

# **Caracterización de $\beta$ -galactosidasa estructurada en cuerpos de inclusión**

**Microbióloga; Maria José Bianco**

**Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT) (CONICET-UNC)  
e Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA)  
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina  
2016

# **Caracterización de $\beta$ -galactosidasa estructurada en cuerpos de inclusión**

**DIRECTORA:** Dra. Julieta María Sánchez

## **Tribunal evaluador**

- Dr. Carlos Argaraña
- Dr. Martín Theumer
- Dra. Maria Cristina Perotti

*El valor de un acto realizado reside más en el esfuerzo por  
llevarlo a cabo que en el resultado.  
(A.E.)*

***Dedicada a mis padres.***

*Agradecimientos*

A todas las personas que de alguna forma colaboraron en la realización de este trabajo con su aporte material, apoyo afectivo o científico.

Especialmente a la Dra. Julieta María Sánchez por su inagotable paciencia, esfuerzo y colaboración.

A mi familia, amigos y compañeros por su ayuda incondicional.

## TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA		iii
AGRADECIMIENTOS	v	
LISTADO DE ABREVIATURAS		ix
LISTADO DE ESQUEMAS		xiii
LISTADO DE FIGURAS <sub>xv</sub>		
LISTADO DE TABLAS		xvii
CAPÍTULO 1- INTRODUCCIÓN		
Introducción		3
Hipótesis	17	
Objetivos	17	
<i>Objetivo general</i>	17	
<i>Objetivos específicos</i>		17
CAPÍTULO 2 - MATERIALES Y MÉTODOS		
Materiales y métodos	21	
CAPÍTULO 3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
Resultados y discusión	31	
CAPÍTULO 4 - CONCLUSIÓN		
Conclusión		50
BIBLIOGRAFÍA		53

### Listado de abreviaturas

β-Gal	β-Galactosidasa
β-Gal <sub>CI</sub>	β-Galactosidasa estructurada en Cuerpos de inclusión
β-Gal <sub>L</sub>	β-Galactosidasa liberada de los Cuerpos de inclusión
β-Gals	β-Galactosidasa soluble
β-Gal <sub>His</sub>	β-Galactosidasa recombinante
GOS	Galactooligosacáridos
Gal	Galactosa
Glu	Glucosa
E-Gal	Galactosil-enzima
ONPG	Orto-nitrofenilgalactopiranosido
CI	Cuerpo/s de inclusión
M&M	Materiales y Métodos
MM	Marcador molecular
MLVs	Vesículas multilamelares
IMAC	Cromatografía de afinidad por ión metal inmovilizado
DSC	Calorimetría diferencial de Barrido
P	Pellet
S	Sobrenadante
<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. palmi</i>	<i>Alternariapalmi</i>
<i>A. fonsecaeus</i>	<i>Aspergillus fonsecaeus</i>
<i>A. carbonarius</i>	<i>Aspergillus carbonarius</i>
<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>A.acidocaldarius</i>	<i>Alicyclobacillusacidocaldarius</i>
<i>A.ikkense</i>	<i>Alkalilactibacillusikkense</i>
<i>A.arthrobactersp. 32c</i>	<i>AntarcticArthrobactersp. 32c</i>
<i>B.circulans</i>	<i>Bacilluscirculans</i>
<i>B.coagulans</i>	<i>Bacilluscoagulans</i>
<i>B.subtilis</i>	<i>Bacillussubtilis</i>
<i>B.megaterum</i>	<i>Bacillusmegaterum</i>
<i>B.stearotherophilus</i>	<i>Bacillusstearotherophilus</i>
<i>B. infantis</i>	<i>Bifidobacteriuminfantis</i>

