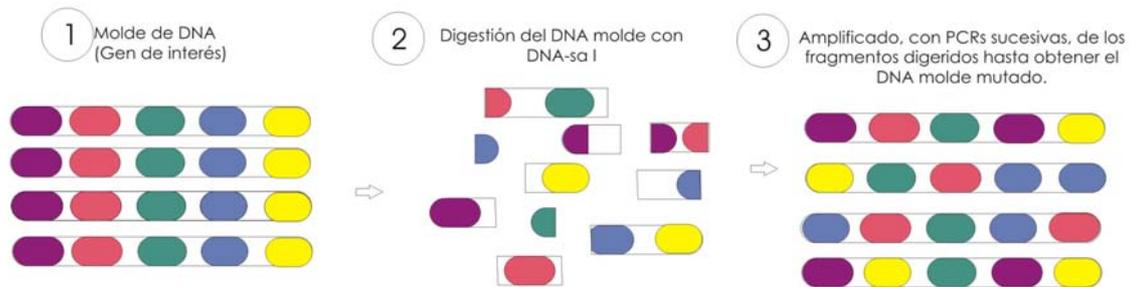
tiempo de extensión a 1min y añadiendo una cantidad suplementaria del enzima Taq DNA polimerasa (1-2 unidades).

Posteriormente se realizó una tercera reacción de amplificación por PCR usando como molde 10-50ng del DNA autoensamblado. Esta PCR se llevó a cabo utilizando como cebadores oligonucleótidos correspondientes a las regiones flanqueantes del gen (LL481 y LL482). Esta amplificación se realizó mediante 25 ciclos, con etapas de desnaturalización 30s a 94°C, hibridación 30s a 55°C y extensión 3min a 72°C. El enzima empleado fue Taq DNA polimerasa (Netzyme).

El producto de esta última amplificación se purificó y se utilizó para transformar levaduras por recombinación *in vivo* (Apartado 2.2.2). El DNA mutagenizado por *shuffling* se mezcló con una preparación del vector pYES2 en forma lineal. Este vector se amplificó con la mezcla de enzimas *Expand High Fidelity DNA polymerase mix* (Roche) y los oligonucleótidos LL483 y LL484 (Tabla 5). Estos oligonucleótidos dejan zonas complementarias de unas 100 pares de bases con el fragmento resultante del *DNA shuffling*, lo que permite la recombinación homóloga *in vivo* entre el gen mutagenizado y el vector linealizado, una vez que ambos fragmentos de DNA han sido introducidos por transformación en la levadura (Cherry et al., 1999; Bulter y Alcalde, 2003).

En la Figura 9 se muestra un esquema del proceso de DNA-*shuffling* y de la recombinación homóloga *in vivo* que ocurre en levaduras.

Técnica de DNA-shuffling



Recombinación homóloga *In vivo*

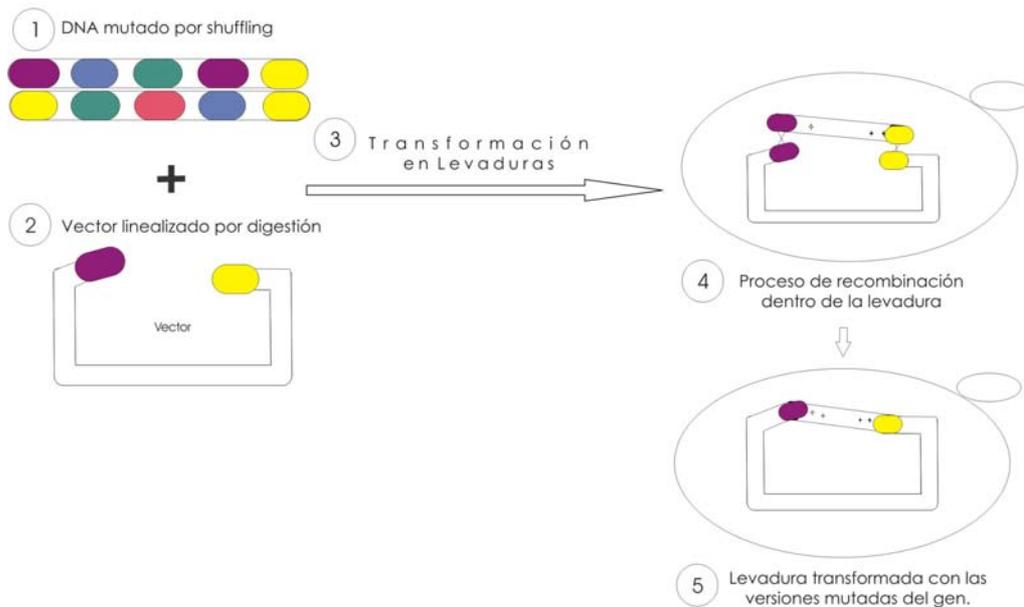


Figura 9. Representación esquemática de los procesos de *DNA-Shuffling in vitro* y de recombinación *in vivo* en la levadura. El gen de interés (1) sufre un proceso de digestión con *DNasa I* (2) y varios procesos de amplificado por PCR (3) hasta recuperar su tamaño original (Proceso de "*Shuffling*"). Posteriormente se transforma en levadura el DNA mutagenizado (1) con un vector linealizado (2), ambos fragmentos presentan zonas homólogas en sus extremos. El plásmido se recirculariza dentro de la levadura por recombinación *in vivo* (4) y obtenemos levaduras transformadas con versiones mutantes del gen de interés (5).

8.2 Mutagénesis dirigida.

La mutagénesis dirigida se realizó según una adaptación del protocolo descrito por Hemsley et al., (1989). Este método consiste en amplificar la secuencia completa de un plásmido portador del gen o fragmento que se pretende mutagenizar con dos oligonucleótidos divergentes, cuyos puntos de inicio están situados en posiciones nucleotídicas adyacentes, uno de los cuales contiene la mutación a introducir (Ver esquema en Figura 10).

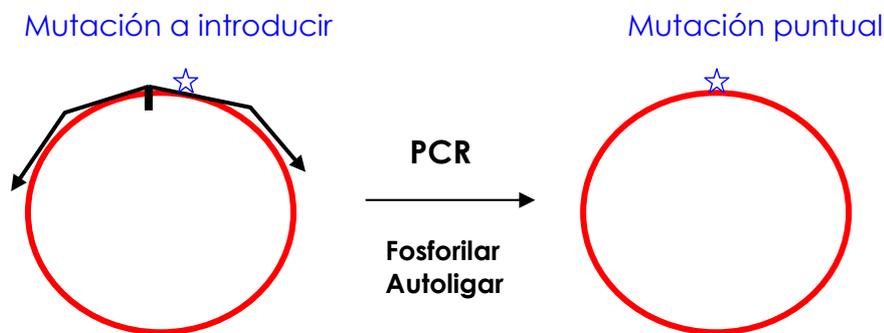


Figura 10. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida. La construcción a mutagenizar (Círculo rojo) se amplifica con dos oligonucleótidos adyacentes y divergentes (Flechas negras) uno de ellos se ha diseñado con la mutación a introducir (estrella azul). El plásmido circular se recupera tras fosforilar y autoligar el fragmento amplificado que contiene la mutación (Hemsley et al., 1989).

La amplificación se realizó con una DNA polimerasa correctora (con *proof-reading*) (*Pfu*, Stratagene) que produce extremos romos. El DNA lineal recuperado como producto de la amplificación por PCR se fosforiló con polinucleótido quinasa (Roche), se autoligó mediante tratamiento con T4 DNA ligasa (Fermentas) para generar una versión circular del plásmido que lleva incorporada la mutación deseada, y se utilizó para transformar *E. coli*. La existencia de las mutaciones se verificó por secuenciación del DNA. Estas construcciones se clonaron posteriormente en vectores de expresión de levadura.

Resultados

1. EXPRESIÓN DEL GEN *STA1* EN *Saccharomyces cerevisiae* BAJO CONTROL DE UN PROMOTOR INDUCIBLE.

Mediante amplificación por PCR a partir de DNA genómico de la estirpe de *S. cerevisiae* SPX15-3D (Polaina y Wiggs, 1983), se clonó un fragmento de 2502pb que contenía la región codificante del gen *STA1* correspondiente a la glucoamilasa secretada por las estirpes amilolíticas de *S. cerevisiae* (var. *diastaticus*). En los extremos del fragmento amplificado se introdujeron sitios adecuados de restricción (*SacI* y *XbaI*), que permitieron situar el gen bajo control del promotor *CYCGAL*, en el vector de clonación pEMBLyex4 (Cesareni y Murray, 1987). Al plásmido resultante se le denominó pS2 (Figura 11). Este plásmido se utilizó para transformar diversas estirpes de *S. cerevisiae*, descritas en Materiales y Métodos (Tabla 3).

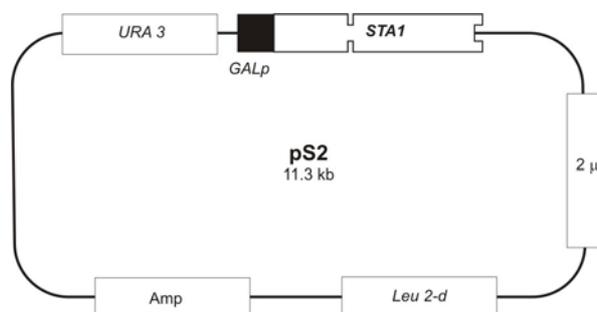


Figura 11. Representación esquemática del plásmido pS2. En la construcción pS2 se clonó el gen *STA1* en el vector pEMBLyex4 (Apartado 4.1.1).

Las colonias transformantes, seleccionadas como Ura⁺ o Leu⁺, se replicaron a un medio que contenía el agente inductor (galactosa) y almidón insoluble, y se comprobó la actividad amilolítica mediante la aparición de halos claros alrededor de las colonias por la hidrólisis del almidón. Todas las estirpes transformadas con el plásmido pS2, X180184C-11A [*STA1*]_n, IVPX2-1C [*STA1*]_n, Sc340 [*STA1*]_n, BY4741 [*STA1*]_n y

BY4741*mnn9* [*STA1*]_n (Tabla 3) presentaron actividad glucoamilasa. Las colonias no transformadas de las mismas estirpes (X180184C-11A, IVPX2-1C, Sc340, BY4741 y BY4741*mnn9*) se utilizaron como control negativo y no mostraron halo en ningún caso. Se utilizó la cepa SPX15-3D como control de actividad glucoamilasa.

Se realizaron medidas de actividad glucoamilasa en los sobrenadantes de cultivo de las cepas transformadas con la construcción pS2 tras su inducción con galactosa. La figura 12 muestra los valores de actividad obtenidos para cada estirpe. Cada valor representa la media de al menos tres determinaciones realizadas en experimentos independientes.

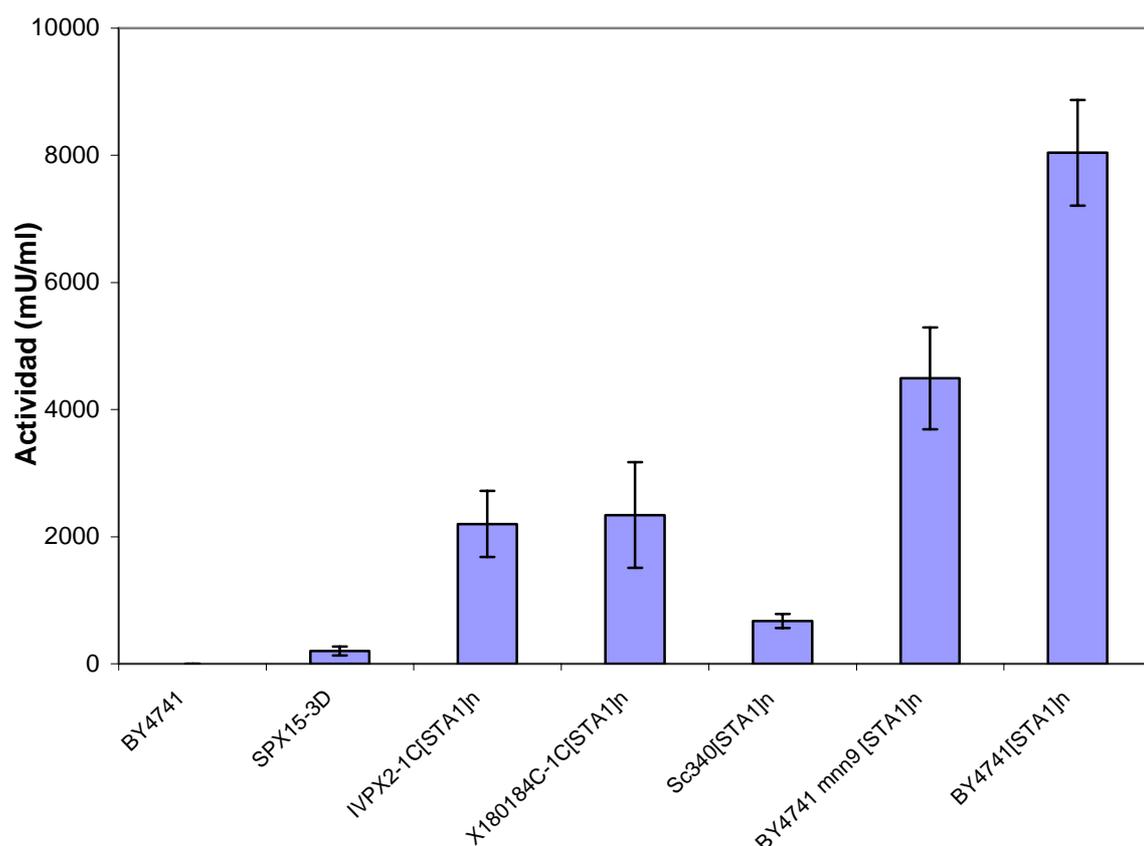


Figura 12. Actividad glucoamilasa obtenida en diversas estirpes de *S. cerevisiae* (Tabla 3) que han sido transformadas con el plásmido pS2 (Tabla 5). [*STA1*]_n indica que la levadura transformada posee el gen *STA1* en copia múltiple. Se utilizó la cepa BY4741 sin transformar como control negativo y la cepa SPX15-3D como control de actividad glucoamilasa.

La estirpe silvestre SPX15-3D (Polaina y Wiggs, 1983) posee una única copia cromosómica del gen *STA1*, como corresponde a la constitución genética de la var. *diastaticus*. Como control negativo se utilizó la estirpe BY4741 sin transformar. Las estirpes transformadas, portadoras del gen *STA1* bajo control del promotor inducible con galactosa CYCGALp, mostraron distintos niveles de actividad tras la adición del inductor (Figura 12).

La mayor actividad correspondió a BY4741[*STA1*]_n, una cepa de laboratorio, transformada con pS2. Las estirpes X180184C-11A, IVPX2-1C y Sc340 y BY4741 poseen igual fondo genético que la cepa silvestre estándar S288C.

La actividad glucoamilasa detectada en las estirpes estudiadas es un reflejo de los niveles de expresión del gen *STA1*, de forma que a mayor expresión del gen, mayor actividad glucoamilasa. Una de las causas de las diferencias de actividad observada en las distintas estirpes puede ser la saturación de los sistemas celulares responsables del transporte y de la secreción de la proteína una vez sintetizada (Mattanovich et al., 2004; Gasser y Mattanovich, 2007) o diferencias debidas a mutaciones genéticas puntuales entre las estirpes estudiadas.

La estirpe Sc340[*STA1*]_n presentó bajos niveles de actividad glucoamilasa pese a ser portadora de una construcción genética que potencia la expresión del gen *GAL4* y por tanto la síntesis de Gal4p. Esta proteína es poco abundante y en algunos casos limita la expresión de los genes que se encuentran regulados por los promotores *GAL* (Mylin et al., 1990; Johnston y Hopper, 1982). Con el aumento de la síntesis de Gal4p se intentó aumentar la expresión de *STA1* ya que en la construcción pS2 este gen se encuentra situado bajo control del promotor CYCGAL.

Los niveles de actividad de la levaduras X180184C-11A[*STA1*]_n e IVPX2-1C[*STA1*]_n fueron similares y mayores a los de la cepa silvestre,

SPX15-3D. El aumento de actividad respecto al silvestre es fácilmente explicable si tenemos en cuenta que estas estirpes presentan un mayor número de copias del gen *STA1* que la estirpe silvestre, por ser pS2 un plásmido multicopia. Una diferencia fundamental entre las estirpes X180184C-11A e IVPX2-1C es la presencia del gen *STA10*. Este gen se ha descrito como un represor transcripcional de la expresión del gen *STA1* en *S. cerevisiae* (Polaina y Wiggs, 1983). Los valores de actividad similares obtenidos en X180184C-11A[*STA1*]_n e IVPX2-1C[*STA1*]_n nos indican que *STA10* únicamente tiene influencia en la expresión del gen cuando *STA1* se encuentra regulado por su promotor natural.

También estudiamos el comportamiento de la estirpe BY4741 *mnn9*[*STA1*]_n, portadora de una mutación que impide la hiperglicosilación de proteínas para comprobar si este factor favorecía la producción del enzima. La cepa BY4741[*STA1*]_n fue la que produjo mayor cantidad de proteína y por tanto la que poseía mayor actividad glucoamilasa. Esto puede deberse a que la cepa BY4741 *mnn9* muestra un crecimiento poco vigoroso en medio rico (Deutschbauer et al., 2005), lo que descarta a BY4741 *mnn9* como una levadura apropiada para sobreproducir glucoamilasa.

BY4741 fue la estirpe seleccionada para realizar los estudios posteriores sobre glucoamilasa.

2. ESTUDIO DE LA REGIÓN AMINO TERMINAL DE LA SECUENCIA PRIMARIA DE LA GLUCOAMILASA DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Como se ha descrito previamente (Apartado 2 de introducción), los genes *STA1*, *STA2* y *STA3* codifican formas casi idénticas de glucoamilasa. Nosotros estudiamos el gen *STA1* como representante de la familia de genes *STA*.

La Figura 13 muestra la estructura primaria de la glucoamilasa (Sta1p), deducida de la secuencia nucleotídica del gen *STA1* (Yamashita et al., 1985b) con las correcciones introducidas por Henrissat et al., (1994). En la secuencia de la proteína pueden distinguirse tres regiones bien definidas: Una señal de secreción de proteínas extracelulares, una región en la zona amino terminal correspondiente a un dominio de la proteína madura rico en residuos de serina y treonina y una tercera región idéntica a la glucoamilasa de esporulación codificada por el gen *SGA1* que muestra gran similitud con los dominios catalíticos de las glucoamilasas de otros hongos (Vivier et al., 1997).

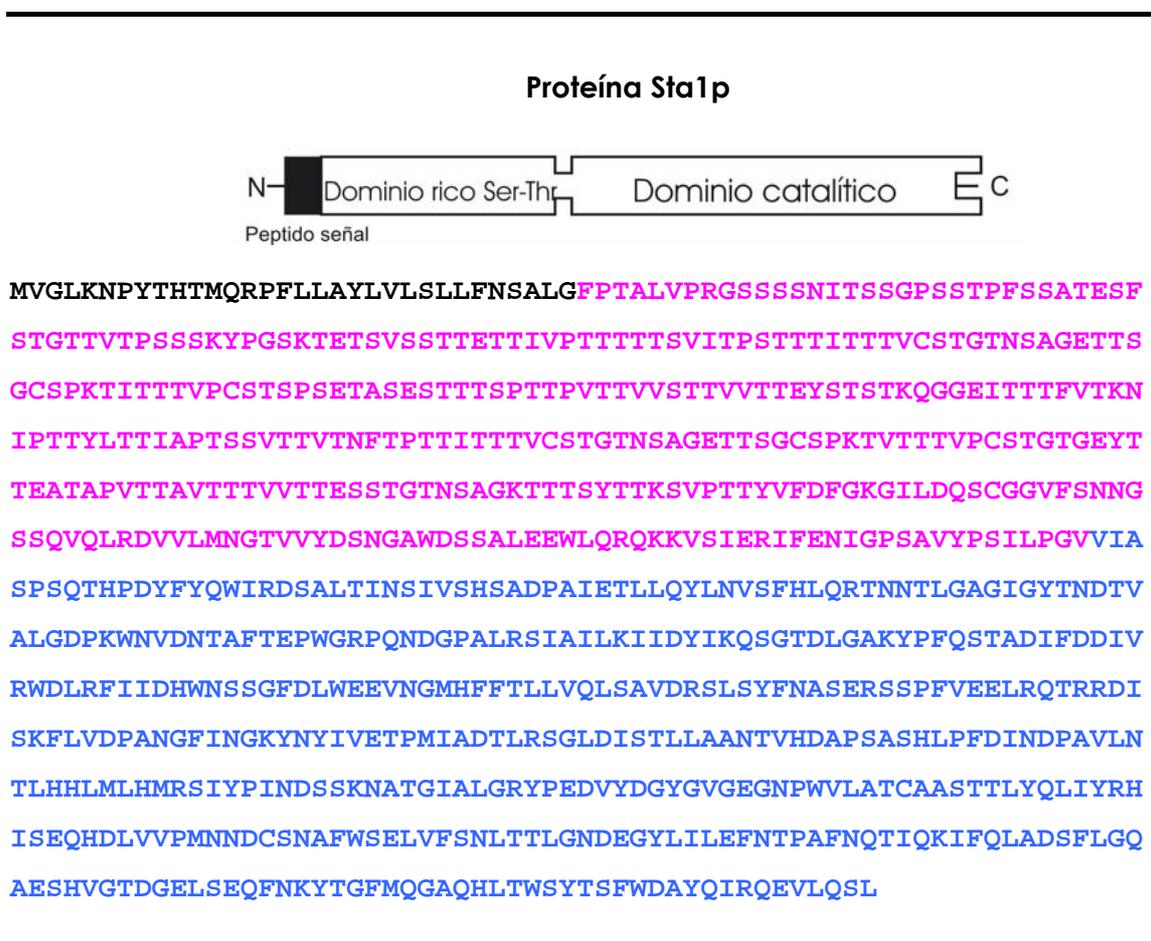


Figura 13. Representación esquemática de la estructura primaria de la glucoamilasa (Sta1p) de *S. cerevisiae*. La secuencia primaria de Sta1p muestra el péptido señal (negrita), la región rica en serina y treonina (rosa) y el dominio catalítico (azul).