*B. stearothermophilus*: *Bacillusstearothermophilus*  
*B.subtilis*      *Bacillussubtilis*  
*B.infantis*      *Bifidobacteriuminfantis*  
*C.saccharolyticus*      *Caldicellulosiruptorsaccharolyticus*  
*C. thermosulfurogens*      *Clostridiumthermosulfurogens*  
*E. cloacae*      *Enterobactercloacae*  
*E. coli*      *Escherichiacoli*  
*K.marxianusvarlactis*: *Kluyveromycesmarxianusvarlactis*  
*K. marxianusvarmarxianus*: *Kluyveromycesmarxianusvarmarxianus*  
*E. cloaceae*      *Enterobactercloaceae*  
*L. bulgaricus*      *Lactobacillusbulgaricus*  
*L. helviticus*      *Lactobacillushelviticus*  
*L. kefiranofaciens*: *Lactobacilluskefiranofaciens*  
*L. lactis*      *Lactobacilluslactis*  
*L. sporogenes*      *Lactobacillussporogenes*  
*L. thermophilus*: *Lactobacillusthermophilus*  
*L. delbrueckii*: *Lactobacillusdelbrueckii*  
*P. pento*      *Pediococcuspento*  
*S. lactis*      *Streptococcuslactis*  
*S. thermophilus*: *Streptococcusthermophilus*.  
*T. aquaticus*      *Thermusaquaticus*  
*F. oxysporum*      *Fusarium oxysporum*  
*M. pusillus*      *Mucopusillus*  
*P. chrysogenum*: *Penicillumchrysogenum*  
*P. expansum*      *Penicillumexpansum*  
*P. pastoris*      *Pichiapastoris*  
*S. lactis*      *Saccharomyceslactis*  
*S. fragilis*      *Saccharomycesfragilis*  
*K. fragilis*      *Kluyveromycesfragilis*  
*K. lactis*      *Kluyveromyceslactis*  
*K. marxianus* *Kluyveromycesmarxianus*  
*L. acidophilus*      *Lactobacillusacidophilus*  
*L. plantarum*      *Lactobacillusplantarum*,  
*L. reuteri*      *Lactobacillusreuteri*

*L. sakei*      *Lactobacillus sakei*

*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

*P. thiaminolyticus*: *Paenibacillus thiaminolyticus*

*P. woesei*      *Pyrococcus woesei*



## Listado de Esquemas

<b>Esquema 1.</b> <i>Mecanismo de reacción de <math>\beta</math>-Gal</i>	<b>4</b>
<b>Esquema 2.</b> <i>Ciclo de diseño de proteínas recombinantes</i>	<b>9</b>
<b>Esquema 3.</b> <i>Estructura de <math>\beta</math>-Gal de <i>E. coli</i></i>	<b>14</b>
<b>Esquema 4.</b> <i>Obtención de los CI</i>	<b>22</b>
<b>Esquema 5.</b> <i>Lavado de CI</i>	<b>26</b>
<b>Esquema 6.</b> <i>Dilución de CI</i>	<b>27</b>
<b>Esquema 7.</b> <i>Equilibrio de enzima liberada de CI <math>\beta</math>-Gal<sub>L</sub> con respecto a la que permanece estructurada en CI <math>\beta</math>-Gal<sub>CI</sub></i>	<b>37</b>

## Listado de Figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Actividad específica de <math>\beta</math>-Gal<sub>CI</sub> en función de la temperatura de inducción</i>	<b>32</b>
<b>Figura 2.</b> <i>Actividad específica de <math>\beta</math>-Gal<sub>CI</sub> en función de la temperatura de conservación de los CI</i>	<b>33</b>
<b>Figura 3.</b> <i>Actividad específica de <math>\beta</math>-Gal en función de la concentración de IPTG</i>	<b>34</b>
<b>Figura 4.</b> <i>Actividad específica de <math>\beta</math>-Gal<sub>CI</sub> en función de la temperatura</i>	<b>35</b>
<b>Figura 5.</b> <i>Actividad específica de <math>\beta</math>-Gal<sub>CI</sub> en función del pH</i>	<b>35</b>
<b>Figura 6.</b> <i>Actividad específica de <math>\beta</math>-Gal<sub>CI</sub> en función de la cantidad de proteína</i>	<b>36</b>
<b>Figura 7.</b> <i>Actividad específica de <math>\beta</math>-Gal<sub>L</sub> correspondiente al número de sobrenadante</i>	<b>37</b>
<b>Figura 8.</b> <i>Cantidad de proteína presente en cada sobrenadante</i>	<b>38</b>
<b>Figura 9.</b> <i>Espectro de emisión de triptófanos de <math>\beta</math>-Gal<sub>L</sub> correspondiente al S5 y S8. Espectro de emisión de la enzima soluble <math>\beta</math>-Gal<sub>s</sub></i>	<b>39</b>
<b>Figura 10.</b> <i>Curva de Saturación de <math>\beta</math>-Gal<sub>CI</sub> frente a lactosa</i>	<b>40</b>
<b>Figura 11.</b> <i>Electroforesis SDS PAGE de muestras provenientes de diferentes pellet</i>	<b>42</b>
<b>Figura 12.</b> <i>Frecuencia relativa de distribución de tamaños determinada por dispersión cuasielástica de la luz</i>	<b>43</b>
<b>Figura 13.</b> <i>Actividad específica en función de la temperatura de preincubación de <math>\beta</math>-Gal<sub>CI</sub> provenientes de pellets de diferentes lavados</i>	<b>44</b>
<b>Figura 14.</b> <i>Absorbancia a 420 nm del OPNG en función del factor de dilución de CI</i>	<b>45</b>

## Listado de Tablas

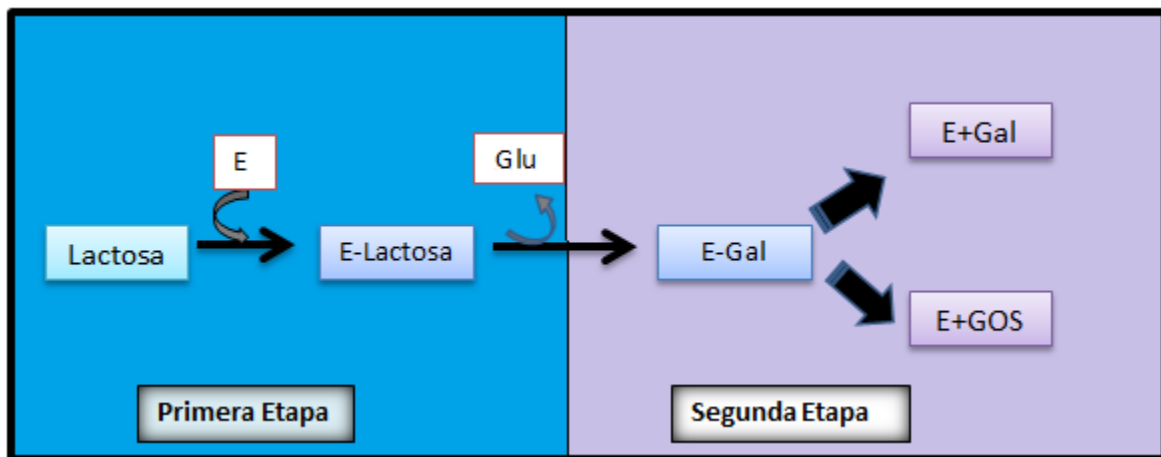
<b>Tabla 1.</b> <i>Microorganismos fuentes de <math>\beta</math>-Gal</i>	<b>6</b>
<b>Tabla 2.</b> <i>Producción heteróloga de <math>\beta</math>-Gal</i>	<b>12</b>
<b>Tabla 3.</b> <i>Los resultados mostrados corresponden a la media <math>\pm</math> s.e.m.</i>	<b>41</b>

**CAPÍTULO 1**  
**Introducción**

## INTRODUCCIÓN

La  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -Gal) es una enzima ampliamente distribuida, capaz de catalizar la hidrólisis de un enlace  $\beta$ -galactosídico terminal presente en carbohidratos, glicolípidos, glicoproteínas y glicosaminoglicanos[1]. Además es una enzima comercialmente importante. Su uso industrial se centra principalmente en la remoción de lactosa de la leche y del suero y la eliminación de azúcares de jugos de frutas [2], como también la capacidad de catalizar reacciones de transglicosilación donde se utiliza la lactosa como compuesto aceptor para formar di-, tri-, o mayores galactooligosacáridos (GOS)[3].

El mecanismo de reacción de  $\beta$ -Gal, que es común a la mayoría de las glicosidasas[4](Esquema 1), ocurre a través de la formación de un intermediario galactosil-enzima (E-Gal) que aparece después de la ruptura del enlace glicosídico  $\beta$ 1-4. En la lactosa, uno de los sustratos naturales más reconocidos de la enzima este enlace se establece entre la glucosa y la galactosa. Y el primer grupo que se libera es la glucosa (Glu) (primera etapa). Luego, la reacción continúa por dos vías posibles (segunda etapa de la reacción), la hidrólisis (liberando galactosa (Gal) al medio)[5] o la transgalactólisis (la galactosa se combina con un aceptor glicosídico) cuyos productos son galacto-oligosacáridos o transgalacto-oligosacáridos (GOS)[6, 7] muchos de ellos, considerados suplementos alimenticios por sus efectos prebióticos, pero además por ser carbohidratos de muy baja cariogenicidad y contenido calórico[8].