La región rica en serina y treonina de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* es una región característica de la levadura que no se encuentra en otras glucoamilasas fúngicas. *S. cerevisiae* también presenta la singularidad, al igual que otras levaduras, de no poseer un dominio de unión a almidón presente en otras glucoamilasas y en muchas glicósido hidrolasas. El resto de glucoamilasas fúngicas poseen una región rica en serina y treonina pero con características estructurales y funcionales distintas. En concreto la GA de *Aspergillus niger*, poseen una región rica en residuos de Ser y Thr más pequeña y que está situada después del dominio catalítico, conectándolo con un dominio de unión al almidón que, como ya hemos comentado, no existe en el enzima de la levadura (Coutinho y Reilly, 1997; Sauer et al., 2000).

La presencia de la región rica en serina y treonina en la glucoamilasa de *S. cerevisiae* es una de las características diferenciales del enzima, para su estudio se realizó una búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos de Swiss-Prot (www.expasy.org/sprot). Se analizaron con detalle una selección de 80 secuencias con similitud significativa (Valores de E menores de e^{-10}). Este grupo incluye varios tipos de proteínas fúngicas secretadas (floculinas, aglutininas y enzimas extracelulares), mucinas animales de distinto origen y una proteína bacteriana (endoglucanasa de *Cellulomonas fimi*). Analizando la relación de esta zona de *STA1* con otros genes de levadura con los que presenta elevada homología (Tabla 7) se observa que las proteínas encontradas son extracelulares y su función no esta relacionada con la capacidad amilolítica. Algunas están relacionadas con los procesos de adhesión y floculación, otras poseen capacidad catalítica como la endoquitinasa y otras tienen funciones relacionadas con la biogénesis de la pared celular o con la división celular. Esto sugiere que el dominio rico en Ser y Thr de *S. cerevisiae* puede estar relacionado con la secreción o con procesos de interacción entre proteínas (Interacción

célula-célula, infectividad). Además, este dominio aporta numerosos sitios de O-glicosilación.

Gen	Alias	SwissProt id.	Actividad/ Función
<i>MUC1</i>	<i>FLO11, STA4</i>	P08640	Adhesión cel-cel
<i>FLO1</i>	<i>FLO2, FLO4</i>	P32768	Adhesión cel-cel
<i>FLO5</i>		P38894	Adhesión cel-cel
<i>FLO9</i>		P39712	Adhesión cel-cel
<i>WSC2</i>		P53832	Biogénesis pared celular
<i>WSC3</i>		Q12215	Biogénesis pared celular
<i>WSC4</i>	<i>YHC8</i>	P38739	Biogénesis pared celular
<i>SED1</i>		Q01589	Biogénesis pared celular
<i>KRE1</i>		P17260	Biogénesis pared celular
<i>AGA1</i>		P32323	Aglutinación-mating
<i>FIG2</i>		P25653	Adhesión-mating
<i>MSB2</i>		P32334	Osmorregulación
<i>PRY3</i>		P47033	Osmorregulación
<i>EGT2</i>		P42835	Endoglucanasa
<i>CTS1</i>		P29029	Quitinasa
<i>MID2</i>		P36027	División celular
<i>DAN4</i>		P47179	Posible proteína de pared

Tabla 7. Genes de *S. cerevisiae* con elevada homología ($E < e^{-10}$) con el dominio rico en serina y treonina de *STA1*.

Para comprobar si la región rica en serina y treonina es esencial para la estructura y función de *Sta1p*, construimos una forma modificada (que denominamos *Sta1dp*) carente de la mayor parte de esta región, en concreto se eliminó el fragmento de proteína comprendido entre los residuos Thr79 y Val289, ambos inclusive (Figura 14). Para realizar esta delección se diseñaron oligonucleótidos que la flanqueaban y se amplificó el resto del gen y la construcción pUCS2, tal y como se indica en materiales y métodos (Apartados 4.3 y 4.1.3).

Proteína Sta1dp



MVGLKNPYTHMQRPFLLAYLVLSLLFNSALG**FPTALVPRGSSSSNITSSG**PSSTPFSS
ATESFSTGTTVTPSSSKYPGSKTETSVSS [TTETTIVPTTTTTSVITPSTTTITTTVCSTGINS
AGETTSGCSPKTIITTVPCSTSPSETASESTTSPTTPVTTVVSTTVVTTEYSTSTKQGGEITTFVTKN
IPTTYLTTIAPTSSVTTVTFNFTPTTITTTVCSTGINSAGETTSGCSPKTVTTTVPCSTGTGEYTTEATAP
VTTAVTTTVVTESSTGINSAGKTTTSYTKSVPTTYV] **FD**FGK**GILDQSCGGVF**SNNGS**SQVQL**
RDVVL**MNGTVVYDS**NGAWDSSALEEWL**QRQ**KKV**S**IERIFENIGPSAVYPSILPGVVIAS
PSQTHPDYFYQWIRDSALTINSIVSHSADPAIETLLQYLNVSFHLQRTNNTLGAGIGYT
NDTVALGDPKWNVDNTAFTEPWGRPQNDGPALRSIALKIIDYIKQSGTDLGAKYPFQ**S**
TADIFDDIVRWDLRFIIDHWNSSGFDLWEEVNGMHFFTL**L**VQLSAVDRSLSYFNASERS
SPFVEELRQTRRDISKFLVDPANGFINGKYNIVETPMIADTLRSGLD**I**STLLAANTVH
DAPSASHLPFDINDPAVLNTLHHLMLHMRSIYPINDSSKNATGIALGRYPEDVYDGYGV
GEGNPWVLATCAASTTLYQLIYRHISEQHDLVVP**M**NDCSNAFWSELVFSNLTT**L**GNDE
GYLILEFNTPAFNQTIQKIFQLADSFLGQAESHVGT**D**GELSEQFNKYTGFMQGAQHL**TW**
SYTSFWDAYQIRQEV**LQ**SL

Figura 14. Esquema de la estructura primaria de Sta1p de *S. cerevisiae*. Se indica la región eliminada en Sta1dp [subrayada]: Péptido señal (negrita), región rica en serina y treonina (rosa) y dominio catalítico (azul).

El gen *STA1Δ* que codifica la versión delecionada de la glucoamilasa fue clonado en pEMBLyex4 (Apartado 4.3 de materiales y métodos). La construcción resultante denominada pS2Δ fue introducida por transformación en la estirpe BY4741. Como control se utilizó la estirpe BY4741[*STA1*]_n (Tabla 3). Ambos transformantes mostraron actividad amilolítica, manifestada por la presencia de halos de hidrólisis alrededor de las colonias en placas de medio con almidón (Figura 15).

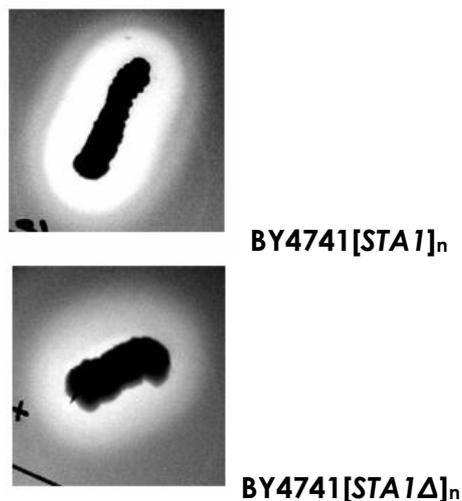


Figura 15. Halos de hidrólisis formados por las estirpes BY4741[*STA1*]_n que produce la glucoamilasa (*Stal*p) y BY4741[*STA1Δ*]_n productora de la glucoamilasa delecionada (*Stal*dp), creciendo en placas de medio rico con almidón.

La Figura 16 resume los resultados de la actividad glucoamilasa determinada en sobrenadantes de cultivos de levaduras tras la inducción (condiciones de crecimientos indicadas en el apartado 2.1.4). Estas estirpes eran portadoras, del gen *STA1* en plásmidos multicopia (estirpe BY4741[*STA1*]_n) o de su versión delecionada *STA1Δ* (estirpe BY4741[*STA1Δ*]_n). Ambos genes bajo control del promotor inducible *CYCGALp*, por lo que las estirpes comenzaron a sintetizar el enzima tras la adición del inductor, en este caso galactosa. La estirpe silvestre, SPX15-3D, con una copia de *STA1* en su genoma, mostró un nivel de actividad constitutivo, no afectado por la adición de galactosa. El control negativo (BY4741) no tuvo actividad glucoamilasa. Los valores de actividad producidos por la proteína *Stal*dp fueron inferiores a los obtenidos con el enzima completo. El hecho de que la versión delecionada presente actividad demuestra que la región rica en serina y treonina no es indispensable para la función catalítica del enzima.

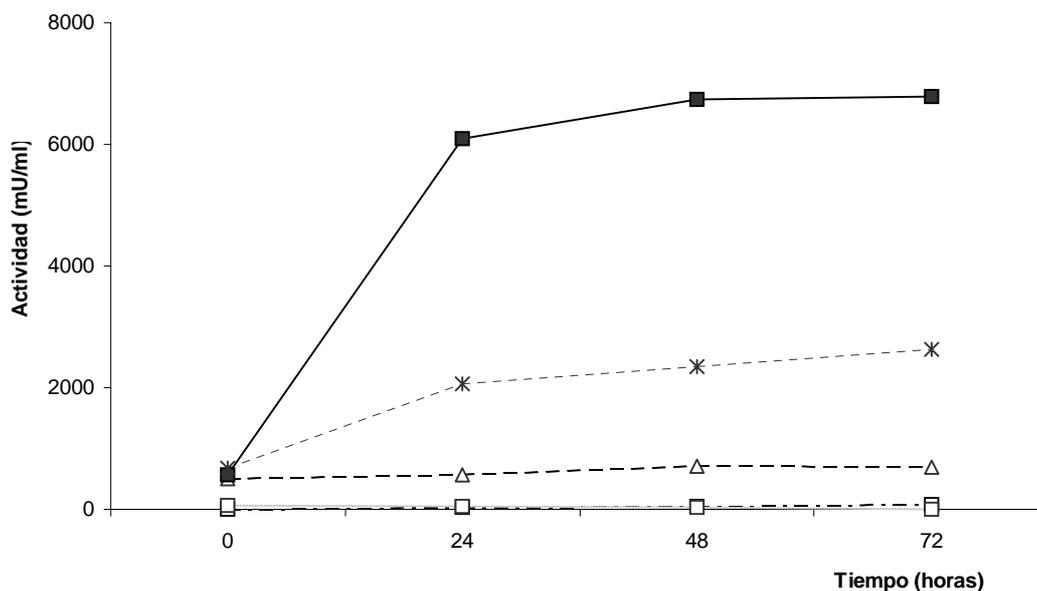


Figura 16. Medidas de la actividad GA en el sobrenadante de diferentes cultivos de *S. cerevisiae* (Tabla 3) tras la adición del inductor al medio.

- Ceba BY4741.
- Δ-- Ceba SPX15-3D.
- x-- Ceba BY4741 [STA1Δ]_n contiene el plásmido episómico pS2Δ (Tabla 5).
- Ceba BY4741 [STA1]_n contiene el plásmido episómico pS2 (Tabla 5).

3. CARACTERIZACIÓN DE LA GLUCOAMILASA DE *S. cerevisiae* (MASA MOLECULAR E HIPERGLICOSILACIÓN DEL ENZIMA).

Como ocurre con otros enzimas secretados por *S. cerevisiae*, la glucoamilasa nativa sufre un complejo proceso de glicosilación. Esta modificación consiste en una adición de carbohidratos (glicanos) que se produce durante o posteriormente al proceso de síntesis proteica. Aunque en la actualidad existen numerosos tipos de enlaces glicosídicos, los enlaces *N*- y *O*-glicosídicos son los más comunes.

En los procesos de *O*-glicosilación el carbohidrato se une a la cadena lateral de un residuo de serina o de treonina aunque no existe una secuencia consenso que defina cuales son los residuos puntos de

O-glicosilación. Los oligosacáridos unidos a la proteína tienen un tamaño que suele oscilar entre 1 y 20 azúcares.

En la *N*-glicosilación los glicanos se unen a la cadena lateral de un residuo de asparragina de la proteína. La secuencia consenso que dirige la *N*-glicosilación es un tripéptido Asn-Xaa-Ser/Thr, donde Xaa es cualquier aminoácido excepto prolina, a estos puntos de *N*-glicosilación se les denomina secuencias. Las cadenas de glicano pueden alcanzar un gran tamaño, hasta 200 residuos de azúcar, fundamentalmente manosa, este proceso recibe el nombre de hiperglicosilación (Munro, 2001; Mitra et al., 2006).

Para estudiar el tamaño de Sta1p utilizamos electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), ya que las técnicas cromatográficas usuales, como la filtración molecular, no son aplicables a proteínas hiperglicosiladas debido a la heterogeneidad de tamaños que presentan estas proteínas (Robertson y Kennedy, 1996; Kleinman et al., 1988).

La masa del enzima nativo mostró ser muy heterogénea con un valor medio de alrededor de 300 kDa (Figura 17, calle 3). Este dato contrasta con el tamaño teórico esperado para el polipéptido, calculándolo en base a su secuencia primaria, que es de 80 kDa. Este resultado implica un contenido en carbohidratos cercano al 80%, lo que coincide con estimaciones previas (Kleinman et al., 1988).

La glucoamilasa, pese a estar hiperglicosilada, se libera casi completamente al medio. Se encontraron niveles muy bajos de actividad asociada a células (<1%) lo que contrasta con otros enzimas muy glicosilados también secretados por levaduras, como la invertasa (Tammi et al., 1987).

La Figura 17 muestra un gel con la glucoamilasa producida por las estirpes BY4741 [STA1]_n y BY4741 *mnn9*[STA1]_n. La estirpe *mnn9* no produce hiperglicosilación por ser incapaz de elongar las cadenas de manosa.

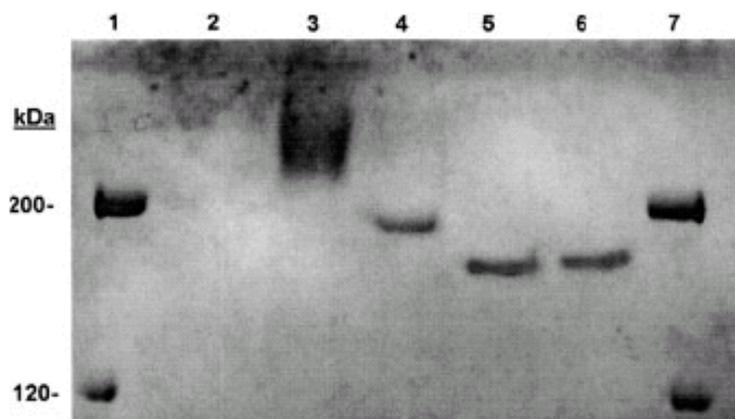


Figura 17. Análisis de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* en SDS-PAGE. Calles 1 y 7 Patrón de masas moleculares. Calle 2, Cepa BY4741; Calle 3, Cepa BY4741[*STA1*]_n; Calle 4, Cepa BY4741*mnn9*[*STA1*]_n; Calles 5 y 6, material analizado en 3 y 4, respectivamente, después de un tratamiento con el enzima endo-H (Apartado 6.3 de materiales y métodos).

La hiperglicosilación de la proteína da lugar a una banda dispersa de elevado peso molecular que contrasta con la banda discreta producida por la expresión del gen en la estirpe *mnn9*. La digestión de ambas formas del enzima con endo-H reduce su masa molecular hasta valores de unos 150 kDa, el doble de la masa teórica esperada para el polipéptido codificado por *STA1*. Que la masa del enzima no coincida con el valor esperado para la masa teórica puede ser debido a que la digestión con el enzima endo-H no haya sido completa o a la presencia de enlaces O-glicosídicos que incrementen el peso molecular del polipéptido.

Para comprobar la importancia de los enlaces O-glicosídicos en la glicosilación de la proteína se realizó sobre el sobrenadante de cultivo de la estirpe BY4741[*STA1*]_n un tratamiento con hidróxido sódico 100mM durante 30min a temperatura ambiente, con el fin de degradar este tipo de enlace. Pero el tratamiento no produjo una reducción apreciable de la masa de la proteína en SDS-PAGE (Figura 18).

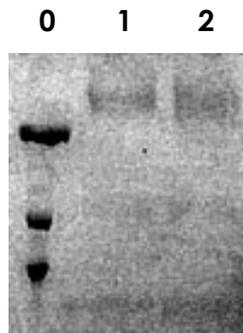


Figura 18. Análisis de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* en SDS-PAGE. Calles 0 Patrón de masas moleculares. Las calles 1 y 2 contienen muestras de glucoamilasa correspondientes a los cultivos de BY4741[*STA1*]_n; Calle 1. Sobrenadante sin tratar y calle 2. Sobrenadante con tratamiento con hidróxido sódico.

El proceso de hiperglicosilación de Sta1p podría afectar a la producción del enzima en condiciones de sobreexpresión de *STA1* en plásmido multicopia. La hiperglicosilación implica un importante gasto metabólico y supone una sobrecarga de la ruta de secreción de proteínas. Estos procesos podrían fácilmente verse colapsados en condiciones en las que se fuerce la síntesis y secreción de una proteína determinada (Mattanovich et al., 2004; Gasser y Mattanovich, 2007).

Para investigar esta hipótesis, comparamos la actividad amilolítica producida, en condiciones de expresión forzada de *STA1*, por la estirpe BY4741[*STA1*]_n y la estirpe isogénica BY4741*mnn9*[*STA1*]_n portadora de la mutación *mnn9* que impide la hiperglicosilación. Los resultados obtenidos fueron en cierto modo contradictorios. Al comparar la actividad amilolítica de ambas estirpes examinando los halos formados por colonias crecidas en medio sólido con almidón, parecía que BY4741*mnn9*[*STA1*]_n tenía más actividad que BY4741[*STA1*]_n, puesto que daba lugar a halos mayores y más claros (Figura 19).

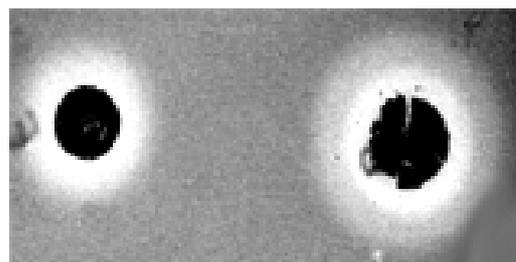
BY4741 [STA1]_nBY4741 *mnn9*[STA1]_n

Figura 19. Colonias de levaduras BY4741 [STA1]_n y su mutante isogénico BY4741*mnn9*[STA1]_n, deficiente en hiperglicosilación, creciendo en placas de medio rico con almidón y expresando la glucoamilasa (Sta1p).

Sin embargo, las medidas de actividad en el sobrenadante de cultivo de las mismas estirpes (Tabla 8) indicaron que la cepa BY4741 [STA1]_n tenía mayor actividad glucoamilasa en sobrenadante de cultivo. Una posible explicación a esta aparente paradoja es suponer que los halos mayores y más claros formados por el mutante *mnn9* pueden ser debidos a que la glucoamilasa producida tenga un menor peso molecular (como se observa en la figura 17, calle 3 y 4) y difunda mejor en el medio.