**Esquema 1.** Reacción catalizada por  $\beta$ -Gal (E). La lactosa es escindida en glucosa (Glu) y galactosa (Gal).

### *Lactosa en alimentos*

La lactosa es la fuente principal de calorías de la leche de la mayoría de los mamíferos. A excepción de los mamíferos marinos que la producen en muy baja proporción en sus leches o no la producen como el león marino[9]. La absorción intestinal de azúcares lácteos requiere de la previa hidrólisis de lactosa en sus monosacáridos constituyentes catalizada por la enzima lactasa presente en la membrana de las células del borde en cepillo del intestino. Se puede detectar actividad de lactasa en la superficie de la mucosa en el intestino humano desde la octava semana de gestación. La actividad crece hasta un máximo en la semana 34 debido al nacimiento. La capacidad de digerir lactosa durante el período de la lactancia materna es esencial para la salud de los lactantes como se demuestra por la deficiencia congénita de lactasa que es fatal si no se reconoce después de nacer[10]. Sin embargo, después de primeros meses de vida, la actividad de la lactasa comienza a disminuir. En la mayoría de los seres humanos, esta disminución de actividad a niveles indetectables después del destete, es consecuencia de la maduración normal del intestino donde ocurre una disminución en la expresión de lactasas. Sin embargo, los descendientes de las poblaciones que practicaron la domesticación de ganado ancestralmente, aún mantienen la capacidad de digerir la leche y otros productos lácteos en la edad adulta. La frecuencia de este "rasgo persistencia de la lactasa" es alta en las poblaciones del norte de Europa (más del 90% en los países escandinavos y Holanda), disminuye la frecuencia en el sur de Europa y Oriente Medio (50% en España, Italia y poblaciones árabes de pastores) y es baja en Asia y la mayor parte de África (1% en China, 5% a 20% de los agricultores de África Occidental); aunque es común en las poblaciones de pastores de África (90% en Tutsi, 50% en Fulani)[11] casi prácticamente nula en el continente americano[12]. La persistencia de la lactasa se hereda como un rasgo mendeliano dominante[13].

En el adulto la concentración excesiva de lactosa en el intestino grueso puede conducir a la deshidratación del tejido debido a los efectos osmóticos, la mala absorción de calcio debido a la baja acidez, y la fermentación de la lactosa por la microflora fermentativa resultando en diarrea, distensión abdominal, flatulencia, escaldado y calambres[14].

Por otra parte, la lactosa es un azúcar higroscópico con una tendencia importante a absorber sabores y olores y por lo tanto perjudica la conservación de alimentos

refrigerados. Además su baja solubilidad favorece la cristalización en los productos lácteos (como el dulce de leche) otorgándole una textura arenosa indeseable [15].

### *$\beta$ -Galactosidasas*

La tecnología de enzimas y en este caso particular de  $\beta$ -gal es una alternativa para afrontar el proceso de hidrólisis de lactosa de una manera bastante eficiente. Sus productos se utilizan como jarabe, que se aprovecha en productos de confitería, panadería, y las industrias de bebidas gaseosas [16]. Por otra parte, la remoción de lactosa no solo permite el consumo de leche por quienes padecen intolerancia a la lactosa, sino también puede resolver los problemas ambientales vinculados con el procesado y biodisponibilidad y eliminación del suero de leche [17].

La producción y disponibilidad de la enzima es una etapa clave en la mayoría de las aplicaciones mencionadas. Las  $\beta$ -Gals comerciales más utilizadas provienen de microorganismos. Estos ofrecen varias ventajas sobre otras fuentes disponibles tales como facilidad de manejo, una mayor tasa de multiplicación y un alto rendimiento. En la tabla 1 se listan los microorganismos más utilizados como fuente de  $\beta$ -Gals.

La enzima de *Escherichiacoli* sirve como modelo para la comprensión del mecanismo catalítico de  $\beta$ -gal, pero no se considera adecuada para su uso en alimentos debido a los problemas de toxicidad asociados con esta especie de bacteria [18].

**Tabla 1.** *Microorganismos fuentes de  $\beta$ -galactosidasa*

Fuente	Microorganismo
Bacterias	<p><i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>Rittmannii</i>  <i>Arthrobacter</i> sp.  <i>Bacillus acidocaldarius</i>, <i>B. circulans</i>, <i>B. coagulans</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>B. megaterum</i>,  <i>B. stearothermophilus</i>  <i>Bacteriodes polypragmatus</i>  <i>Bifidobacterium bifidum</i>, <i>B. infantis</i>  <i>Clostridium acetobutylicum</i>, <i>C. thermosulfurogens</i>  <i>Corynebacterium murisepticum</i>  <i>Enterobacter agglomerans</i>, <i>E. cloacae</i>  <i>Escherichia coli</i>  <i>Klebsiella pneumoniae</i>  <i>Lactobacillus acidophilus</i>, <i>L. bulgaricus</i>, <i>L. helveticus</i>,  <i>L. kefirifaciens</i>, <i>L. lactis</i>, <i>L. sporogenes</i>, <i>L. thermophilus</i>, <i>L. delbrueckii</i>  <i>Leuconostoc citrovorum</i>  <i>Pediococcus acidilactis</i>, <i>P. pentosus</i>  <i>Propionibacterium shermanii</i>  <i>Pseudomonas fluorescens</i>  <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>  <i>Streptococcus cremoris</i>, <i>S. lactis</i>, <i>S. thermophilus</i>  <i>Thermoanaerobacter</i> sp.  <i>Thermus rubus</i>, <i>T. aquaticus</i>  <i>Trichoderma reesei</i>  <i>Vibrio cholera</i>  <i>Xanthomonas campestris</i></p>
Hongos	<p><i>Alternaria alternata</i>, <i>A. palmi</i>  <i>Aspergillus foetidus</i>, <i>A. fonsecaei</i>, <i>A. carbonarius</i>, <i>A. oryzae</i>.  <i>Aurobasidium pullulans</i>  <i>Curvularia inaequalis</i>  <i>Fusarium moniliforme</i>, <i>F. oxysporum</i>  <i>Mucor meihei</i>, <i>M. pusillus</i>  <i>Neurospora crassa</i>  <i>Penicillium canescens</i>, <i>P. chrysogenum</i>, <i>P. expansum</i>, <i>Saccharopolyspora rectivergula</i>  <i>Scopulariaopsis</i>  <i>Streptomyces violaceus</i></p>
Levaduras	<p><i>Bullera singularis</i>  <i>Candida pseudotropicalis</i>  <i>Saccharomyces sanamensis</i>, <i>S. lactis</i>, <i>S. fragilis</i>  <i>Kluyveromyces bulgaricus</i>, <i>K. fragilis</i>, <i>K. lactis</i>, <i>K. marxianus</i></p>

Extraído de Panesar et al., 2011 [19]



### *Otras carbohidrasas*

La hidrólisis de polisacáridos como constituyentes fundamentales de muchos alimentos, representa una etapa esencial en el proceso productivo de industrias panaderas, y cerveceras, etc., para las cuales el uso de carbohidrasas es de gran importancia práctica. Por ejemplo, la fabricación de pan requiere la fermentación de los azúcares presentes en la masa de harina por parte de la levadura. El componente fundamental de la harina es el almidón, cuya fermentación industrial es facilitada por la adición de amilasas, enzimas de las que carece la levadura[20]. También se añaden otras enzimas, como xilanasas, que mejoran la textura del pan[21]. De igual modo, en la producción de la cerveza se produce un proceso fermentativo realizado por una levadura del género *Saccharomyces* que carece de capacidad amilolítica. En la fabricación tradicional de cerveza, el almidón del grano de cebada se digiere por acción de la actividad  $\alpha$ -amilasa sintetizada por el propio grano al germinar (malta), pero la adición de amilasas es una práctica generalizada en la mayoría de las industrias cerveceras. También es frecuente el empleo de  $\beta$ -glucanasas (celulasas) para digerir el material celulósico que acompaña al almidón procedente de la cebada. La presencia de glucano produce una elevada viscosidad del mosto de cerveza, lo que causa problemas para su filtración[22].

La industria de procesado de almidón consume enormes cantidades de carbohidrasas:  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa principalmente, pero también pululanasa y xilanasas. La hidrólisis enzimática del almidón es esencial para dos tipos de procesos industriales. Uno de ellos es la obtención de azúcares sencillos, oligo y monosacáridos, empleados para elaborar distintos tipos de alimentos: bebidas, dulces, etc. Por otra parte, el almidón se utiliza como materia prima para la obtención de etanol, cuya importancia como combustible líquido, sustitutivo de la gasolina, crece de forma notable. Las fábricas de detergentes son otras industrias que consumen enzimas en cantidades ingentes. En este caso, son determinantes las actividades lipasa y proteasa, pero también son importantes distintas carbohidrasas, como amilasas, celulasas y mananasas. Las industrias que fabrican productos para la alimentación animal hacen un amplio uso de enzimas que aumentan la digestibilidad de las materias primas de origen vegetal mediante el empleo de celulasas y xilanasas. Finalmente, las industrias papeleras y textiles también emplean amilasas, celulasas y xilanasas con distinta finalidad. Por ej., en la fabricación de papel, la

eliminación de xilano por adición de xilanasas juega un importante rol en el refinado de la celulosa, contribuyendo a blanquear la pasta de papel[23, 24].