Cepa	Actividad glucoamilasa (mU/ml)
BY4741	4
SPX15-3D	285
BY4741 <i>mnn9</i> [STA1] _n	4920
BY4741 [STA1] _n	8050

Tabla 8. Actividad medida en el sobrenadante de cultivos de las estirpes de levadura indicadas (Tabla 3). Condiciones de cultivo indicada en el Apartado 2.1.4 de materiales y métodos. [STA1]_n hace referencia a la presencia del gen en copia múltiple. Cada valor de actividad representa la media de al menos tres determinaciones independientes.

Algunos trabajos han relacionado la glicosilación de enzimas con una mayor resistencia a la desnaturalización por agentes físicos y químicos (Mitra et al., 2006). Para comprobar este efecto en el caso de Sta1p, realizamos ensayos de estabilidad térmica tanto en la proteína nativa como en la versión no hiperglicosilada.

Se midió la actividad tras realizar un tratamiento a 65°C durante distintos tiempos de incubación a sobrenadantes de cultivo de las estirpes BY4741[*STA1*]_n y BY4741*mnn9*[*STA1*]_n (Figura 20). Con estos datos de actividad se calculó el porcentaje de actividad residual, tomando la actividad inicial del sobrenadante, como 100% de actividad. Como puede observarse, la hiperglicosilación no parece afectar a la estabilidad térmica de la proteína ya que ambas versiones muestran la misma cinética de inactivación.

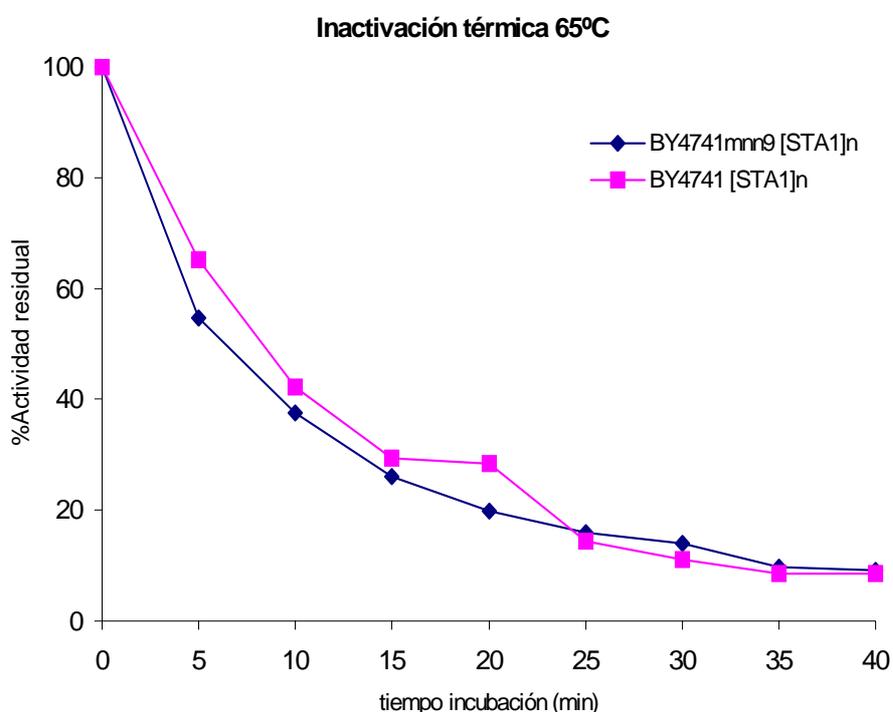


Figura 20. Porcentaje de actividad glucoamilasa residual obtenido tras la aplicación de un choque térmico al sobrenadante de cultivos de levadura, a 65°C durante el tiempo indicado.

4. MODELADO ESTRUCTURAL DE LA GLUCOAMILASA DE *S. cerevisiae*.

La estructura primaria de Sta1p muestra la existencia de dos dominios bien definidos, el dominio catalítico y el dominio rico en residuos de serina y treonina. Los resultados de la delección de la región rica en serina y treonina que da lugar a la variante del enzima Sta1dp (Apartado 2 de resultados), muestran que la presencia del dominio carboxi terminal, que engloba únicamente al dominio catalítico, es suficiente para que el enzima sea activo.

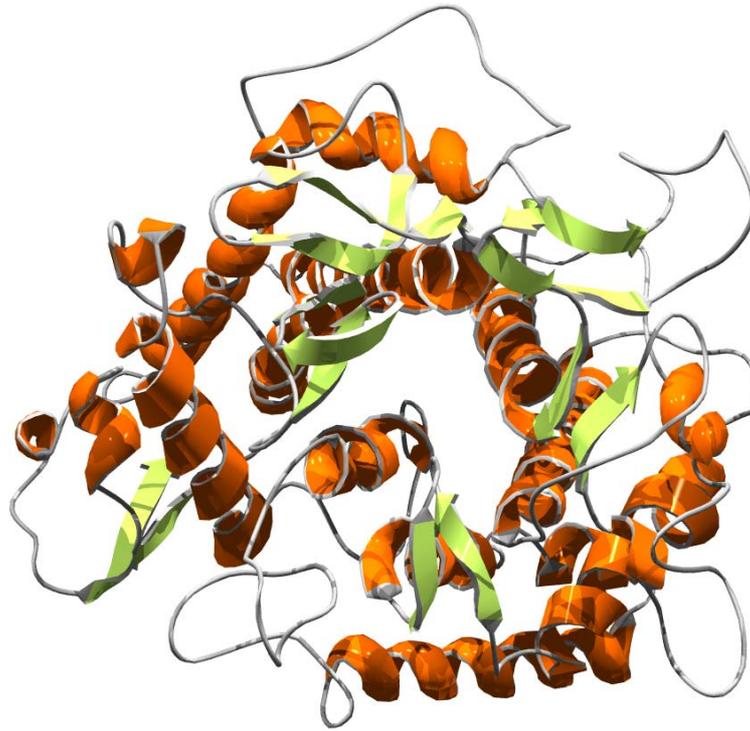
El modelo del dominio catalítico de la glucoamilasa de *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvo con ayuda de un servidor Swiss-Model (Guex y Peitsch, 1997; Guex et al., 1999). Este servidor genera modelos estructurales de proteínas en función de alineamientos de secuencia con otras proteínas de elevada homología y estructura conocida. En nuestro caso el alineamiento de secuencias se realizó entre Sta1dp y la glucoamilasa de *S. fibuligera*. La secuencia de Sta1dp es muy similar (alrededor de 40% de identidad) a la de la glucoamilasa de *Sacharomycopsis fibuligera*, cuya estructura tridimensional ha sido resuelta (Código PDB: 1AYX) (Sevcik et al., 1998).

El modelo obtenido para el dominio catalítico de Sta1p constituido, como en la mayoría de las glucoamilasas de la familia, por doce hélices alfa que forman un barril (α/α)₆. se muestra en la Figura 21.

También muestra el centro activo del enzima, que se encuentra localizado en el centro de la estructura de barril. Según se deduce de los datos existentes sobre la glucoamilasa de *S. fibuligera* y otros enzimas de la familia 15 de glicosilhidrolasas, E521 y E770 deben ser los residuos catalíticos ácido/base respectivamente.

Tras el modelado realizado por el servidor Swiss-Model (Guex y Peitsch, 1997; Guex et al., 1999) se estudió la exactitud y validez del modelo propuesto.

A



B

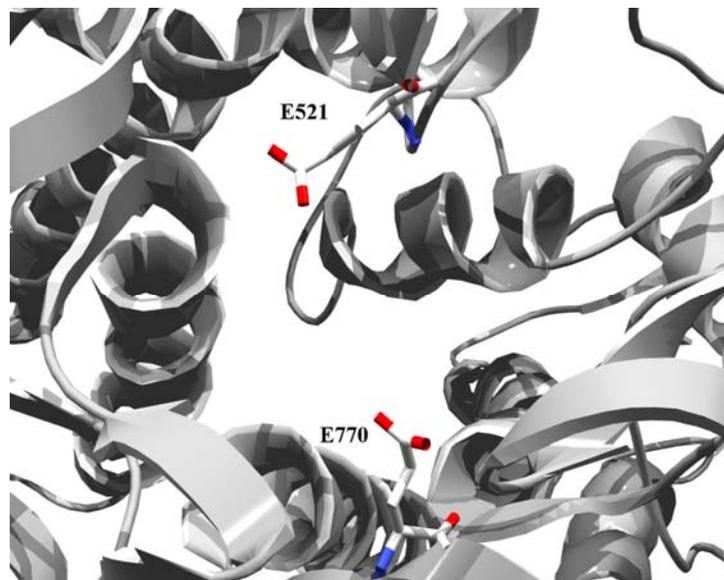


Figura 21. Modelo del dominio catalítico de Sta1p basado en la estructura de la glucoamilasa de *Saccharomycopsis fibuligera*. (A) Representación del barril (α/α)₆. (B) Detalle del centro activo formado por los residuos catalíticos E521 y E770.

La glucoamilasa de *S. cerevisiae* presenta un mecanismo de hidrólisis de inversión (Apartado 3.2 de introducción). La posición y distancia de los residuos catalíticos varía según el mecanismo de hidrólisis del enzima (Figura 4). En nuestro caso la situación de los residuos y la distancia entre ellos, de alrededor de 10Å, confirman la validez del modelo, ya que concuerdan con la configuración esperada para los residuos catalíticos de una glicosidasa que opera mediante un mecanismo de inversión (McCarter y Withers, 1994; Sauer et al., 2000).

Para el análisis estructural de la región N-terminal, rica en serina y treonina, utilizamos GenTHREADER (Jones, 1999a; McGuffin y Jones 2003). Este programa nos permitió identificar dos proteínas de estructura conocida que mostraban un significativo grado de similitud con el dominio rico en Ser y Thr de Sta1p. Las proteínas eran la invasina de *Yersinia pseudotuberculosis* (código PDB: 1CWV) y la intimina de *E. coli* (código PDB: 1F00). Estas proteínas están implicadas en el mecanismo de adhesión de bacterias patógenas a células humanas (Hamburger et al., 1999; Luo et al., 2000).

La Figura 22(A) muestra un modelo de la región N-terminal de Sta1p basada en la invasina de *Yersinia pseudotuberculosis*. La secuencia del dominio N-terminal de Sta1p y la de la invasina presentan 13% de residuos idénticos y cambios conservados que representan un 21% adicional. La estructura resultante está compuesta por una sucesión de cadenas beta que conforman tres barriles beta consecutivos. Las predicciones de la estructura secundaria usando tres métodos diferentes (Cuff y Barton, 2004; Jones, 1999b; Rost y Sander, 1994) concuerdan con el modelo.

Un hecho interesante es que cada uno de los tres barriles tienen una similitud apreciable con el dominio de unión al almidón de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (Sorimachi et al., 1996 y 1997) (Figura 22B), un resultado que no se podía anticipar comparando sus

secuencias de aminoácidos ya que no presentan homología significativa.

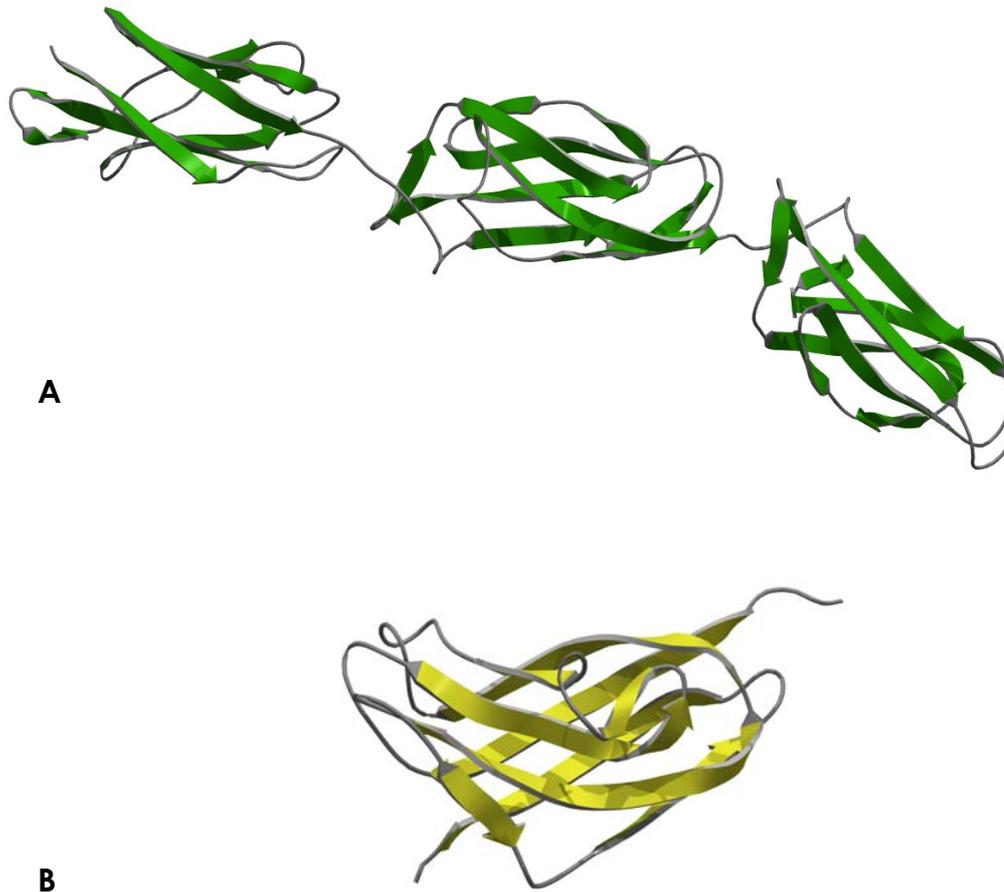


Figura 22. (A) Modelo de la región amino terminal (rica en Ser/Thr) de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* basada en la estructura de la invasina de *Yersinia pseudotuberculosis* (PDB: 1CWV). (B) Estructura del dominio de unión al almidón de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* determinada por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Sorimachi et al., 1996 y 1997).

La similitud estructural mencionada nos condujo a la hipótesis de que la zona amino terminal de Sta1p tuviera una función de unión al almidón ya que los dominios que presenta son similares a los β -sandwich, uno de los dominios más frecuentes entre los módulos de unión a carbohidratos (Apartado 3.3 de introducción).

Para comprobar esta idea se realizaron ensayos de unión al almidón con las versiones completa (Sta1p) y delecionada (Sta1dp) de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* comparando su comportamiento con el de la glucoamilasa de *A. niger* que posee un SBD funcional. Se determinó la actividad inicial en un cultivo que producía el enzima Sta1p o Sta1dp, tras realizar el ensayo de unión (Apartado 6.4 de materiales y métodos) y separar las fases, se determinó experimentalmente la actividad de la fase superior, que corresponde a la actividad del enzima que no se ha unido al almidón (libre) y por diferencia se calculó la actividad del enzima que se había unido al sustrato (Tabla 9).

Como se puede observar en la tabla ni la versión completa ni la delecionada se unen al almidón, mientras que la GA de *A. niger* sí tiene esa capacidad. Con estos resultados se pudo descartar la hipótesis de que la región rica en serina y treonina actuara como un dominio de unión a sustrato.

ENZIMA	Actividad inicial (mU/ml)	Actividad tras incubación con almidón insoluble y separación de fases	
		Actividad enzima libre (fase superior)	Actividad enzima unido (fase inferior)
<i>A. niger</i> GA	2060	1130	930 (45%)
<i>S. cerevisiae</i> Sta1p	10050	9850	200 (2%)
<i>S. cerevisiae</i> Sta1dp	3500	3380	120 (3%)

Tabla 9. Actividad glucoamilasa asociada al almidón insoluble. La actividad del enzima libre se corresponde con la fracción del enzima no unido al almidón y que ha quedado libre en la fase superior. La actividad del enzima unido se determina por diferencia entre la inicial y la actividad del enzima libre. Entre paréntesis se indica el porcentaje de actividad asociada a este sustrato. Cada valor de actividad representa la media de al menos tres determinaciones independientes.

5. CONSTRUCCIÓN DE UNA GLUCOAMILASA HÍBRIDA PORTADORA DE UN DOMINIO DE UNIÓN A ALMIDÓN.

El hecho de que la región rica en serina y treonina no actuara como un dominio de unión a substrato en la GA de *S. cerevisiae* dirigió los experimentos hacia la producción de un enzima dotado de un dominio que cumpliera esta función.

La adición de un dominio de unión a substrato a enzimas de interés biotecnológico se ha convertido en una aproximación utilizada con frecuencia para mejorar su eficiencia (Ohdan et al., 2000; Limon et al., 2001; Wernerus et al., 2001; Levy et al., 2004). Nosotros utilizamos este procedimiento con la glucoamilasa de *S. cerevisiae*. Para ello, amplificamos la región que codifica el SBD (*Starch binding domain*) de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* mediante PCR y el fragmento de DNA resultante se unió en fase con el gen *STA1* de *S. cerevisiae*, en el vector pEMBLyex4 (Apartado 4.4 de materiales y métodos).

El SBD se localiza, generalmente, en posición carboxi terminal y en algunos casos en posición amino terminal (Apartado 3.3 de la introducción), por lo que en nuestro experimento realizamos dos construcciones, esquematizadas en la Figura 23, introduciendo el SBD en ambos extremos de la proteína. A los plásmidos que contenían estas construcciones con el SBD en posición amino y carboxi terminal de la proteína, se les denominó pSS4 y pSS2, respectivamente (Tabla 5).

Seleccionamos colonias transformantes de *S. cerevisiae* con ambas construcciones en medio sin uracilo a las que denominamos BY4741 [*SBD_STA1*]_n y BY4741 [*STA1_SBD*]_n, según si el dominio de unión a substrato estuviera localizado en posición 5' o 3', respectivamente y comprobamos la capacidad amilolítica de estas estirpes observando la formación de los halos en placas con almidón (Figura 23).

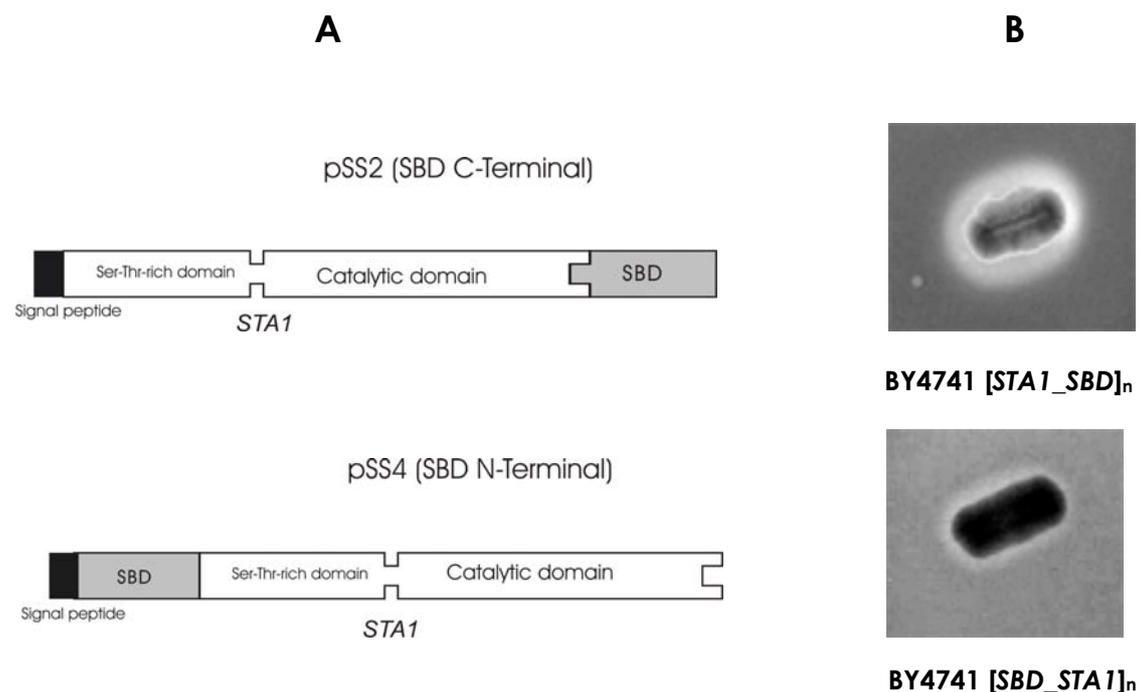


Figura 23. (A) Representación esquemática de los insertos de DNA presentes en las construcciones pSS2 y pSS4 (Apartado 4.4 de materiales y métodos). Estos insertos contienen el gen *STA1* de *S. cerevisiae* unido al fragmento que codifica el SBD de *A. niger* en posición carboxi terminal (pSS2) o amino terminal (pSS4) **(B)** Actividad amilolítica detectable en placa de Petri, en medio completo con almidón y galactosa, de las estirpes de levadura BY4741 [STA1_SBD]_n y BY4741 [SBD_STA1]_n expresando ambas construcciones.

El enzima producido por el plásmido pSS2 mostró actividad considerablemente superior a la producida por la construcción pSS4 (Figura 23B, determinación semicuantitativa de la actividad glucoamilasa). Para cuantificar la actividad glucoamilasa en sobrenadante de cultivo, se seleccionó la estirpe BY4741 [STA1_SBD]_n, que contiene la construcción pSS2, por tener más actividad en el ensayo semicuantitativo. Esta estirpe se cultivó según las condiciones indicadas en el apartado 2.1.4 de materiales y métodos para favorecer la producción de la proteína híbrida Sta1-SBDp.

La actividad glucoamilasa se determinó en dos ensayos independientes (Apartado 5.2 de materiales y métodos) utilizando almidón soluble o insoluble como sustrato ya que el enzima de

Saccharomyces no posee actividad catalítica apreciable frente al almidón insoluble. Los resultados de la Figura 24 muestran que los cultivos que expresan el enzima híbrido tienen una actividad menor que los de la cepa control BY4741[*STA1*]_n frente a almidón soluble, pero presentan actividad frente al substrato insoluble.

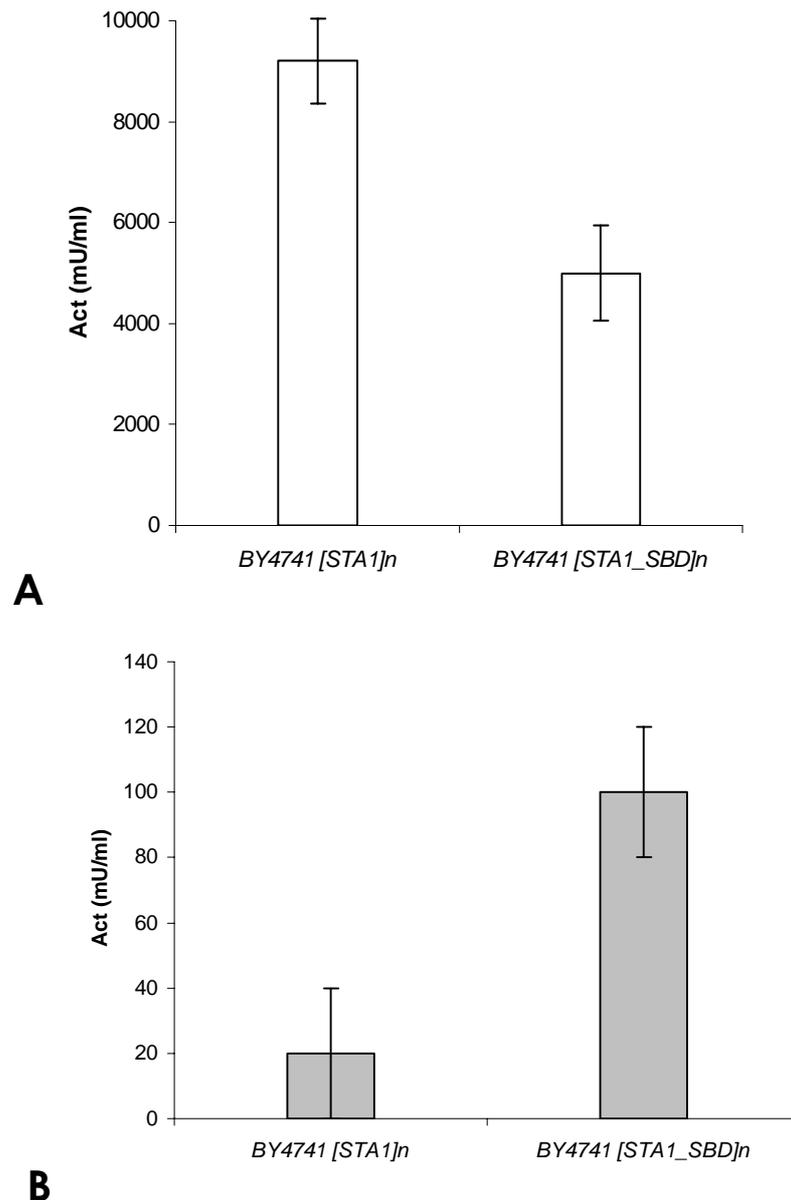


Figura 24. Actividad glucoamilasa producida por transformantes de *S. cerevisiae* (Cepas BY4741[*STA1*]_n y BY4741[*STA1_SBD*]_n). La actividad se determinó en sobrenadante de cultivo, tras 24 de inducción, usando como substrato almidón soluble **(A)** o almidón insoluble **(B)**.

Para comprobar que el dominio de unión al almidón presente en la glucoamilasa híbrida en posición carboxi terminal es funcional, determinamos experimentalmente la capacidad de unión al sustrato que poseía Sta1_SBDp. (Apartado 6.4 de materiales y métodos). Se utilizó la glucoamilasa de *A. niger* como control de enzima con capacidad de unión al almidón. Los resultados de la Figura 25 muestran que el enzima híbrido, en contraste con el enzima nativo de *S. cerevisiae*, tiene capacidad de unión a almidón, comparable a la de la glucoamilasa de *A. niger*.

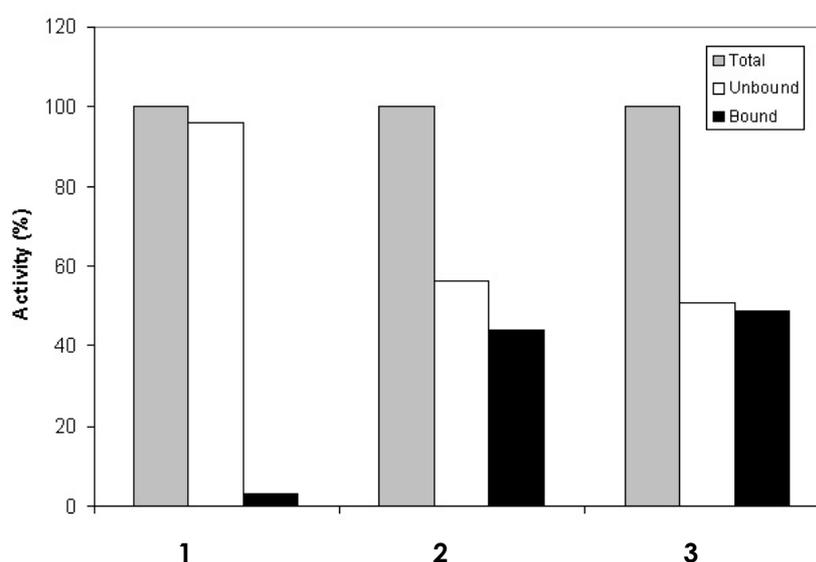


Figura 25. Porcentaje de actividad glucoamilasa obtenida en ensayos de unión a almidón insoluble para **(1)** la estirpe BY4741 [STA1]_n, **(2)** BY4741 [STA1_SBD]_n y **(3)** *A. niger*. La GA de la estirpe de *A. niger* se utiliza como control de unión al sustrato.

Para caracterizar las propiedades de la proteína híbrida Sta1_SBDp realizamos un gel proteínas en condiciones desnaturizantes (Apartado 6.1 de materiales y métodos).

Este gel (Figura 26) mostró que la masa molecular del enzima híbrido es ligeramente mayor que la de la GA nativa, lo que tiene sentido ya que se está sintetizando una proteína con un nuevo dominio que modifica la masa molecular total. El peso molecular aparente de la

GA híbrida, es mucho mayor que el correspondiente a su masa teórica, lo que indica que, al igual que la glucoamilasa nativa, está hiperglicosilada. Esto se confirmó tras un tratamiento con endo-H (Figura 26, calles B y D) ya que en ambos casos, GA y proteína híbrida muestran una disminución en su masa molecular, debido a la pérdida de parte del carbohidrato.

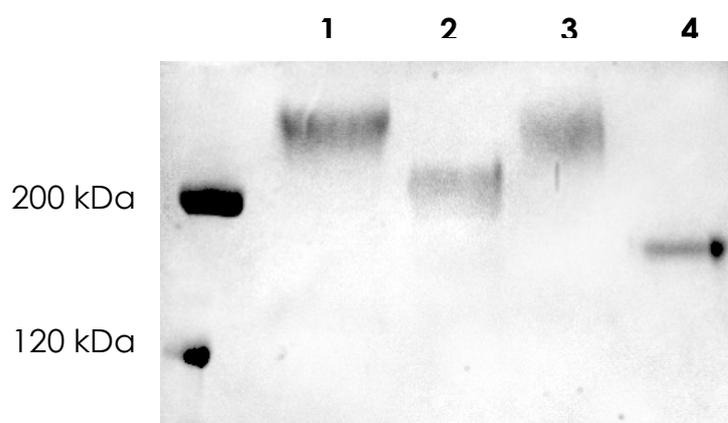


Figura 26. Análisis SDS-PAGE de preparaciones enzimáticas obtenidas de sobrenadantes de cultivos de *S. cerevisiae* que expresan la GA híbrida y nativa. Las calles 1 y 2 contienen muestras del enzima híbrido Sta1_SBDp. Las calles 3 y 4 contienen muestras del enzima nativo Sta1p. Las muestras de las calles 2 y 4 fueron tratadas con el enzima desglicosilante endo-H.

Para comprobar la naturaleza híbrida del enzima se realizó un análisis *Western* que confirmara que el enzima híbrido poseía ambos dominios (el catalítico y el SBD adicional) (Figura 27). Los resultados de este análisis mostraron que el enzima híbrido contiene dominios antigénicos reconocidos por anticuerpos policlonales específicos para las glucoamilasas de *S. cerevisiae* y de *A. niger*. Muestras de cada una de estas dos glucoamilasas ensayadas como control, fueron reconocidas únicamente por su anticuerpo específico.

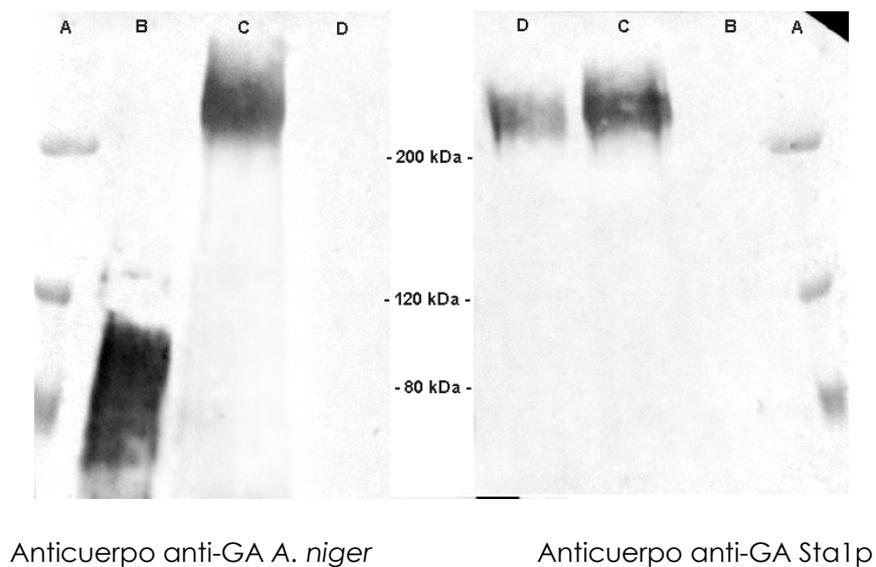


Figura 27. Análisis western blot de las glucoamilasas producidas por cultivos de *A. niger* y *S. cerevisiae*. Calle A, marcador de peso molecular. Calle B, glucoamilasa de *A. niger*. Calle C, glucoamilasa híbrida. Calle D, Glucoamilasa Sta1p de *S. cerevisiae*.

Los análisis de la proteína híbrida mostrados (SDS_PAGE y *Western blot*, Figuras 26 y 27) permiten deducir que los cultivos de *S. cerevisiae* que expresan la glucoamilasa híbrida producen menos enzima que los cultivos que expresan la versión nativa. La cantidad de proteína cargada en los geles se ajustó (de 2 a 4 veces más volumen de muestra para la proteína híbrida) para obtener bandas comparables. La actividad menor (Figura 24) respecto al substrato soluble detectada en Sta1_SBDp puede deberse a que esta versión se produce en menor cantidad.

Debido a que conocemos todos los componentes que conforman Sta1_SBDp se compuso un modelo de la estructura del enzima híbrido, que se presenta en la Figura 28 (Latorre-García et al., 2005). La proteína híbrida presenta tres dominios bien definidos. El dominio catalítico (rojo) y la región rica en serina y treonina (amarillo), corresponden a la glucoamilasa de *S. cerevisiae*, a los que se une en posición carboxi terminal el dominio de unión al almidón de la glucoamilasa de *A. niger* (azul) cuya estructura ha sido resuelta (Sorimachi et al., 1997).

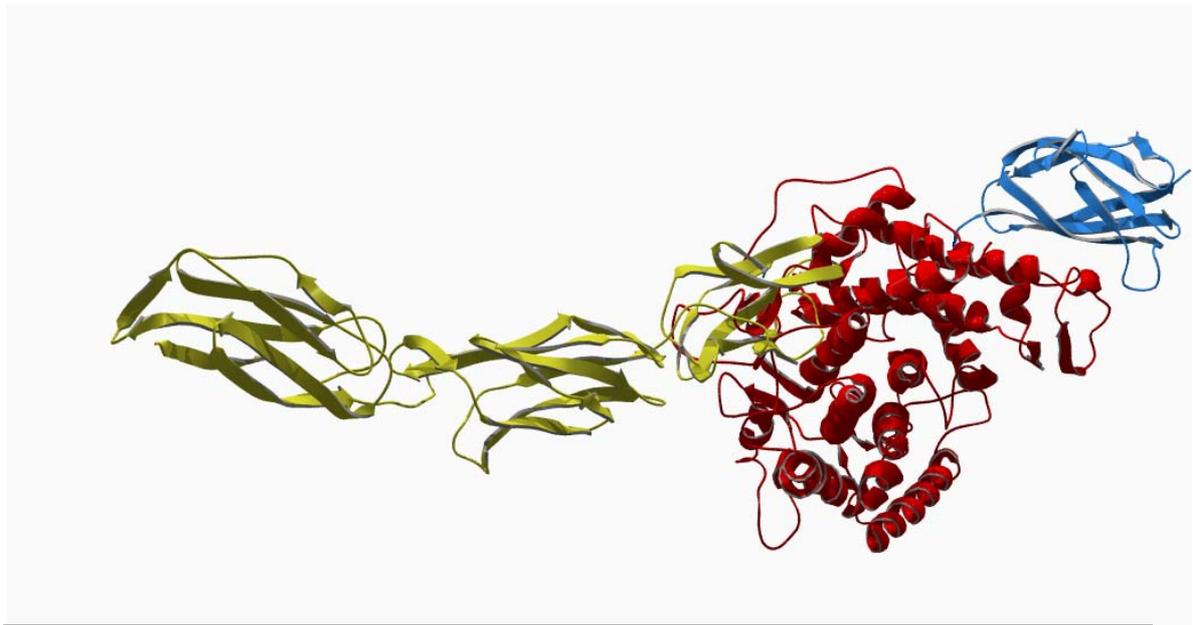


Figura 28. Modelo de la glucoamilasa híbrida Sta1_SBDp. El CD se representa en rojo, el STRD en amarillo, ambos de *S. cerevisiae*, y el SBD de *A. niger* en azul.

6. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD GLUCOAMILASA EN ESTIRPES DE *Saccharomyces* DE DISTINTO ORIGEN Y CONSTITUCIÓN GENÉTICA.

Con el objetivo de obtener estirpes de levaduras con elevada capacidad amilolítica, que permitieran su aplicación industrial posterior, se plantearon dos experimentos alternativos. Por un lado estudiamos estirpes industriales a las que aportamos capacidad amilolítica para combinarla con la elevada capacidad fermentativa que presentan estas estirpes. Y por otro lado generamos, por ingeniería genética de levaduras, estirpes con múltiples copias del gen *STA1* integradas en su genoma, en este caso el objetivo era obtener estirpes en las que la capacidad amilolítica no estuviese ligada a la presencia de presión selectiva en el medio de crecimiento.

6.1 Estudio de la actividad glucoamilasa en estirpes industriales de *S. cerevisiae*.

Una importante aplicación industrial de *S. cerevisiae* es la producción de etanol a partir de almidón. Esta transformación podría ser realizada eficazmente por una estirpe de levadura que posea una elevada capacidad fermentativa y produzca elevados niveles de actividad glucoamilasa. Para obtener una estirpe con estas características partimos de una selección de levaduras industriales (Tabla 3) a las que transformamos con el gen *STA1*. Las estirpes industriales poseen una reconocida eficiencia fermentativa por lo que dotarlas de capacidad amilolítica mejoraría sus aplicaciones industriales.

La transformación de levaduras industriales presenta dos dificultades reseñables. Por una parte, se trata de estirpes difícilmente transformables, en general; por otra parte, son diploides, aneuploides o poliploides y protótrofos por lo que para la selección de clones transformantes es necesario el empleo de marcadores genéticos dominantes.

Para la introducción del gen *STA1* en cepas industriales construimos el plásmido, pKS2 (Figura 29), (Apartado 4.1.2 de materiales y métodos).

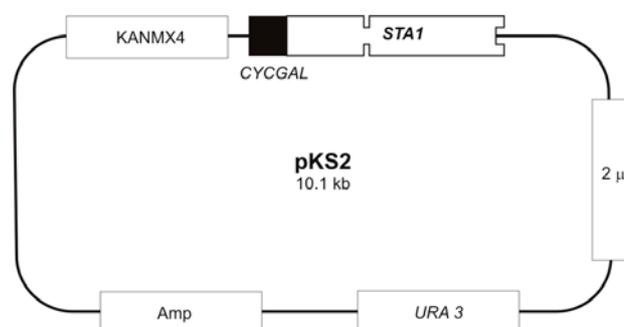


Figura 29. Representación esquemática del plásmido pKS2. En esta construcción se ha introducido el gen *STA1* en el plásmido p3003. Vector que tiene como marcador de selección un gen que confiere resistencia al antibiótico genético.

Utilizamos pKS2 para transformar las estirpes industriales de *Saccharomyces* que seleccionamos de diferentes colecciones de cultivos o de fuentes naturales. En estos experimentos incluimos como control de actividad glucoamilasa la estirpe de *S. cerevisiae* SPX15-3D. La tabla 10 muestra la eficiencia de transformación obtenida para cada estirpe y el fenotipo amilolítico de los transformantes, determinado por el tamaño de los halos de hidrólisis formados por las colonias transformantes en medio sólido con almidón. La tabla también muestra datos cuantitativos de actividad amilolítica (mU/ml), determinada únicamente para los transformantes que mostraron mayor actividad en el ensayo de actividad en placa.

Los resultados obtenidos muestran grandes diferencias en la expresión de *STA1* en las distintas estirpes ensayadas. Algunas estirpes, como por ejemplo las procedentes de vino de jerez y kéfir, no dan niveles de actividad detectable lo que puede deberse a que no están expresando o traduciendo correctamente el gen *STA1*. La estirpe industrial más activa (*S. pastorianus* NCYC519) mostró actividad muy superior a la cepa control SPX15-3D que contiene una copia del gen *STA1* en su genoma, lo que puede deberse a que en NCYC519 el gen se encuentra en múltiples copias.

Con este experimento, en la mayoría de los casos dotamos de actividad amilolítica a las estirpes industriales transformadas ya que los controles de estas estirpes sin transformar no producen halo en ningún caso. Las diferencias en los niveles de síntesis y secreción de glucoamilasa entre las levaduras industriales son probablemente debidas a la diferente constitución genética de las estirpes.