#### *Enzimas inmovilizadas*

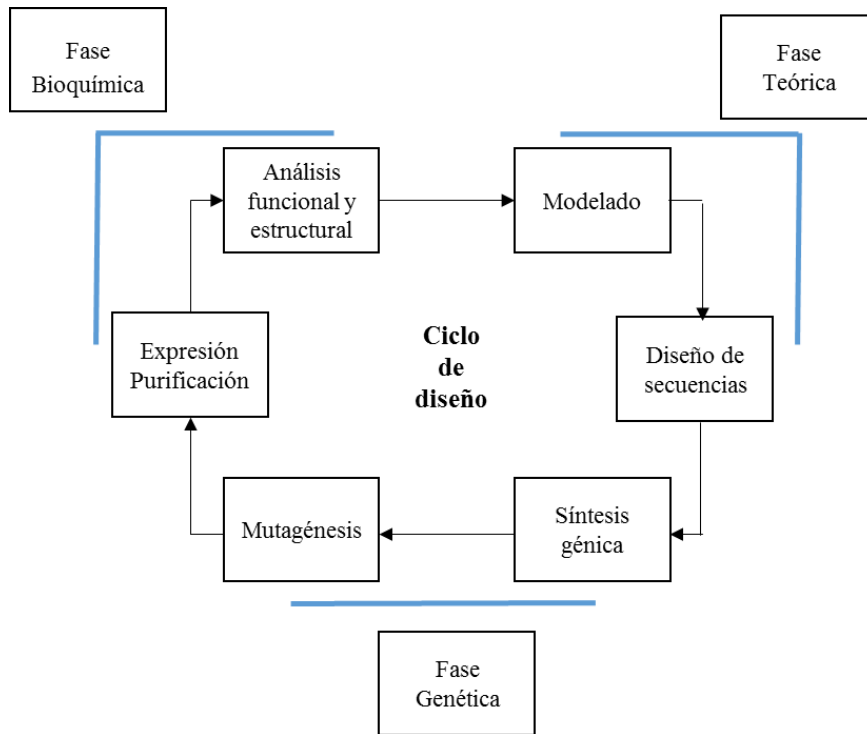
Si bien a nivel industrial aún se continúa con la utilización de enzimas libres, el uso de enzimas inmovilizadas es un área de gran interés por sus potenciales beneficios[25]. La posibilidad de reutilización de la enzima y la operación en procesos de catálisis continuos tienen una gran importancia económica. Otra ventaja es la posibilidad de separar la enzima (inmovilizada en un formato particular) fácilmente del resto de la mezcla de reacción. Por otro lado se comprobó que la enzima inmovilizada adquiere mayor estabilidad aunque no siempre se mejora la eficiencia catalítica[26].

En la mayoría de los casos se recurre al uso de estas enzimas inmovilizadas para el procesado catalítico de carbohidrasas[27]. Actualmente  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada se utiliza intensamente para hidrolizar lactosa de leche o suero y para la producción de GOS[6, 19, 28].

#### *Enzimas recombinantes*

Las enzimas que se obtienen a partir de la tecnología del ADN recombinante representan una opción interesante debido al mayor rendimiento en la producción y mejores alternativas metodológicas de purificación. Las propiedades funcionales de una proteína derivan de su estructura que, en definitiva, está determinada por la secuencia de nucleótidos del gen que la codifica. Las propiedades funcionales de una proteína derivan de su estructura que, en definitiva, está determinada inicialmente por la secuencia de nucleótidos del gen que la codifica, por las modificaciones postraduccionales (si es que hubiere) y el medio en el que se encuentra. El desarrollo de la biología molecular durante los últimos años ha aportado innumerables procedimientos experimentales y computacionales que permiten analizar y manipular el material genético. Esto hace posible, al menos en teoría, reescribir el texto de una secuencia génica para modificar a voluntad las propiedades de la proteína codificada. La principal limitación para conseguir este objetivo es que la relación entre estructura y función de las proteínas es de una gran complejidad, y en la mayor parte de los casos es imposible saber de antemano *a priori* qué alteración estructural sería necesaria realizar para conseguir determinada propiedad en la proteína. En términos operativos, podemos definir la ingeniería de proteínas como la modificación estructural

realizada mediante la manipulación del gen codificante, por la cual se consigue un cambio funcional determinado. La máxima expresión de la ingeniería de proteínas es el diseño de proteínas, que consiste en la definición y creación *denovo* de una secuencia proteica cuya estructura la haga apta para desempeñar determinada función. La ingeniería de proteínas opera de forma iterativa, siguiendo un proceso cíclico que alterna etapas en las que se planean y ejecutan los cambios a realizar con otras en las que se evalúa el resultado de los mismos. A este proceso se le ha denominado ciclo de diseño:



**Esquema 2.** *Ciclo de diseño* (tomado de Polaina, J, 2004).

La parte experimental de la ingeniería de proteínas comienza por el aislamiento del gen que codifica la proteína sobre la que queremos actuar e implica la generación de mutaciones en la secuencia del mismo, que se verán traducidas en cambios de la secuencia proteica. En el caso de que se tengan hipótesis razonables sobre qué cambios concretos pueden ocasionar el efecto funcional buscado, éstos se introducen mediante mutagénesis dirigida, lo cual da lugar a sustituciones definidas de aminoácidos. En algunos casos, el efecto deseado puede obtenerse combinando dominios o motivos estructurales provenientes de distintas proteínas, para generar una proteína híbrida o quimera. Sin embargo, la

situación más frecuente cuando se plantea modificar la función de una proteína es que no pueda precisarse qué tipo de cambio estructural es preciso realizar para obtener el efecto deseado. En estos casos, una estrategia que tiene aplicación extraordinaria es la evolución dirigida. Esta aproximación experimental mimetiza a escala de laboratorio el proceso de evolución natural, alternando etapas de mutación génica aleatoria con otras de selección fenotípica, aunque en la evolución dirigida el sujeto de la mutagénesis no es un individuo sino un gen concreto, o un conjunto de genes. Este método tiene algunos requerimientos: por ej., el gen que codifica la proteína que se quiere modificar debe expresarse funcionalmente en un huésped adecuado, normalmente *E. coli*, *S. cerevisiae*, u otro microorganismo fácilmente manipulable. Otro requerimiento es disponer de un procedimiento eficaz para seleccionar, o al menos poder ensayar la función buscada [29]. Las técnicas de biología molecular proporcionan dos herramientas muy eficaces para realizar la mutagénesis aleatoria de genes aislados. Una es la conocida como “error-prone PCR” consistente en la amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del gen que codifica la proteína de interés en condiciones que inducen a la DNA-polimerasa a cometer errores [30]. El otro procedimiento es el “DNA-shuffling”, que consiste en la fragmentación de la secuencia que se desea mutar mediante digestión con DNAsa, seguida de un reensamblaje de la misma mediante PCR [31]. Algunos ensayos funcionales pueden ser considerablemente complejos, y al mismo tiempo encontrar el mutante que conduce a la modificación deseada puede implicar un número muy elevado de ensayos. Para resolver estas dificultades cobra un creciente auge el empleo de procesos robotizados o “highthroughput screening” [32]. La fase bioquímica del ciclo de diseño tiene un objetivo inmediato, que consiste en la purificación de la proteína, como etapa previa para la resolución de su estructura tridimensional. Los logros registrados por la ingeniería de proteínas en los últimos años son, en gran medida, debidos al progreso de las técnicas que conducen a la resolución estructural, como la resonancia magnética nuclear y muy particularmente la cristalografía de rayos X. Este progreso desde la resolución de moléculas relativamente simples, como mioglobina, hemoglobina y lisozima a la solución estructural de moléculas de mayor tamaño como la  $\beta$ -Gal [33] y además estructuras supramoleculares como virus completos o ribosomas [34, 35]. Las coordenadas atómicas que definen las estructuras de todas las proteínas cuyos datos se han publicado, se encuentran disponibles

en una base centralizada de datos, el “Protein Data Bank” (<http://www.pdb.org>). La determinación de la estructura de una proteína es la mejor herramienta disponible para explicar cómo ejerce su función. Por ejemplo, la topología del centro activo de una enzima y la disposición de los residuos catalíticos permiten visualizar cómo la enzima interacciona con el sustrato para facilitar la reacción que cataliza. Las hipótesis derivadas de este estudio pueden abordarse experimentalmente ensayando la actividad en variantes de la enzima portadoras de mutaciones definidas. En el caso de muchas proteínas, los ensayos funcionales suelen ser más complejos que un simple ensayo enzimático y frecuentemente requieren el empleo de técnicas de biología celular. Junto a los progresos de las técnicas que permiten la resolución estructural de proteínas, otro factor decisivo para el desarrollo de la ingeniería de proteínas fue la emergencia de las nuevas disciplinas de genómica y proteómica. La secuenciación sistemática de genes de distintas especies ha suministrado la estructura primaria de un vasto número de proteínas. Existen distintas bases de datos que almacenan las secuencias de genes y proteínas y también hay numerosos recursos informáticos “on-line” que permiten el análisis comparativo de las mismas. Entre ellos, merece especial mención el “National Center for Biotechnology Information” (National Institutes of Health, USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Uno de los principales retos de la bioinformática es poder predecir de manera fiable la estructura tridimensional de una proteína en base a su secuencia primaria. Aunque este objetivo dista de conseguirse de forma plena, a la fecha se han conseguido avances muy importantes utilizando técnicas de modelado comparativo, que deducen la estructura terciaria de una proteína mediante comparación con otras proteínas de secuencia homóloga y estructura conocida. Existen en Internet diversos servidores informáticos que proporcionan modelos estructurales de proteínas a partir de su secuencia. La estrecha vinculación existente entre la estructura de una proteína y su función hace insoslayable el disponer de una sólida información estructural para acometer con cierta garantía de éxito cualquier planteamiento de ingeniería de proteínas.