Estirpe de levadura	Origen	Transformabilidad		Fenotipo Sta	Actividad amilolítica (mU/ml)
		ufc/ μgDNA	(%)		
<i>S. cerevisiae</i>					
SPX15-3D	Polaina y Wiggs, 1983	-	-	+	150
FJF135[KAN STA1] _n	Vino de Jerez Benítez et al., 1983	0.3	(0.015)	-	0
FJF305[KAN STA1] _n	Vino de Jerez Benítez et al., 1983	40	(2)	+	nd
YKP1 [KAN STA1] _n	Kéfir	1	(0.05)	-	0
Y370[KAN STA1] _n	Pan	5	(0.25)	+	nd
<i>S. pastorianus</i>					
NCYC452[KAN STA1] _n	Cerveza	0.1	(0.005)	+	nd
NCYC512[KAN STA1] _n	Cerveza	2	(0.1)	+	nd
NCYC519[KAN STA1] _n	Cerveza	0.4	(0.02)	++	4000
NCYC520[KAN STA1] _n	Cerveza	0.1	(0.005)	+	nd
NCYC529[KAN STA1] _n	Cerveza	0.3	(0.015)	+	nd
NCYC719[KAN STA1] _n	Cerveza	0.7	(0.035)	++	500
NCYC985[KAN STA1] _n	Cerveza	1	(0.05)	+	nd
NCYC1295[KAN STA1] _n	Cerveza	0.1	(0.005)	+	nd
Y100 [KAN STA1] _n	Cerveza	14	(0.7)	+	nd
<i>S. bayanus</i> NCY1324 [KAN STA1] _n	Cepa laboratorio	0.5	(0.025)	+	nd
" <i>S. boulardii</i> " Y111 [KAN STA1] _n	Probiótico	1.5	(0.075)	++	1700

Tabla 10. Actividad amilolítica de estirpes de levaduras industriales transformadas con el plásmido pKS2 (Tabla 5 de materiales y métodos). Donde:

NCYC: National Collection of Yeasts Cultures, Norwich, UK.

[KAN STA1]_n indica que la estirpe contiene el gen *STA1* en copia múltiple y es resistente a geneticina. nd: no determinado. (-, +, ++), hace referencia a una actividad amilolítica nula, media y alta.

6.2 Análisis de estirpes poliploides de *S. cerevisiae* portadoras del gen *STA1* en copia múltiple.

Generalmente, las estirpes poliploides o aneuploides poseen propiedades ventajosas frente a las haploides, como son mejor crecimiento y mayor capacidad fermentativa (Marín et al., 2001). Las levaduras con propiedades idóneas para la producción de etanol deberían ser estirpes con elevada actividad amilolítica, estabilidad mitótica y crecimiento rápido; por ello, nos planteamos la obtención de estirpes poliploides que presentaran estas características.

Con objeto de obtener estirpes de levadura con capacidad amilolítica elevada y asegurar la estabilidad genotípica, se integró el gen *STA1* en el genoma de la levadura, mediante la transformación de la estirpe BY4741 con el plásmido pSI2 (Apartado 4.2 de materiales y métodos).

El plásmido pSI2 (Figura 30) contiene el gen *STA1* bajo control del promotor *CYCGALp* y un fragmento de DNA ribosómico de *S. cerevisiae* que dirige la integración en copia múltiple de *STA1* en el genoma de la estirpe receptora dirigida a las secuencias repetidas de DNA ribosómico del locus *RDN1* (Adam et al., 1995).

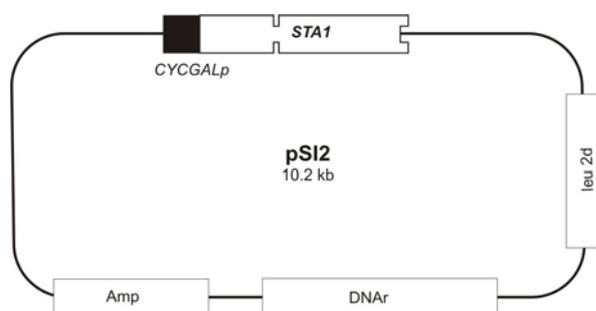


Figura 30. Representación esquemática del plásmido pSI2. En esta construcción se ha clonado *STA1* en el vector pAA11 que permite la integración del gen en las secuencias repetidas del DNA ribosómico del genoma de la levadura transformada.

Utilizamos el plásmido pSI2 para transformar la estirpe BY4741 y seleccionamos uno de los transformantes que presentaba mayor actividad amilolítica en el ensayo de actividad semicuantitativa. A la estirpe seleccionada, que presuntamente contenía el gen *STA1* en copia múltiple integrado en el locus *RDN1* de DNA ribosómico, se les denominó Y453 (Tabla 3).

Por otro lado se obtuvo la estirpe Y427 por cruzamiento de las estirpes IVPX2-1C ($MAT\alpha$) y Sc340 ($MATa$) y análisis de tétradas tras esporulación del diploide. Y427 es una estirpe con tipo sexual α que contiene el casete de expresión de Gal4p, construcción que aumenta la expresión del inductor Gal4p y por tanto de los genes regulados por el promotor inducible por galactosa (Mylin et al., 1990; Johnston y Hopper, 1982).

La estirpe Y453 ($MATa$) se cruzó con Y427 ($MAT\alpha$) para generar diploides que contuvieran el casete de expresión de Gal4p y el gen *STA1* integrado, con el promotor inducible, en copia múltiple. Al diploide que presentó mayor capacidad amilolítica en placa de Petri con almidón, se le denominó Y455.

Este diploide fue esporulado (Apartado 2.3.2 de materiales y métodos) y tras la disección de tétradas y el análisis de las levaduras producidas, se seleccionaron diferentes estirpes haploides que presentaban elevada capacidad hidrolítica, entre ellas las estirpes Y456 e Y457. Estas estirpes también presentaba integración multicopia del gen *STA1* y el casete de expresión de Gal4p.

Se realizaron todos los cruzamientos posibles entre los haploides de diferente tipo sexual y se seleccionaron de nuevo de los diploides que producían mayor halo (en concreto Y459). Este diploide fue sometido a tratamiento con luz ultravioleta y posteriormente se analizó su tipo sexual para seleccionar los diploides homocigóticos para el tipo sexual, se seleccionaron las cepas Y466 ($MATa/MATa$) e Y468 ($MAT\alpha/MAT\alpha$) que presentaban también gran capacidad amilolítica en YPD con almidón y galactosa.

A partir del cruzamiento de los diploides (Y466 e Y468) se generaron diversos tetraploides entre los que se seleccionó Y469 como el de mayor actividad glucoamilasa en placa.

En todas las estirpes generadas se comprobó la presencia del casete de expresión de Gal4p por dos métodos, por un lado amplificando un fragmento del casete mediante PCR utilizando los oligonucleótidos LL407 y LL408 (Tabla 6) y por otro lado, de forma funcional, cultivando las estirpes e induciendo la expresión del gen *STA1* mediante la adición de galactosa. Ambas metodologías demostraron que las estirpes habían integrado el gen *STA1* correctamente y poseían el casete de expresión del gen *GAL4*.

La tabla 11 muestra los valores de actividad glucoamilasa en sobrenadante de cultivo inducidos de las distintas estirpes (Apartado 2.1.5 de materiales y métodos).

Estirpes de levadura	Mating Type	Casete <i>GAL10pGAL4</i>	Ploidía	Genotipo <i>STA</i>	Actividad mU/ml
SPX15-30D	MAT α	NO	n	<i>STA1</i>	180 \pm 50
Y427	MAT α	SI	n	Sta ⁰	0
Y453	MAT α	NO	n	[<i>STA1</i>] _n	2000 \pm 500
Y455	MAT α /MAT α	SI	2n	[<i>STA1</i>] _n	3300 \pm 900
Y456	MAT α	SI	n	[<i>STA1</i>] _n	3900 \pm 1000
Y457	MAT α	SI	n	[<i>STA1</i>] _n	3000 \pm 700
Y459	MAT α /MAT α	SI	2n	[<i>STA1</i>] _n	7300 \pm 1200
Y466	MAT α /MAT α	SI	2n	[<i>STA1</i>] _n	8000 \pm 1800
Y468	MAT α /MAT α	SI	2n	[<i>STA1</i>] _n	6200 \pm 1600
Y469	MAT $\alpha\alpha$ /MAT $\alpha\alpha$	SI	4n	[<i>STA1</i>] _n	9400 \pm 2100

Tabla 11. Actividad glucoamilasa de estirpes con diferente ploidía. Todas las estirpes a excepción de SPX15-3D (Polaina y Wiggs, 1983) e Y453 poseen el casete de expresión de Gal4p. Todas las estirpes a excepción de Y427 poseen el gen *STA1* integrado en copia múltiple en su genoma. El genotipo completo de las estirpes se encuentra en la Tabla 3.

Todas las estirpes portadoras de integraciones múltiples del gen *STA1* mostraron niveles de actividad significativamente superiores a la

estirpe de referencia SPX15-3D (Polaina y Wiggs, 1983) portadora de una única copia de *STA1* en su cromosoma. Los diploides y tetraploides con la integración en copia múltiple y casete de expresión (Y459, Y466, Y468 e Y469) mostraron valores de actividad superiores a los de las estirpes haploides (Y453, Y456 e Y457) y presentaron una actividad comparable entre ellos. El hecho de que los tetraploides no aumenten significativamente su actividad respecto a los diploides puede ser debido a limitaciones en los procesos de secreción e hiperglicosilación del enzima. Para comprobar el grado de hiperglicosilación de las glucoamilasas producidas por las diversas estirpes se realizó un análisis *western blot* de las proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivos (Figura 31).

El tetraploide (Y469) produjo una glucoamilasa con masa molecular menor y más variable que el diploide (Y459) o la cepa salvaje (SPX15-3D), como muestra la banda más extensa que aparece para la glucoamilasa producida por Y469 en el análisis *western blot*.

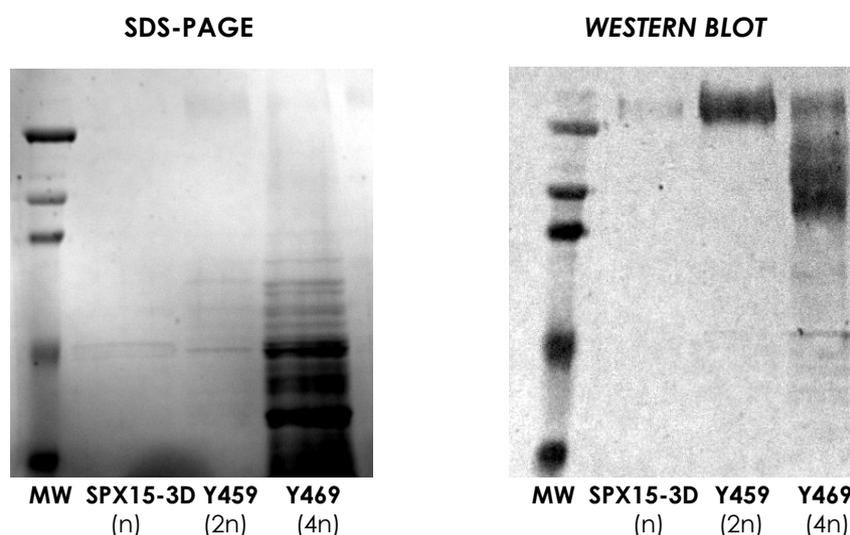


Figura 31. SDS-PAGE y *western blot* con anticuerpos frente a la GA de *S. cerevisiae* de las proteínas secretadas por estirpes de diferente ploidía. MW; *Molecular weight*, (n, 2n, 4n) ploidía de la estirpe indicada.

Este resultado puede deberse a que el enzima producido por Y469 está glicosilado solo en parte debido al colapso del proceso de

hiperglicosilación por sobreproducir la proteína. Los procesos de secreción también podrían verse afectados por el mismo motivo, lo que limitaría el uso de cepas poliploides en la sobreproducción de glucoamilasa.

7. MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE LA GLUCOAMILASA DE *S. cerevisiae* PARA MEJORAR SU ACTIVIDAD CATALÍTICA.

La mejora de la actividad catalítica de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* se realizó mediante la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida y aleatoria.

7.1 Mutagénesis dirigida.

El modelo estructural de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* (Figura 21) muestra que el dominio catalítico consiste en un barril $(\alpha/\alpha)_6$. Por similitud con las glucoamilasas de estructura tridimensional conocida, puede deducirse que los residuos catalíticos ácido y base son E521 y E770.

El dominio catalítico de las glucoamilasas de estructura resuelta contiene regiones desprovistas de estructura secundaria (denominadas bucles o *loops*), constituidas por segmentos cortos, muy conservados que conectan las hélices α , creando el sitio de unión del sustrato y favoreciendo el posicionamiento adecuado de los residuos catalíticos (Coutinho y Reilly, 1994b). Las diferencias en la longitud y composición de los *loops* se han relacionado con las diferencias de especificidad de enlace (α -1,4 o α -1,6) o de sustrato (polímeros u oligosacáridos) que presentan las diversas glucoamilasas fúngicas (Coutinho y Reilly, 1997).

En la mayoría de las glucoamilasas, la velocidad de hidrólisis de los enlaces α -1,4 es mayor que la de los enlaces α -1,6. Entre las glucoamilasas de actividad bien caracterizada, la del hongo *Hormoconis resiniae* es la que presenta mayor eficiencia catalítica frente

a enlaces glucosídicos α -1,6. Esta mejora de la capacidad desramificante se ha relacionado con las diferencias que presenta el enzima de *H. resinae* en los loops 3 y 5. Mediante mutagénesis dirigida de los residuos que se encuentran en estos loops se ha conseguido mejorar las propiedades de hidrólisis de los enlaces α -1,6 en la glucoamilasa de *Aspergillus*, confirmándose, por tanto, la importancia de los loops en la especificidad de enlace del enzima (Fierobe et al., 1996).

Siguiendo una aproximación similar, hemos modificado los residuos de las regiones de los loops 3 y 5 de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* por mutagénesis dirigida (Apartado 8.2 de materiales y métodos), con el objetivo de mimetizar la estructura de la GA de *H. resinae* y comprobar el posible efecto en la capacidad desramificante del enzima. La tabla 12 muestra las GAs mutantes obtenidas.

Glucoamilasas fúngicas

	Loop 3	Loop 5
<i>H. resinae</i>	DLWEETYASSFFT...//...AVGRYAEDVYMG.....GNPWYL	
<i>A. niger</i>	DLWEEVNGSSFFT...//...AVGRYPEDTYYN.....GNPWFL	
<i>S. cerevisiae</i>	DLWEEVNGMHFFT...//...ALGRYPEDVYDGYGVGEGNPWVL	

Versiones mutantes de glucoamilasa de *S. cerevisiae*

L3	DLWEETYASSFFT...//...ALGRYPEDVYDGYGVGEGNPWVL
L3L5	DLWEETYASSFFT...//...AVGRYAEDVYMGYGVGEGNPWVL
L5	AVGRYAEDVYMGYGVGEGNPWVL
LD5	AVGRYAEDVYMG.....GNPWVL

Tabla 12. Alineamientos de secuencia proteica de las regiones de los loop3 y loop5 de las GA de *H. resinae*, *A. niger* y *S. cerevisiae*. Versiones mutantes de *STA1* obtenidas por mutagénesis dirigidas (denominadas L3, L3L5, L5 y LD5).

En los mutante L3 y L5 se modificaron los *loops* 3 o 5 por separado, realizando los cambios en base a la secuencia de la GA de *H. resiniae*, el mutante L3L5 combina los dos grupos de cambios y en el mutante LD5 se modificó el *loop*5 eliminando una región no conservada de cinco aminoácidos que está presente en *S. cerevisiae*.

Los oligonucleótidos utilizados para realizar cada mutación se indican en la tabla 6. La comprobación de los cambios introducidos se realizó por secuenciación de la región del *loop*3 (oligonucleótido LL458) y del *loop*5 (oligonucleótido LL460).

Las GAs mutantes se clonaron en el vector de expresión de levadura pYES2. Y las construcciones obtenidas se transformaron en la estirpe BY4741. La selección de mutantes con actividad glucoamilasa se realizó en base al diámetro de los halos producidos por las colonias transformantes de levadura, sembradas en placas de Petri con almidón insoluble al 1% o con pululano al 1%.

Ninguno de los transformantes mostró una mejora en la actividad desramificante (ensayada con pululano como sustrato). Además, la mayoría perdían su actividad para degradar enlaces α -1,4. El estudio del modelo de la estructura tridimensional del enzima puede explicar, en parte, este descenso en la actividad glucoamilasa.

El modelo (Figura 21) muestra la complejidad estructural que presenta el dominio catalítico de la GA. Esta complejidad dificulta enormemente la modificación de la especificidad del enzima frente a un tipo concreto de enlace glicosídico, por introducción de mutaciones en los *loops*. En concreto el *loop*3 se encuentra muy próximo al residuo catalítico E521 y cualquier modificación en este entorno es previsible que afecte la configuración del sitio catalítico. Por otro lado, las modificaciones en el *loop*5 no se prevé que afecten de forma tan drástica al residuo catalítico, por lo que podría esperarse el mantenimiento de la actividad α -1,4 y una mejora de la eficiencia frente a los enlaces α -1,6. Sin embargo, los ensayos del mutante L5 no mostraron actividad de ningún tipo.

Para explicar estos resultados se analizó un modelo estructural de la región que engloba el *loop* 5. En esta región de la GA de *S. cerevisiae* se encuentra presente un segmento de 5 residuos, no presente en otras glucoamilasas de la familia, que puede estorbar el acceso del sustrato al centro catalítico y dificultar, por tanto, la hidrólisis de los enlaces α -1,6 (Figura 32). Basándonos en esta observación, diseñamos una variante del enzima con una delección de los cinco residuos presentes en *S. cerevisiae* acompañada de los cambios puntuales en el *loop*5 conforme a la secuencia de *H. resinae*. Este mutante (LD5) mostró actividad α -1,4 reducida pero no actividad desramificante.

La falta de éxito de la aproximación descrita, tanto en la región del *loop*3 como del *loop*5, probablemente es debida a la dificultad de introducir cambios en residuos próximos al centro catalítico sin causar modificaciones no deseadas que afecten a la actividad, modificaciones difícilmente predecibles en base al modelo estructural.

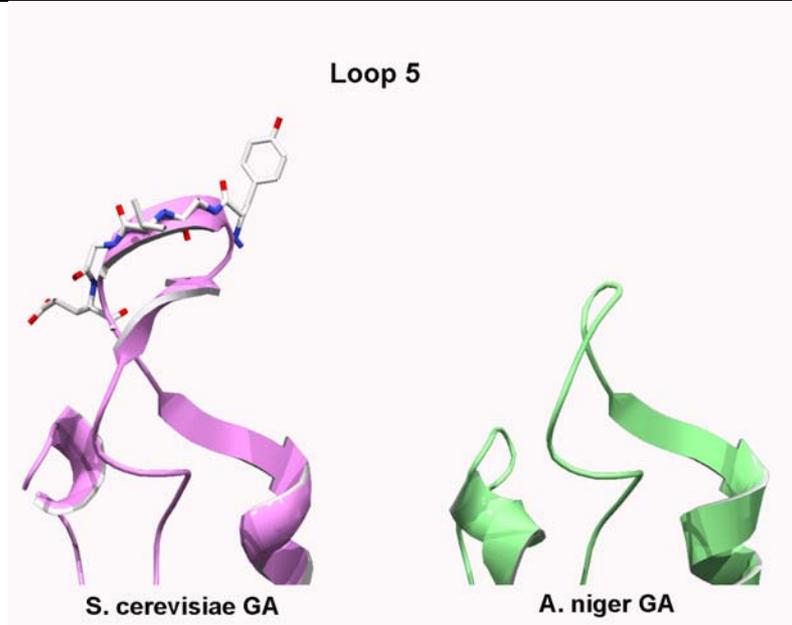


Figura 32. Esquema comparativo de la región del *loop* 5 en las glucoamilasas de *S. cerevisiae* y *A. niger*.

7.2 Mutagénesis aleatoria.

El gen *STA1* y las distintas versiones modificadas por mutagénesis dirigida y por *error prone-PCR*, se sometieron a un proceso de *DNA-shuffling* (Apartado 8.1.1 y 8.1.2 de materiales y métodos).

Posteriormente se introdujeron por transformación en la levadura BY4147, junto con una forma linealizada del vector pYES2. Para ello, los productos a transformar (Vector lineal e insertos mutagenizados) se amplificaban con sus oligonucleótidos específicos (De LL481 a LL484, Tabla 6) de forma que ambos fragmentos presentaran una homología de unas 100pb en sus extremos. Ésta homología permite la recombinación directa en levadura y evita un paso intermedio de clonación en *E. coli*. En algunos casos, el paso por la bacteria, limita la generación de una biblioteca de mutantes representativa del *shuffling* por problemas en la ligación de los insertos en el vector de levaduras (Bulter y Alcalde, 2003).

Como control de actividad glucoamilasa se utilizó la estirpe BY4147[*GAL1p_STA1*]_n, estirpe transformada con la construcción pYS2 (Tabla 5). En el plásmido pYS2 el gen *STA1* sin modificar está clonado en el vector pYES2 y se encuentra regulado por el promotor del gen *GAL1* (Apartado 4.1.1 de materiales y métodos).

Se transformó la estirpe BY4147 con ambos fragmentos (vector e inserto) y se seleccionaron los transformantes en placas de medio mínimo sin uracilo. Estas placas se replicaron, con ayuda de un terciopelo, a placas de YPD con almidón insoluble y galactosa para detectar aquellos transformantes que presentaban actividad glucoamilasa (Figura 33). Se ensayaron aproximadamente unos 10.000 transformantes, obtenidos en 3 experimentos independientes de mutagénesis aleatoria.

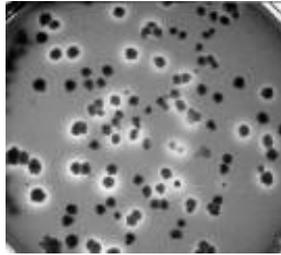


Figura 33. Halos de hidrólisis en placa con almidón insoluble de la estirpe BY4741 transformada y expresando versiones mutantes de la glucoamilasa.

Se seleccionaron aproximadamente 1.000 colonias que presentaban un halo más grande o más claro en placas con almidón insoluble. Tras el de cultivo de los clones (Apartado 2.1.6 de materiales y métodos) se ensayó la actividad glucoamilasa en sobrenadante de cultivo. De las mil colonias ensayadas solo una, el Clon24 (Cl24), presentó un incremento significativo de la actividad glucoamilasa en sobrenadante de cultivo.

Dado que con las técnicas de mutagénesis dirigida y el análisis del modelo no habíamos obtenido variantes del enzima más activos, secuenciamos el mutante de glucoamilasa generado por mutagénesis aleatoria, a la que denominamos Cl24p, para investigar qué cambios eran los que originaban el incremento de la actividad. Para secuenciar la versión mutante del gen *STA1* que producía Cl24p se utilizaron los oligonucleótidos PB161, AC271, AC272, AC329, AC357, AC358, LL330, LL458, LL461, LL462, LL477 (Tabla 6).

Los cambios en la secuencia nucleotídica de Cl24p se muestran en la tabla 13. En esta tabla aparecen listados los nucleótidos que han cambiado, las alteraciones que se producen tanto en el gen como en la proteína y la región donde se encuentra el cambio dentro de los dominios de la GA de *S. cerevisiae*.

Cambio en DNA (<i>STA1</i>)		Cambio en proteína (Glucoamilasa)	Localización
nt. 198	ACT__ACC	----	STRD
nt. 220	TCA__ACA	Ser 74 Thr	STRD
Δnt. 325 a nt. 646		ΔThr109 a Pro215	STRD
nt. 857	ACG__ATG	Thr 286 Met	STRD
nt. 909	TTT__TTC	----	STRD
nt.1023	AAC__AAT	----	STRD
nt.1061	CAG__CTG	Gln 354 Leu	STRD
nt.1530	GAT__GAC	----	CD
nt. 2247	CCT__CCC	----	CD

Tabla 13. Cambios introducidos en la versión mutante del gen *STA1*. La notación nt. n°, indica el nucleótido cambiado; Δ, indica una delección con ambos residuos incluidos; STRD (*Ser/Thr rich domain*) y CD (*Catalitic domain*) son los dominios de la glucoamilasa de *S. cerevisiae*.

La secuenciación mostró nueve cambios en la secuencia nucleotídica de la versión mutante del gen *STA1* aunque únicamente cuatro de ellos producen alteraciones en la proteína Cl24p con respecto a la glucoamilasa nativa. En el resto de los cambios, las alteraciones de la secuencia de nucleótidos no se traducen en la secuencia proteica.

La Figura 34 muestra los residuos reemplazados en la secuencia primaria de la glucoamilasa. Como puede observarse los cambios se han producido en la región rica en serina y treonina sin afectar en ningún caso al dominio catalítico.

MVGLKNPYTHTMQRPFLLAYLVLSLLFNSAL**GFPTALVPRGSSSSNITSSG**PS**STPFSS**
ATESFSTGTTVTPSSSKYPGSKTETS**VSSTTETTIVPTTTTT**SVIT**PST** [**TTITT**TVCST
GTNSAGETTSGCSPKTTTTVPCSTSPSETASESTTSPTTPVTTVSTTVV**TTEYSTSTKQGGEITTF**
VTKNIPTTYLTTIAPTSSVTTVTNFTP] **TTITT**TVCST**GTNSAGETTSGCSPKTVTTTVPCS**
TGTGEYTEATAPVTTAVTTT**VVTTES**ST**GTNSAGKTT**TSYTTK**SVPTTYVDFGK**GIL
DQSCGGVFSNNGSSQVQLRDVVLMNGTVVYDSNGAWDSSALEEWL**QRQK**VS**IERIFEN**
IGPSAVYPSILPGVVIASPSQTHPDYFYQWIRDSALTINSIVSHSADPAIETLLQYLN**V**
SFHLQRTNNTLGAGIGYTNDTVALGDPKWNVDNTAFTEPWGRPQNDGPALRSIAILKII
DYIKQSGTDLGAKYPFQSTADIFDDIVRWDLRFIIDHWNSSGFDLWEEVNGMHFFTLL**V**
QLSAVDRSLSYFNASERSSPFVEELRQTRRDISKFLVDPANGFINGKYNIVETPMIAD
TLRSGLDISTLLAANTVHDAPSASHLPFDINDPAVLNTLHHLMLHMRSIYPINDSSKNA
TGIALGRYPEDVDYDGYGVGEGNPWVLATCAASTTLYQLIYRHISEQHDLVVPMN**NDCSN**
AFWSELVFSNLTTLGNDEGYLILEFNTPAFNQTIQKIFQLADSFLGQAESHVGT**DGELS**
EQFNKYTGFMQGAQHL**TWSYTSFWDAYQIRQEVLQSL**

Figura 34. Estructura primaria de la glucoamilasa de *S. cerevisiae*. En negrita se señala el péptido señal; en rosa el dominio rico en serina y treonina; y en azul el dominio catalítico. Los cambios existentes en la forma mutante del enzima se indican en sombreado negro y son S74T, T286M y Q354L. La secuencia de 107 aminoácidos perdida, desde T109 hasta P215 ambos inclusive, se indica entre corchetes en negrita.

Los cambios Ser74Thr, Thr286Met y Gln354Leu parecen poco significativos porque se localizan en la superficie de la proteína, en una zona que no es previsible afecte de forma significativa a su estructura tridimensional.

El cambio más notable fue la delección de 107 aminoácidos producida al principio de la región rica en serina y treonina. Como se observa en la Figura 34 la delección generada por el proceso de *DNA shuffling* se ha visto favorecida por la existencia de secuencias repetidas en la secuencia de nucleótidos que permiten su apareamiento y la posterior amplificación durante el proceso de *shuffling*. En concreto, la presencia de una secuencia palindrómica, TTITT que aparece en la zona adyacente a la delección ha favorecido la generación de esta versión.

Este cambio como se observa en el modelo (Figura 35) elimina uno de los tres barriles beta que forman la región rica en serina y treonina, en concreto el primero, y altera la estructura secundaria del segundo.

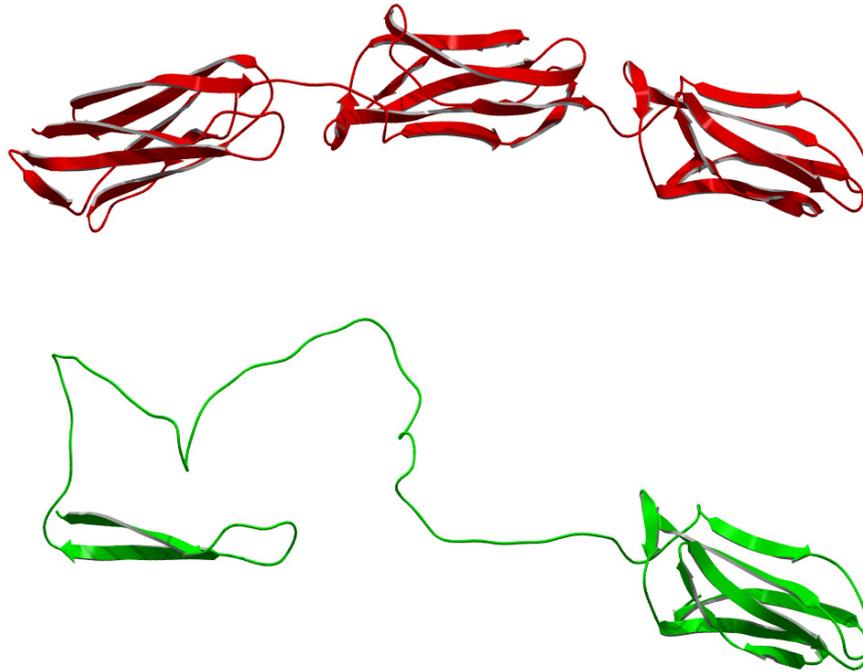


Figura 35. Modelo de la región amino terminal (rica en Ser/Thr) de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* (rojo) y de la versión mutante Cl24p (verde).

Dado que la versión mutante (Cl24p) presenta mayor actividad que la cepa silvestre y el cambio más notable que se produce en ella es la presencia de una deleción, podemos comparar esta versión con la versión Sta1dp (descrita en el apartado 2 de Resultados). La actividad del mutante Cl24p es superior a la actividad mostrada por el silvestre y por la versión Sta1dp cuya actividad es notablemente inferior (Tabla 14).

Versiones de la GA de <i>S. cerevisiae</i>	Enlaces que hidroliza	
	α -1,4 (mU/ml)	α -1,6 (mU/ml)
Sta1p	7500	10
Sta1dp	3500	3
Cl24p	14200	11

Tabla 14. Actividad de diferentes variantes de GA de *S. cerevisiae*. Se muestra la actividad frente a los enlaces α -1,4 y α -1,6.

En ninguna de las variantes de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* se ha obtenido una mejora de la actividad frente a enlaces α -1,6. Sin embargo, el proceso de mutagénesis aleatoria ha permitido obtener una versión más activa que el enzima nativo. El estudio estructural de Cl24p ha mostrado que la mayor actividad se debe a una mejora en la producción del enzima ya que la versión mutante no posee ninguna alteración de la proteína que afecte al dominio catalítico.

Sería necesario continuar con el proceso de mejora de Sta1p hasta obtener variantes con mayor eficiencia catalítica y posteriormente combinar esta estrategia con la utilización de estirpes superproductoras del mutante más activo.

Discusión

1. SOBREPDUCCIÓN DE GLUCOAMILASA ENDÓGENA EN *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1 Expresión del gen *STA1* en *Saccharomyces cerevisiae* bajo control de un promotor regulable.

La glucoamilasa codificada por *STA1*, un gen de la propia levadura, es sintetizada y secretada por *S. cerevisiae* de forma natural sin los problemas inherentes a la expresión de genes heterólogos. Con el objetivo de obtener cepas de levadura capaces de degradar y fermentar eficientemente el almidón, la sobreproducción del enzima endógeno era una alternativa viable a la expresión heteróloga de genes que codifican amilasas procedentes de otros microorganismos. Un estudio previo de distintas estirpes de laboratorio y de distintas construcciones genéticas en las que el gen *STA1* se expresó en plásmidos episómicos condujo a la selección de la estirpe BY4741[*STA1*]_n como mejor opción para la producción del enzima.

Las construcciones se realizaron bajo control de expresión de un promotor regulable por galactosa en plásmidos episómicos que mejoraron la producción de la glucoamilasa. Los promotores de los genes *GAL* son una buena opción cuando se quiere controlar eficientemente la producción de una proteína en levaduras (Johnston, 1987). En nuestro caso el promotor *CYCGAL* funcionó correctamente en todas las estirpes estudiadas. En el caso de Sc340[*STA1*]_n la producción de la glucoamilasa no mejoró, pesar de que esta estirpe produce la proteína inductora (Gal4p) (Mylin et al., 1990; Johnston y Hopper, 1982) que mejora la expresión de los genes regulados por los promotor *GAL10*. En nuestro caso la disminución de la actividad de Sc340[*STA1*]_n respecto a las otras estirpes no sobreproductoras de Gal4p puede deberse tanto a problemas en la traducción como a saturación en los procesos de secreción y transporte (Mattanovich et al., 2004; Gasser y Mattanovich, 2007).

1.2 Estudio de la actividad glucoamilasa en estirpes industriales de *S. cerevisiae*.

La obtención de estirpes industriales que expresen construcciones derivadas del gen *STA1* tiene interés biotecnológico porque permitiría el empleo de estas levaduras en la degradación del almidón y posterior fermentación de la glucosa generada.

Por este motivo transformamos una serie de estirpes industriales con plásmidos portadores del gen *STA1*. Para estas construcciones utilizamos como marcador de selección la resistencia a un antibiótico (geneticina), ya que la ausencia de otro tipo de marcador en las cepas industriales no permite el uso de los habitualmente utilizados para estirpes de laboratorio.

Las cepas de levaduras industriales presentaron una eficiencia de transformación mucho menor que las cepas de laboratorio aunque en algunos casos se han descrito alta eficiencia en la transformación de levaduras industriales (Guerra et al, 2006). La producción de la glucoamilasa por cepas industriales fue variable, pero entre las estirpes ensayadas obtuvimos algunos transformantes con elevada actividad glucoamilasa que podrían ser interesantes para ser utilizados la fermentación directa del almidón.

1.3 Análisis de estirpes poliploides de *S. cerevisiae* portadoras del gen *STA1* en copia múltiple.

Las estirpes transformadas con plásmidos episómicos requieren una presión selectiva para el mantenimiento del plásmido con el fin de evitar la pérdida del éste durante la división celular. Las estirpes productoras de glucoamilasa, transformadas con los plásmidos episómicos, se crecieron en medio mínimo carente de un requerimiento nutricional esencial para la levadura, requerimiento que fue suplementado por el marcador de selección del plásmido.

Una aproximación alternativa que asegura elevados niveles de expresión, sin riesgo de pérdida del gen por inestabilidad mitótica, es la integración del gen en el DNA genómico de la estirpe hospedadora. Además para conseguir niveles elevados de expresión es útil lograr la integración del gen en múltiples copias, con este fin se dirige el gen de interés a secuencias repetidas del genoma de la levadura.

En nuestro caso se obtuvieron estirpes de levaduras con el gen *STA1* integrado en su genoma utilizando las secuencias repetidas del DNA ribosómico (Adam et al., 1995). Para mejorar todavía más la producción enzimática las estirpes se cruzaron con estirpes que poseían el sistema de control del promotor de *GAL10* bajo el que se encontraba regulado el gen *STA1* y se aumentó el número de copias del gen integrado obteniendo levaduras diploides y tetraploides. Las estirpes obtenidas mejoraron la producción de enzima en comparación con la estirpe haploide, ya que poseían una actividad superior, pero el aumento de la actividad no creció en proporción a la ploidía. Esto puede deberse a que si el sistema de control del promotor *GAL10* funciona bien se están produciendo elevados niveles de expresión génica que pueden provocar una saturación de los sistemas de traducción, secreción y, en el caso de la glucoamilasa, de glicosilación de la levadura, sobre todo en el caso de las estirpes tetraploides (Vanoni et al 1989; Mattanovich et al., 2004; Gasser y Mattanovich, 2007).

Adam et al., (1995) construyeron estirpes con genes integrados en copia múltiple y a la vez sobreproductoras de la proteína inductora Gal4p, componente esencial del sistema de control del promotor *GAL10* y en el caso de estirpes de elevada ploidía estas características producían la lisis celular. En nuestro estudio las estirpes diploides y tetraploides presentaron mayor actividad por volumen de cultivo que las haploides y la expresión de Gal4p favoreció la sobreproducción del enzima hasta niveles elevados pero que no colapsen otros sistemas celulares.

2. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA GLUCOAMILASA DE *Saccharomyces cerevisiae*.

El análisis de la secuencia de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* pone de manifiesto distintas propiedades del enzima y revela su relación evolutiva con otras proteínas (Yamashita et al., 1985a, Yamashita et al., 1987). La versión delecionada de la glucoamilasa demuestra la existencia de dos dominios estructural y funcionalmente diferentes: Un dominio catalítico que comprende aproximadamente la mitad carboxi terminal de la proteína y otro dominio, situado a continuación del péptido señal, rico en residuos de serina y treonina que presenta una secuencia homóloga a la de la proteína codificada por el gen *FLO11/MUC1* de *S. cerevisiae*.

La existencia de enzimas con estructura tridimensional resuelta que presentan elevada similitud con las proteínas de interés permite la obtención de modelos estructurales. En nuestro caso se modeló el dominio catalítico del enzima utilizando las coordenadas cristalográficas de la glucoamilasa de *S. fibuligera* (Sevcik et al., 1998). Las propiedades de la estructura resultante, en concreto la configuración y tamaño del centro catalítico, se ajustan bien con los valores esperados.

El estudio estructural y funcional de la región rica en serina y treonina resultó, sin embargo, más complicado. Los resultados de un análisis BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) mostraron la existencia de diferentes tipos de proteínas eucariotas con regiones ricas en serina y treonina filogenéticamente relacionadas con la glucoamilasa. Estas proteínas tienen como única conexión clara el ser extracelulares lo que sugiere que el dominio común a todas ellas podría ser importante en los procesos de secreción.

En una búsqueda de proteínas resueltas estructuralmente, con coordenadas atómicas depositadas en la base de datos *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org>), encontramos similitud significativa entre el dominio rico en serina y treonina de la glucoamilasa y determinadas

proteínas bacterianas (invasina e intimina) implicadas en la adhesión de bacterias patógenas a células eucariotas. Invasina e intimina actúan mediante la interacción con otras proteínas de membrana de la célula del hospedador en la fase previa a la invasión de esta célula por parte de la bacteria (Hamburger et al., 1999; Luo et al., 2000). La existencia de esta homología nos ha permitido obtener un modelo para la región amino terminal de la glucoamilasa. La estructura resultante muestra una apreciable similitud con el dominio de unión al almidón de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (Sorimachi et al., 1996; 1997) pero los resultados de los experimentos de unión a substrato descartaron esta función, ya que ni Sta1p ni Sta1dp eran capaces de unirse al almidón insoluble.

Es importante destacar que el estudio de los modelos estructurales es una potente herramienta para el análisis de los procesos que se producen a nivel molecular. En nuestro caso el modelo estructural del STRD de Sta1p permite relacionar diferentes procesos no conectados *a priori*. Además de la relación estructural con la invasina, la región rica en serina y treonina presenta homología con proteínas codificadas por los genes *FLO* de levaduras lo que puede tener implicaciones interesantes.

Los genes *FLO* codifican proteínas extracelulares relacionadas con los fenómenos de floculación, formación de pseudohifas, biofilms y crecimiento invasivo (Gancedo, 2001; Gagiano et al., 1999). La similitud en la secuencia del gen *STA1* y *MUC1/FLO11* se extiende a la zona del promotor por lo tanto los genes *STA* son, al menos en algunos casos, co-regulados con genes que codifican proteínas extracelulares relacionadas con estos procesos de crecimiento diferencial.

Debido a que la estructura terciaria de las proteínas está mucho más conservada que la estructura primaria, es lógico predecir que las floculinas y adhesinas de levaduras deben presentar plegamientos similares al de las invasinas bacterianas. Las adhesinas de *Saccharomyces* se han relacionado con fenómenos de patogénesis tales como la formación de biofilms (Verstrepen y Klis 2006; Reynolds y

Fink, 2001; Guo et al., 2000). También hay evidencias de que los genes *FLO* de las levaduras patógenas del género *Candida* están directamente relacionados con su patogénesis (Cormack et al., 1999). Por lo tanto, el mecanismo molecular subyacente en los procesos de patogénesis podría ser el mismo que el de las interacciones invasiva bacteriana-proteínas del hospedador.

3. HIPERGLICOSILACIÓN.

La glicosilación de proteínas en células eucariotas juega un papel esencial en muchos procesos tales como el plegamiento, el transporte de biomoléculas, el mantenimiento de las estructuras proteicas y celulares, la adhesión y el reconocimiento celular. En *S. cerevisiae* la mayoría de glicoproteínas extracelulares sufren procesos de hiperglicosilación (Conde et al., 2004).

En contraste con estudios previos (Kleinman et al., 1988; Modena et al., 1986; Yamashita et al., 1985c), las bandas observadas en los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes indican que la glucoamilasa se sintetiza como un monómero hiperglicosilado.

La fracción del carbohidrato representa cerca del 80% del peso de la proteína, como se puede calcular al comparar el peso teórico del polipéptido y el obtenido experimentalmente. La elevada glicosilación puede ser explicada en base a la secuencia y al modelo estructural de la proteína. La glucoamilasa es un substrato ideal para la hiperglicosilación ya que contiene trece residuos de asparragina, localizados en la secuencia primaria (Figura 36), que son susceptibles de N-glicosilación. Además, contiene múltiples sitios de O-glicosilación en la región rica en residuos de serina y treonina (Jentoft, 1990).

MVGLKNPYTHMQRPFLLAYLVLSLLFNSALG**FPTALVPRGSSSSNITSSG**PSSTPFSSATESF
 STGTTVTPSSSKYPGSKTETSVSSTTETTIVPTTTTTSVITPSTTTITTTVCSTGTNSAGETTS
 GCSPKTITTTVPCSTSPSETASESTTSPPTTPVTTVVSTTVVTTEYSTSTKQGGEITTTFVTKN
 IPTTYLTTIAPTSSVTTVT**NEFTPTTITTTVCSTGTNSAGETTS**GCSPKVTTTTPCSTGTGEYT
 TEATAPVTTAVTTTIVTTESSTGTNSAGKTTTSYTTKSVPTTYVFDFGKGILDQSCGGVFS**NING**
SSQVQLRDVVLM**NGT**VVYDSNGAWDSSALEEWLQRQKKVSIERIFENIGPSAVYPSILPGVVIA
 SPSQTHPDYFYQWIRDSALTINSIVSHSADPAIETLLQYL**NVSFHLQRTNNTL**GAGIGYT**NDTV**
 ALGDPKWNVDNTAFTEPWGRPQNDGPALRSIAILKIIDYIKQSGTDLGAKYPFQSTADIFDDIV
 RWDLRFIIDHW**NSSG**FDLWEEVNGMHFFLLVQLSAVDRSLSYF**NASER**SSPFVEELRQTRRDI
 SKFLVDPANGFINGKYNIVETPMIADTLRSGLDISTLLAANTVHDAPSASHLPFDINDPAVLN
 TLHHLMLHMRSIYP**INDSSKNAT**GIALGRYPEDVYDGYGVGEGNPWVLATCAASTTLYQLIYRH
 ISEQHDLVVPMNNDCSNAFWSELVFS**NLTL**GNDEGYLILEFNTPAF**NQTI**QKIFQLADSFLGQ
 AESHVGTDGELSEQFNKYTGFMQGAQHLTWSYTSFWDAYQIRQEVQLQSL

Figura 36. Secuencia primaria de la glucoamilasa Sta1p de *S. cerevisiae* en la que se indican los posibles puntos de N-glicosilación (NXS/T). En negro péptido señal; en rosa el dominio rico en serina y treonina; el resto de la secuencia (azul) corresponde al dominio catalítico.

La hiperglicosilación ocurre por extensión de un núcleo de glicano unido a una asparragina (Munro, 2001). Dado que la extensión del carbohidrato puede conducir a moléculas de gran tamaño, este proceso está sujeto a restricciones estéricas. La acción de la maquinaria enzimática implicada en el proceso de hiperglicosilación se verá favorecida por señales de glicosilación que se encuentren en la superficie de la proteína y que permitan la progresión del carbohidrato de manosa hacia el exterior. En la glucoamilasa de *S. cerevisiae* existen numerosos puntos de N-glicosilación situados en la zona exterior de la proteína (Figura 37).

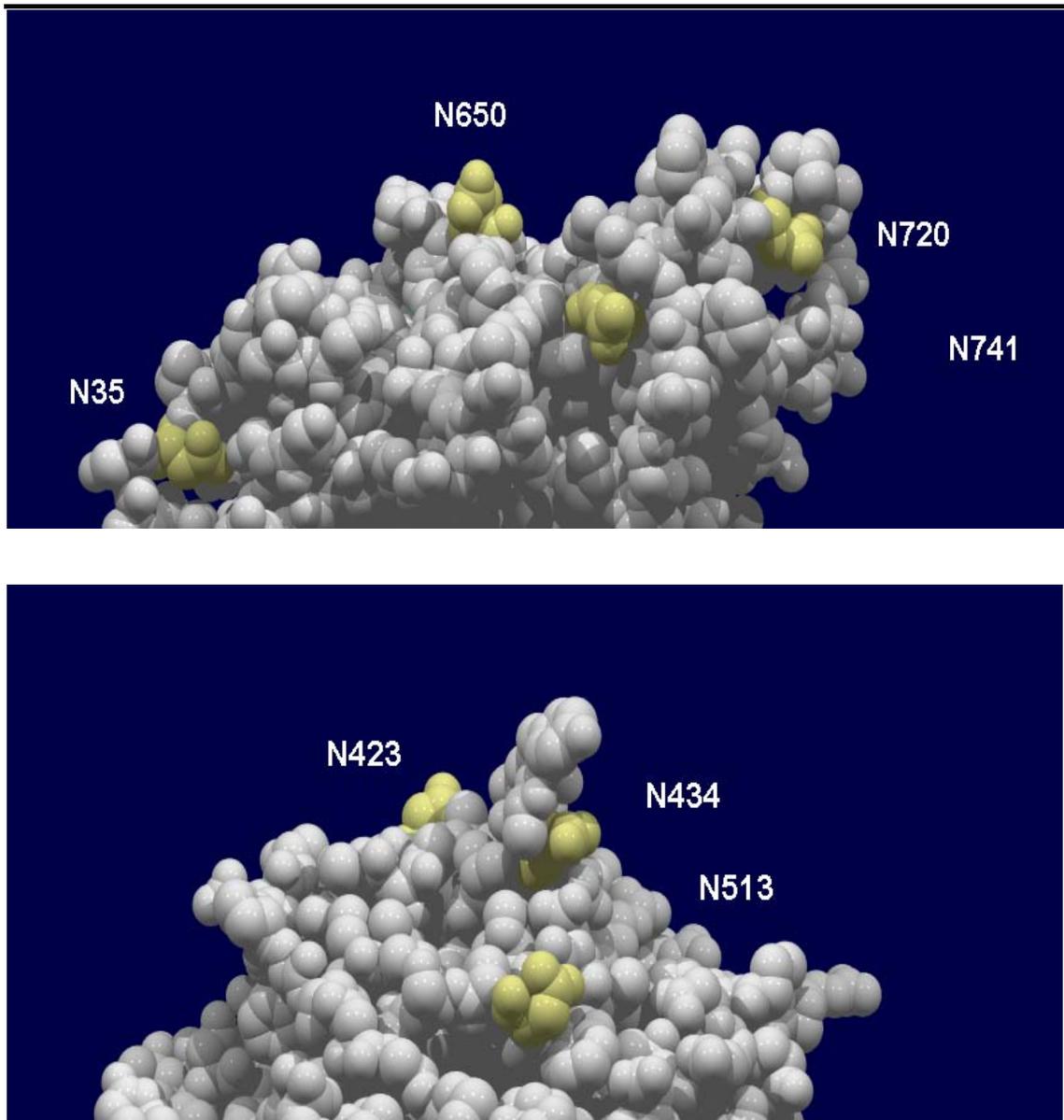


Figura 28. Representación estructural de la glucoamilasa de *S. cerevisiae*. La figura muestra dos puntos de vista diferentes del dominio catalítico en los que los residuos de Asn, posibles puntos de glicosilación (Secuones NXT/S) se destacan en amarillo.

La glicosilación contribuye al plegamiento del polipéptido naciente durante su síntesis y favorece la estabilización de la proteína madura (Mitra et al., 2006; Wang et al., 1996). La expresión del gen *STA1* en una estirpe *mnn9* (BY4741 *mnn9* [*STA1*]_n), incapaz de hiperglicosilar, condujo a una variante de glucoamilasa con menor contenido en carbohidrato, este enzima no hiperglicosilado es menos

activo que la variante nativa, como indican los datos de actividad obtenida tras la producción de ambas versiones del enzima. Sería interesante determinar si el descenso de actividad observado en la estirpe *mnn9* es debido a un descenso en la producción de enzima correctamente plegado, o a un descenso en la secreción. Los estudios de estabilidad térmica en las dos variantes enzimáticas no confirmaron el papel protector de la hiperglicosilación frente a la desestabilización térmica descrito para otros enzimas como las glucoamilasas de *A. niger* y *S. fibuligera* (Safari-Aghdam et al., 2005; Solovicova et al., 1996).

La hiperglicosilación tiene un papel crítico en los procesos de secreción (Agaphonov et al., 2002) ya que ambos procesos, glicosilación/secreción, se saturan cuando se expresan elevados niveles de proteína secretable presumiblemente porque surgen competencias por moléculas limitantes (Vanoni et al., 1989; Mattanovich et al., 2004; Gasser y Mattanovich, 2007). Debido a las características de la glucoamilasa podría esperarse una incompleta glicosilación de la proteína cuando se expresa a niveles muy superiores a los que se dan en el tipo silvestre. Inmunoensayos de la glucoamilasa secretada en las estirpes tetraploides muestran que las levaduras transformadas secretan formas de glucoamilasa parcialmente glicosiladas (Figura 31). El proceso de glicosilación que tiene lugar en el Golgi, previo a la secreción del enzima, podría ser el principal paso limitante a la sobreproducción de la glucoamilasa en *S. cerevisiae*.

4. CONSTRUCCIÓN DE UNA GLUCOAMILASA HÍBRIDA Y EXPRESIÓN EN *S. cerevisiae*.

La glucoamilasa de levadura no puede unirse a los gránulos de almidón insoluble debido a que carece de un dominio de unión a substrato. Este hecho la hace muy ineficiente frente a las formas no procesadas de almidón que son las que generalmente se utilizan en los procesos industriales. Con el objetivo de mejorar la actividad frente a

este tipo de sustrato insoluble, proyectamos la construcción de enzimas híbridos que contuviesen un dominio de unión al almidón (Latorre-García et al., 2005).

Los dominios de unión a sustrato son estructuras proteicas modulares, relativamente pequeñas e independientes de los dominios catalíticos. Su adición a una proteína endógena de la levadura debería representar una menor carga genética para la estirpe hospedadora que la expresión de un gen heterólogo. La ingeniería de proteínas mediante la adición de un dominio de unión a sustrato se ha convertido en una aproximación relativamente frecuente utilizada para mejorar las propiedades funcionales de distintos tipos de enzimas. A menudo, el dominio de unión se usa para incrementar la eficiencia catalítica, pero también se utiliza como dominio de afinidad que facilita la purificación de la proteína. El uso de dominios de unión a almidón o celulosa para estos propósitos se ha descrito en numerosas publicaciones (Shoseyov et al., 2006; Levy et al., 2004; Ji et al., 2003; Wernereus et al., 2001; Limon et al., 2001; Ohdan et al., 2000).

Como solución concreta abordamos la adición del dominio de unión a almidón de la glucoamilasa de *A. niger* en las zona amino y carboxi terminal de la proteína Sta1p. Las glucoamilasas fúngicas presentan dominios de unión a almidón en los dos extremo de la proteína y la localización de dominio de unión afecta, por razones estéricas, a la capacidad de unión y de hidrólisis del enzima (Cornett et al., 2003). La versión de enzima híbrido portador del dominio de unión a almidón en el extremo N-terminal mostró una capacidad de hidrolizar almidón muy limitada, lo que podría deberse a que esta versión no se está sintetizando o secretando adecuadamente. También la localización amino terminal podría interferir estructuralmente con el dominio rico en serina y treonina. Afortunadamente, la adición del dominio en el extremo C-terminal, condujo a una forma enzimática activa, con capacidad de unirse al sustrato y de hidrolizar almidón insoluble, capacidad que no posee el enzima nativo de levadura.

Las medidas de actividad enzimática indicaron que el enzima híbrido poseía una actividad similar a la del enzima nativo frente a almidón soluble, aunque es producido por la levadura en menor cantidad. La menor producción de enzima híbrido podría deberse a su mayor masa molecular que dificultaría la síntesis y secreción del enzima o a características asociadas a la secuencia del dominio de unión de *A. niger* que no permitan el correcto procesado del enzima híbrido por parte de la levadura.

La obtención de una cepa de *S. cerevisiae* capaz de producir una variante del enzima endógeno capaz de unirse e hidrolizar almidón insoluble supone un avance importante para una futura aplicación biotecnológica.

5. MEJORA DE LAS PROPIEDADES ENZIMÁTICAS DE LA GLUCOAMILASA POR TÉCNICAS DE INGENIERÍA DE PROTEÍNAS.

La ingeniería de proteínas y más en concreto la evolución dirigida permite la mejora de enzimas con aplicación industrial. Este proceso, que mimetiza la evolución natural, se lleva a cabo mediante etapas alternas de generación de proteínas mutantes, con otras de selección de clones con propiedades mejoradas.

Las mutaciones se introducen en la secuencia nucleotídica tanto en lugares específicos mediante mutagénesis dirigida (denominando el proceso de "diseño racional") como al azar por mutagénesis aleatoria (Otten y Quaz, 2005). Numerosos enzimas relacionados con la biosíntesis, modificación y degradación de carbohidratos han mejorado sus propiedades utilizando esta metodología (Yuan et al., 2005).

La mejora de las propiedades de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* abordada en este trabajo tiene un obvio interés biotecnológico debido a su posible aplicación en la bioconversión de almidón en etanol y en otros productos de fermentación.

Con el objetivo de mejorar la capacidad desramificante de la glucoamilasa se utilizó el modelo estructural del enzima para diseñar variantes actuando sobre los *loops* 3 y 5 de la proteína. La información relativa a otras glucoamilasas de la misma familia, indicaba que estas regiones tenían influencia en la especificidad sobre los enlaces α -1,6 de la molécula de almidón (Fierobe et al., 1996). Esta aproximación, por “diseño racional”, no proporcionó resultados positivos, ya que ninguna de las variantes obtenidas poseía actividad desramificante y en la mayoría de los casos perdían su capacidad de hidrolizar enlaces α -1,4. Probablemente, las modificaciones en la secuencia primaria causan distorsiones estructurales que impiden la producción de un enzima funcional. Por otra parte, los conocimientos actuales sobre las relaciones estructura-función en proteínas suelen ser insuficientes para hacer del diseño racional una aproximación viable en los procesos de evolución dirigida (Yuan et al, 2005).

Los experimentos de mutagénesis aleatoria permiten encontrar caminos para la mejora enzimática que no pueden ser anticipados por un diseño racional (Bulter et al., 2003). En este trabajo aplicamos la técnica de *DNA-shuffling* (Stemmer, 1994 a y b) al gen *STA1* de *S. cerevisiae* y a versiones del mismo (L3, L5, L35, L35D) obtenidas por mutagénesis dirigida. Para simplificar el proceso de introducción de las versiones mutantes obtenidas por *shuffling* en *S. cerevisiae*, utilizamos la recombinación homóloga *in vivo*, mezclando el DNA del gen sometido a *shuffling* y el de un vector de clonación de *S. cerevisiae*, y transformando con esta mezcla una cepa receptora de levadura (Bulter y Alcalde, 2003; Swers et al., 2004), de este modo se evitó la generación de bibliotecas de mutantes en *E. coli*, paso limitante a la hora de obtener el mayor número de variantes posibles.

Tras un proceso de *screening* o búsqueda de mutantes con mayor actividad glucoamilasa se seleccionó una versión con mayor actividad, designada Cl24p. Su secuenciación mostró que la proteína mutante tenía tres mutaciones puntuales y una delección parcial.

El estudio de las mutaciones en el modelo estructural de la glucoamilasa parece indicar que las mutaciones puntuales no son significativas ya que se localizan en el dominio rico en serina y treonina y no es previsible que afecten a la estructura del dominio catalítico. La deleción, en cambio, supone la pérdida de 2 de los 3 barriles beta del dominio rico en serina y treonina y da lugar a un aumento de la actividad del enzima. La versión de glucoamilasa delecionada descrita en la sección 2 de resultados, en la cual se eliminó la casi totalidad del dominio rico en serina y treonina, muestra menor actividad que la versión Cl24p. Puede deducirse que el STRD no es necesario para la actividad enzimática pero estabiliza la estructura del dominio catalítico.

No es probable que la deleción de Cl24p produzca una mejora intrínseca de la capacidad catalítica del enzima, ya que no existen mutaciones que afecten directamente a la estructura del centro catalítico. La mayor actividad detectada en la cepa de levadura que produce la versión mutante puede deberse por un lado al menor tamaño de la proteína mutante, ya que prescinde de un fragmento no esencial que facilitaría su producción, y por otro lado a la conservación de la estabilidad estructural del dominio catalítico por no perder por completo el dominio rico en serina y treonina.

Sería necesario confirmar experimentalmente cuales son las causas del incremento de actividad de la versión Cl24p. Para ello deberían introducirse puntualmente todas las mutaciones que producen un cambio en la proteína nativa y proceder al estudio de la actividad de los mutantes simples. Por otro lado sería necesario, partiendo del gen mutante *STA1* que produce la versión Cl24p, continuar con la aplicación del método de *DNA-shuffling* y de otras técnicas de evolución dirigida, hasta obtener versiones de glucoamilasa con actividad catalítica mejorada.

Conclusiones

CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral se resumen en las siguientes conclusiones:

1. Se han estudiado diversas estirpes de la levadura *S. cerevisiae*, de distinta procedencia y fondo genético, con el fin de optimizar la producción de la glucoamilasa extracelular, codificada por el gen *STA1*. La estirpe que muestra mayor actividad glucoamilasa es BY4741[*STA1*]_n portadora de un plásmido episómico con el gen *STA1* bajo control de un promotor inducible por galactosa.
2. Los niveles de actividad obtenidos por la integración del gen en copia múltiple en el genoma de la levadura y utilizando como receptoras estirpes poliploides, fueron similares a los obtenidos con cepas de laboratorio y plásmidos episómicos.
3. Las levaduras industriales estudiadas, transformadas con plásmidos multicopia portadores del gen *STA1*, mostraron diferencias en los niveles de síntesis y secreción de la glucoamilasa probablemente debido su diferente constitución genética.
4. El estudio bioquímico de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* indica que el enzima se sintetiza como una única subunidad (monómero) que sufre un proceso de hiperglicosilación extremo. Todo el enzima producido se secreta al medio extracelular ya que no se detecta actividad apreciable asociada a células. Los procesos de secreción e hiperglicosilación pueden dificultar la sobreproducción del enzima al actuar como pasos limitantes.
5. La construcción de una versión modificada de *Sta1p* (denominada *Sta1dp*), en la que se ha delecionado la mayor

parte de la región rica en Ser/Thr de la proteína, presenta actividad glucoamilasa. Por lo que se puede concluir que la región rica en Ser/Thr, procedente de un evento de fusión génica, no es crítica para la actividad.

6. La construcción de una forma híbrida de Sta1p, a la que se le ha unido el dominio de unión al almidón de la glucoamilasa de *A. niger*, posee capacidad amilolítica frente a almidón insoluble, de la que carece la glucoamilasa nativa de *S. cerevisiae*
7. Los modelos estructurales del dominio catalítico y de la región rica en Ser/Thr de la glucoamilasa de *S. cerevisiae* explican muchas propiedades del enzima y nos han permitido diseñar nuevas versiones con el objeto de mejorar su actividad.
8. La mutagénesis aleatoria por el método de *DNA-Shuffling* ha permitido obtener una variante de glucoamilasa de *S. cerevisiae* con actividad mejorada respecto al enzima nativo. El estudio de la secuencia del mutante indica que la mejora podría deberse a una delección parcial de la región amino terminal de *STA1*. El éxito de esta aproximación sugiere la posibilidad de nuevas mejoras por evolución dirigida de las versiones más activas del enzima.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA.

Adam AC, Latorre-García L y Polaina J (2004). Structural analysis of glucoamylase encoded by the *STA1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*). *Yeast* 21: 379-388.

Adam AC y Polaina J (1991). Construction of a *Saccharomyces cerevisiae* strain able to ferment cellobiose. *Curr. Genet.* 20: 5-8.

Adam AC, Rubio-Teixeira M y Polaina J (1995). Induced expression of bacterial beta-glucosidase activity in *Saccharomyces*. *Yeast* 11: 395-406.

Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA y Stearns T (1997). En *Methods in yeast genetics*. pp 145-146. A Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, USA.

Agaphonov MO, Romanova NV, Trushkina PM, Smirnov N y Ter-Avanesyan MD (2002). Aggregation and retention of human urokinase type plasminogen activator in the yeast endoplasmatic reticulum. *BMC Mol. Biol.* 3: 15.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W y Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

Ashikari T, Nakamura N, Tanaka Y, Kiuchi N, Shibano Y, Tanaka T, Amachi T y Yoshizumi H (1986). *Rhizopus* raw-starch-degrading glucoamylase: its cloning and expression in yeast. *Agric. Biol. Chem.* 50: 957-964.

Bhella RS y Altosaar I (1987). Production of multiple forms of glucoamylase in *Aspergillus awamori*. *Biochem. Cell. Biol.* 65: 762-765.

Bertoldo C y Antranikian G (2002). Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 151-160.

Boel E, Hjort I, Svensson B, Norris F, Norris KE y Fiil NP (1984). Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *EMBO J.* 3: 1097-1102.

Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ y Davies GJ (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* 382: 769-781.

Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Hieter P y Boeckle JD (1998). Designer deletion strain derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strain and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast.* 14: 115-132.

Bui DM, Kunze I, Forster S, Wartmann T, Horstmann C, Manteuffel R y Kunze G (1996). Cloning and expression of an *Arxula adenivorans* glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 610-619.

Bulter T, Alcalde M, Sieber V, Meinhold P, Schlachtbauer C y Arnold H (2003). Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 987-995.

Bulter T y Alcalde M (2003). Preparing Libraries in *Saccharomyces cerevisiae*. En *Methods in Molecular Biology*, vol 231: *Directed Evolution Library Creation: Methods*

and Protocols. pp. 17-22. Editado por F.H. Arnold y G. Georgiu. Humana Press Inc., Totowa, NJ. USA.

Carlson M y Botstein D (1983). Organization of the *SUC* gene family in *Saccharomyces*. *Mol. Cell. Biol.* 3: 351-359.

Cesareni G y Murray AH (1987). Plasmid vector carrying the replication origin of filamentous single-stranded phages. En *Genetic Engineering*. Editado por J.K. Setlow. Vol. 9, pp.135-154. Plenum Press, New York, USA.

Charron MJ, Read E, Haut SR y Michels CA (1989). Molecular evolutions of the telomere-associated *MAL* loci of *Saccharomyces*. *Genetics*. 112: 307-316.

Cherry JR, Lamsa MH, Schneider P, Vind J, Svendsen A, Jones A y Pedersen AH (1999). Direct evolution of a fungal peroxidase. *Nat. Biotechnol.* 17: 379-384.

Colonna WJ y Magee PT (1978). Glycogenolytic enzymes in sporulating yeast. *J. Bacteriol.* 134: 844-853.

Conde R, Cueva R, Pablo G, Polaina J y Larriba G (2004). A search for hyperglycosylation signals in Yeast Glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 279: 43789-43798.

Cormack BP, Ghorri N y Falkow S (1999). An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* 285: 578-582.

Cornett CAG, Fang TY, Reilly PT and Ford C. (2003). Starch-binding domain shuffling in *Aspergillus niger* glucoamylase. *Protein Eng.* 16: 521-529.

Cove DJ (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 113: 51-56.

Coutinho PM y Henrissat B (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. pp. 3-12. Editado por H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat y B. Svensson. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, England.

Coutinho PM y Reilly PJ (1997). Glucoamylase structural, functional, and evolutionary relationships. *Proteins*. 29: 334-347.

Coutinho PM y Reilly PJ (1994a). Structural similarities in glucoamylases by hydrophobic cluster analysis. *Protein Eng* 7: 749-760.

Coutinho PM y Reilly PJ (1994b). Reading-frame shift in *Saccharomyces* glucoamylases restores catalytic base, extends sequence and improves alignment with other glucoamylases. *Protein Eng* 7: 1281-1282.

Crabb WD y Shetty JK (1999). Commodity scale production of sugars from starches. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 252-256.

Crabb WD y Mitchinson C (1997). Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends Biotechnol.* 15: 349-352.

Cuff J y Barton GJ (2004). Application of enhanced multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure predictions. *Proteins*. 40: 502-511.

Davies G y Henrissat B (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3: 853-859.

- Deutschbauer AM, Jaramillo DF, Proctor M, Kumm J, Hillenmeyer ME, Davis RW, Nislow C y Giaeveer G** (2005). Mechanisms of haploinsufficiency revealed by genome-wide profiling in yeast. *Genetics*. 169: 1915-1925.
- Doman-Pytka M y Bardowski J** (2004). Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. *Crit. Rev. Microbiol.* 30: 107-121.
- Ducki A, Grundmann O, Konermann L, Mayer F y Hoppert M** (1998). Glucoamylase from *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*: sequence studies and analysis of the macromolecular architecture of the enzyme. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 5: 327-335.
- Eksteen JM, van Rensburg P, Cordero Otero RR y Pretorius IS** (2003). Starch fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the α -amylase and glucoamylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*. *Biotechnol. Bioeng.* 84: 639-646.
- Fierobe HP, Stoffer BB, Frandsen TP y Svensson B** (1996). Mutational modulation of substrate bond-type specificity and thermostability of glucoamylase from *Aspergillus awamori* by replacement with short homologue active site sequences and Thiol/Disulfide engineering. *Biochemistry*. 35: 8696-8704.
- Filho EAS, de Melo HF, Antunes DF, dos Santos SKB, Resende AM, Simoes DA y de Morais MA** (2005). Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32: 481-486.
- Ford C** (1999). Improving operating performance of glucoamylase by mutagenesis. *Curr. Opin. Biotech.* 10: 353-357.
- Fountoulakis M, Juranville JF y Manneberg M** (1992). Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lorry quantitation assays, using non-glycosylated and glycosylated proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 24: 265 - 274.
- Gagiano M, van Dyk D, Bauer FF, Lambrechts MG y Pretorius IS** (1999). Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 31: 103-116.
- Gancedo JM** (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 107-123.
- Gasser B y Mattanovich D** (2007). Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale? *Biotechnol. Lett.* 29: 201-212.
- Gietz RD y Woods RA** (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350: 87-96.
- Gietz RD y Sugino A** (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in Vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*. 74: 527-534.
- Gray KA, Zhao L y Emptage M** (2006). Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10: 141-146.
- Guerra OG, Rubio IG, da Silva FCG, Bertani RA, Dos Santos GRC y Vicente EJ** (2006). A novel system of genetic transformation allows multiple integrations of a derived gen in *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes. *J. Microbiol. Methods*. 67: 437-445.

- Guex N, Diemand A y Peitsch MC** (1999). Protein modelling for all. *Trends Biochem. Sci.* 24: 364-367.
- Guex N y Peitsch MC** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 18: 2714-2723.
- Guo B, Styles CA, Feng Q y Fink GR** (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 12158-12163.
- Guzmán-Maldonado H y Paredes-López O** (1995). Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. *Crit. Rev. Food Sci.* 35: 373-403.
- Hamburger ZA, Brown MS, Isberg RR y Bjorkman PJ** (1999). Crystal structure of invasin: A bacterial integrin-binding protein. *Science.* 286: 291-295.
- Hanahan D** (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hashimoto H** (2006). Recent structural studies of carbohydrate-binding modules. *Cell. Mol. Life. Sci.* 63: 2954-2967.
- Hemsley A, Arnheim N, Toney MD, Cortopassi G y Galas DJ** (1989). A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 17: 6545-6551.
- Henrissat B** (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.
- Henrissat B y Bairoch A** (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781-788.
- Henrissat B y Bairoch A** (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316: 695-696.
- Henrissat B, Coutinho PM y Reilly PJ** (1994). Reading-frame shift in *Saccharomyces* glucoamylases restores catalytic base, extends sequence and improves alignment with other glucoamylases. *Protein. Eng.* 7: 1281-1282.
- Henrissat B y Davies GJ** (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Op. Struct. Biol.* 7: 637-644.
- Horvathova V, Janecek S y Sturdik E** (2001). Amylolytic enzymes: molecular aspects of their properties. *Gen. Physiol. Biophys.* 20: 7-32.
- Houghton-Larsen J y Pedersen PA** (2003). Cloning and characterisation of a glucoamylase gene (GlaM) from the dimorphic zygomycete *Mucor circinelloides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 210-217.
- Jafari-Aghdam J, Khajeh K, Ranjbar B y Nemat-Gorgani M** (2005). Deglycosylation of glucoamylase from *Aspergillus niger*: Effects on structure, activity and stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1750: 61-68.
- Jentoff N** (1990). Why are proteins O-Glycosylated?. *Trends Biochem. Sci.* 15: 291-294.

- Ji Q, Vincken JP, Suurs LCJM y Visser RGF** (2003). Microbial starch-binding domains as a tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis. *Plant. Mol. Biol.* 51: 789-801.
- Johnston M** (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: The GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 51: 458-476.
- Johnson MS, Sutcliffe MJ y Blundell TL** (1990). Molecular anatomy: phyletic relationships derived from three-dimensional structure of proteins. *J. Mol. Evol.* 30: 43-59.
- Johnston SA y Hopper JE** (1982). Isolation of the yeast regulatory gene GAL4 and analysis of its dosage effects on the galactose/melibiose regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 6971-6975.
- Jones DT** (1999a). GenTHREADER: An efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. *J. Mol. Biol.* 287: 797-815.
- Jones DT** (1999b). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* 292: 195-202.
- Kim MS, Park JT, Kim YW, Lee HS, Nyawira R, Shin HS, Park CS, Yoo SH, Kim YR, Moon TW y Park KH** (2004). Properties of a Novel Thermostable Glucoamylase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* in relation to starch processing. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3933-3940.
- Kleinman MJ, Wilkinson AE, Wright IP, Evans IH, y Bevan EA** (1988). Purification and properties of an extracellular glucoamylase from a diastatic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 249: 163-170.
- Latorre-Garcia L, Adam AC, Manzanares P y Polaina J** (2005). Improving the amylolytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* glucoamylase by the addition of a starch binding domain. *J. Biotech.* 118: 167-176.
- Latorre-Garcia L, Del Castillo-Agudo L y Polaina J** (2007). Taxonomical classification of yeast isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 785-791.
- Levy I, Paldi T y Shoseyov O** (2004). Engineering a bifunctional starch-cellulose cross-bridge protein. *Biomaterials.* 25: 1841-1849.
- Limon MC, Margolles-Clark E, Benitez T y Penttila M** (2001). Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 198: 57-63.
- Lin Y y Tanaka S** (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 69: 627-642.
- Luo Y, Frey EA, Pfuetzner RA, Creagh AL, Knoechel DG, Haynes CA, Finlay BB, Strynadka NC** (2000). Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature.* 405: 1073-1077.
- Ma YJ, Lin LL, Chien HR y Hsu WH** (2000). Efficient utilization of starch by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase and isoamylase. *Biotechnol. Appl. Biochem* 31: 55-59.
- Machovic M y Jenecek S** (2006). Starch-binding domains in the post-genoma era. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 2710-2724.

Machovic M y Jenecek S (2007). Amylolytic enzymes: Types, structures and specificities. En *Industrial Enzymes, Structure, function and applications*. pp. 3-18. Editado por J. Polaina y A.P. MacCabe. Springer. Dordrecht, The Netherlands.

Marin D, Jiménez A, Fernández LM (2001). Construction of an efficient amylolytic industrial yeast strain containing DNA exclusively derived from yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 201: 249-253.

Mattanovich D, Gasser B, Hohenblum H y Sauer M (2004). Stress in recombinant protein producing yeast. *J. Biotechnol.* 113: 121-135.

McCarter JD y Withers SG (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4: 885-892.

McGuffin LJ y Jones DT (2003). Improvement of the GenTHREADER method for genomic fold recognition. *Bioinformatics.* 19: 874-881.

Mitra N, Sinha S, Ramya TN y Surolia A (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem. Sci.* 31: 156-163.

Modena D, Vanoni M, Englard S y Marmur J (1986). Biochemical and immunological characterization of the STA2-Encoded extracellular glucoamylase from *Saccharomyces diastaticus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 248: 138-150.

Munro S (2001). What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus? *FEBS Lett.* 498: 223-227.

Mylin LM, Hofmann KJ, Schultz LD y Hopper JE (1990). Regulated GAL4 expresión cassette providing controllable and high-level output from high-copy galactose promoters in yeast. *Methods enzymol.* 185: 297 – 308.

Naim HY, Lacey SW, Sambrook JF y Gething MJ (1991). Expression of a full-length cDNA coding for human intestinal lactase-phlorizin hydrolase reveals an uncleaved, enzymatically active, and transport-competent protein. *J. Biol. Chem.* 266: 12313-12320.

Nakamura T, Maeda Y, Tanoue N, Makita T, Kato M y Kobayashi T (2006). Expression profile of amylolytic genes in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 2363-2370.

Naumov G, Turakainen H, Naumova E, Aho S y Korhola M (1990). A new family of polymorphic genes in *Saccharomyces cerevisiae*: alpha-galactosidase genes MEL1-MEL7. *Mol. Gen. Genet.* 224: 119-128.

Nichols BL, Avery S, Sen P, Swallow DM, Hahn D y Sterchi E (2003). The maltase-glucoamylase gene: common ancestry to sucrase-isomaltase with complementary starch digestion activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 1432-1437.

Nichols BL, Eldering J, Avery S, Hahn D, Quaroni A y Sterchi E (1998). Human small intestinal maltase-glucoamylase cDNA cloning. Homology to sucrase-isomaltase. *J. Biol. Chem.* 273: 3076-3081.

Ohdan K, Kuriki T, Takara H, Kaneko H y Okada S (2000). Introduction of raw starch-binding domains into *Bacillus subtilis* α -amylase by fusion with the starch-binding domain of *Bacillus cyclomaltodextrin* glucanotransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3058-3064.

- Offen LG y Quax WJ** (2005). Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol. Eng.* 22: 1-9.
- Okada S, Yokobayashi K, Sakano Y y Kitahata S** (1988). Debranching Enzymes. En *Handbook of amylases and related enzymes*. pp. 125-142. Editado por Amylase Research Society of Japan. Pergamon Press plc. Oxford, England.
- Paldi T, Levy I y Shoseyov O** (2003). Glucoamylase starch-binding domain of *Aspergillus niger* B1: molecular cloning and functional characterization. *Biochem. J.* 372: 905-910.
- Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D y Mohan R** (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31:135-152.
- Polaina J y Adam AC** (1991). A fast procedure for yeast DNA purification. *Nucleic. Acids. Res.* 19: 5443.
- Polaina J y Wiggs MY** (1983). *STA10*: A gene involved in the control of starch utilization by *Saccharomyces*. *Curr. Genet.* 7: 108-112.
- Pretorius IS y Lambrechts MG** (1991). The glucoamylase multigene family in *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*: An overview. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26: 53-76.
- Reynolds TB y Fink GR** (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science.* 291: 878-881.
- Robertson ER y Kennedy JF** (1996). Glycoproteins: a consideration of the potential problems and their solutions with respect to purification and characterisation. *Bioseparation.* 6: 1-15.
- Rost B y Sander C** (1994). Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins.* 19: 55-72.
- Rye CS y Withers SG** (2000). Glycosidase mechanisms. *Curr. Op. Chem. Biol.* 4: 573-580.
- Sambrook J, Fritsch RF y Maniatis T** (1989). En *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York (USA).
- Sauer J, Sigurskjold BW, Christensen U, Frandsen TP, Mirgorodskaya E, Harrison M, Roepstorff P y Svensson B** (2000). Glucoamylase: structure/function relationship, and protein engineering. *Biochim. Biophys. Acta* 1543: 275-293.
- Shigechi H, Koh J, Fujita Y, Matsumoto T, Bito Y, Ueda M, Satoh E, Fukuda H y Kondo A** (2004). Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and α -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5037-5040.
- Shoseyov O, Shani Z y Levy I** (2006). Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 283-295.
- Seong KT, Katakura Y, Ninomiya K, Bito Y, Katahira S, Kondo A, Ueda M y Shioya S** (2006). Effect of flocculation on performance of arming yeast in direct ethanol fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 60-66.
- Sevcik J, Solovicova A, Hostinova E, Gasperik J, Wilson KS, y Dauter Z** (1998). Structure of glucoamylase from *Saccharomycopsis fibuligera* at 1.7 Å resolution. *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54: 854-866.

- Solovicova A, Christensen T, Hostinova E, Gasperik J, Sevcik J y Svensson B** (1999). Structure-function relationships in glucoamylases encoded by variant *Saccharomycopsis fibuligera* genes. *Eur. J. Biochem.* 264: 756-764.
- Solovicova A, Gasperik J y Hostinova E** (1996). High-yield production of *Saccharomycopsis fibuligera* glucoamylase in *Escherichia coli*, refolding, and comparison of the nonglycosylated and glycosylated enzyme forms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224: 790-795.
- Sorimachi K, Jacks AJ, Le Gal-Coeffet MF, Williamson G, Archer DB y Williamson MP** (1996). Solution structure of the granular starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 259: 970-987.
- Sorimachi K, Le Gal-Coeffet MF, Williamson G, Archer DB y Williamson MP** (1997). Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to β -cyclodextrin. *Structure.* 5: 647-661.
- Specka U, Mayer F y Antranikian G** (1991). Purification and properties of a Thermoactive Glucoamylase from *Clostridium thermosaccharolyticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2317-2323.
- Stam MR, Danchin EG, Rancurel C, Coutinho PM y Henrissat B** (2006). Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of alpha-amylase-related proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* 19: 555-562.
- Stemmer WPC** (1994a). Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nat.* 340: 389-391.
- Stemmer WPC** (1994b). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10747-10751.
- Swers JS, Kellogg BA y Wittrup KD** (2004). Shuffled antibody libraries created by *in vivo* homologous recombination and yeast surface display. *Nucleic Acids Res.* 32: n° 3.
- Synowiecki J, Grzybowska B y Zdziebło A** (2006). Sources, properties and suitability of new thermostable enzymes in food processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46: 197-205.
- Synowiecki J** (2007). The use of starch processing enzymes in the food industry. *En Industrial Enzymes. Structure, function and applications.* pp. 19 – 34. Editado por J. Polaina y A. MacCabe. Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Tamaki H** (1978). Genetic studies of ability to ferment starch in *Saccharomyces*: Gene polymorphism. *Molec. Gen. Genet.* 164: 205-209.
- Tammi M, Ballou L, Taylor A y Ballou CE** (1987). Effect of glycosylation on yeast invertase oligomer stability. *J. Biol. Chem.* 262: 4395-4401.
- Tkaczuk KL, Dunin-Horkawicz S, Purta E, Bujnicki JM** (2007). Structural and evolutionary bioinformatics of the SPOUT superfamily of methyltransferases. *BMC Bioinformatics.* 8: 73.
- Tsai P, Frevert J y Ballou CE** (1984). Carbohydrate structure of *Saccharomyces cerevisiae mnn9* mannoprotein. *J. Biol. Chem.* 259: 3805 - 3811.

Ueda S, Tsujisaka Y, Hayashida S, Yamamoto T y Hayashida S (1988). Glucoamylase. En *Handbook of amylases and related enzymes*. pp.116-124. Editado por Amylase Research Society of Japan. Pergamon Press plc. Oxford, England.

Uotsu-Tomita R, Tonzuka T, Sakai H y Sakano Y (2001). Novel glucoamylase-type enzyme from *Thermoactinomyces vulgaris* and *Methanococcus jannaschii* whose genes are found in the flanking region of the α -amylase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 465-473.

Van der Maarel MJEC, van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H y Dijkhuizen L (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol.* 94: 137-155.

Vanoni M, Lotti M y Alberghina L (1989). Expression of cloned *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase under natural and inducible promoters. *Biochim. Biophys. Acta.* 1008: 168-176.

Verstrepen KJ y Klis FM (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeast. *Mol. Microbiol.* 60: 5-15.

Vivier MA, Lambrechts MG y Pretorius IS (1997). Coregulation of starch degradation and dimorphism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32: 405-435.

Vivier MA, Sollitti P y Pretorius IS (1999). Functional analysis of multiple AUG codons in the transcripts of the *STA2* glucoamylase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 261: 11-20.

Wang C, Eufemi M, Turano C y Giartosio A (1996). Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry* 35: 7299-7307.

Wach A, Brachat A, Pohlmann R y Philippsen P (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 10: 1793-1808.

Wallis GL, Swift RJ, Hemming FW, Trinci AP y Peberdy JF (1999). Glucoamylase overexpression and secretion in *Aspergillus niger*: analysis of glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1472: 576-586.

Wernereus H, Lehtio J, Teeri T, Nygren PA y Stahal S (2001). Generation of metal-binding staphylococci through surface display of combinatorially engineered cellulose-binding domains. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4678-4684.

White JS y White DC (1997). En *Source book of enzymes*. p. 419. Editado por White Technical Research Book. CRC Press LLC. Boca Raton, Nueva York.

Xu TJ, Zhao XQ y Bai FW (2005). Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. *Enz. Microbiol. Technol.* 37: 634-640.

Yamashita I y Fukui S (1985). Transcriptional control of the sporulation-specific glucoamylase gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 5: 3069-3073.

Yamashita I, Maemura T, Hatano T y Fukui S (1985a). Polymorphic extracellular glucoamylase genes and their evolutionary origin in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J. Bacteriol.* 161: 574-582.

Yamashita I, Nakamura M y Fukui S (1985c). Diversity of molecular structures in the yeast extracellular glucoamylases. *J. Gen. Appl. Microbio.* 31: 399-401.

Yamashita I, Nakamura M y Fukui S (1987). Gene fusion is a possible mechanism underlying the evolution of *STA1*. *J. Bacteriol.* 169: 2142-2149.

Yamashita I, Suzuki K y Fukui S (1985b). Nucleotide sequence of the extracellular glucoamylase Gene *STA1* in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J. Bacteriol.* 161: 567-573.

Yuan L, Kurek I, English J y Keenan R (2005). Laboratory-directed protein evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 373-392.

Zechel DL y Withers SG (2000). Glycosidase mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.* 33: 11-18.