El uso de sistemas de expresión recombinante ha sido vital no sólo para el progreso de la producción de  $\beta$ -Gala gran escala para fines hidrolíticos o sintéticos sino también para la identificación y caracterización bioquímica de esta enzima. En la tabla 2 se resume el rendimiento de la producción heteróloga (recombinante) de  $\beta$ -Gal principalmente en *E. coli*.

**Tabla 2.** Rendimiento de producción heteróloga de β-Gal.

Fuente de la enzima	Huésped de expresión	Vol. de cultivo y rendimiento de purif. de β-Gal	Referencias
<i>A. acidocaldarius</i> <sup>a</sup>	<i>E. coli</i>	1l: 10 mg; 8680 U	Di Lauro et al, 2008
	<i>Pichiapastoris</i>	4 l: 1.8 mg; 454 U	Yuan et al., 2008
<i>A. ikkense</i> <sup>b</sup>	<i>E. coli</i>	200 ml: 2.5 mg; 21 U	Schmidt and Stougaard, 2010
<i>A. arthrobacter sp.32c</i> <sup>b</sup>	<i>E. coli</i>	1 l: 27 mg; 4209 U	Hildebrandt et al., 2009
	<i>P. pastoris</i>	1 l: 137 mg; 21,194 U	
<i>B. stearothermophilus</i> <sup>a</sup>	<i>B. subtilis</i>	n.r.: 209 mg; 26,200 U	Chen et al., 2008
<i>B. infantis</i> <sup>a</sup>	<i>E. coli</i>	n.r.: 6.5 mg; 3697 U	Hung and Lee, 2002
<i>C. saccharolyticus</i> <sup>a</sup>	<i>E. coli</i>	n.r.: 3.2 mg; 678 U	Park and Oh, 2010a <sup>c</sup>
<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	2 l: datos de purificación no reportado	Lu et al., 2009c
<i>L. acidophilus</i> <sup>a</sup>	<i>E. coli</i>	n.r.: 7.34 mg; 317 U	Pan et al., 2010
<i>L. acidophilus, L. plantarum,</i> <i>L. reuteri, L. sakei</i>	<i>L. plantarum</i>	1 l: 245 U/mg ( <i>L. reuteri</i> enzima en <i>L. plantarum</i> )	Halbmayer et al., 2008
	<i>L. sakei</i>		
	<i>L. lactis</i>	1170–14,000 U/l de cultivo (purificación no realizada)	Maischberger et al., 2010
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>E. coli</i>	Datos de purificación no reportado	Rhimi et al., 2009
<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	50 ml: 1.7 mg; 265 U	Iqbal et al., 2010
<i>L. reuteri</i>	<i>E. coli</i>	1l: 461 mg; 83,000 U	Nguyen et al., 2007c
<i>P. thiaminolyticus</i>	<i>E. coli</i>	1l: Datos de purificación no reportado	Benešová et al., 2010c
<i>Pseudoalteromonas</i> <sup>b</sup>	<i>E. coli</i>	1l: 13.8 mg; 1490 U	Cieśliński et al., 2005
<i>P. woesei</i> <sup>a</sup>	<i>E. coli</i>	1 l: 28 mg; 151,200 U	Dąbrowski et al., 2000c
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>E. coli</i>	1 l: 4.86 mg; 269 U	Leahy et al., 2001
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>E. coli</i>	2 l: 8.2 mg; 24,350 U	Campuzano et al., 2009c
<i>Thermotogamaritima</i> <sup>a</sup>	<i>E. coli</i>	500 ml: 7.6 mg; 530 U	Kim et al., 2004c
		100 ml: 40.4 mg; 873 U	Li et al., 2009ac
<i>Thermussp.</i> <sup>a</sup>	<i>E. coli</i>	150 ml: datos de purificación no reportados	Kang et al., 2005c
		1 l: 900,000–958,000 U/mg	Pessela et al., 2003c

Referencias: <sup>a</sup>) Enzima termófila. <sup>b</sup>) Enzima adaptada al frío. <sup>c</sup>) Proteína recombinante His-Tag.

Extraído de Oliveira et al, 2011 [36].

### β-Gal en ambientes heterogéneos.

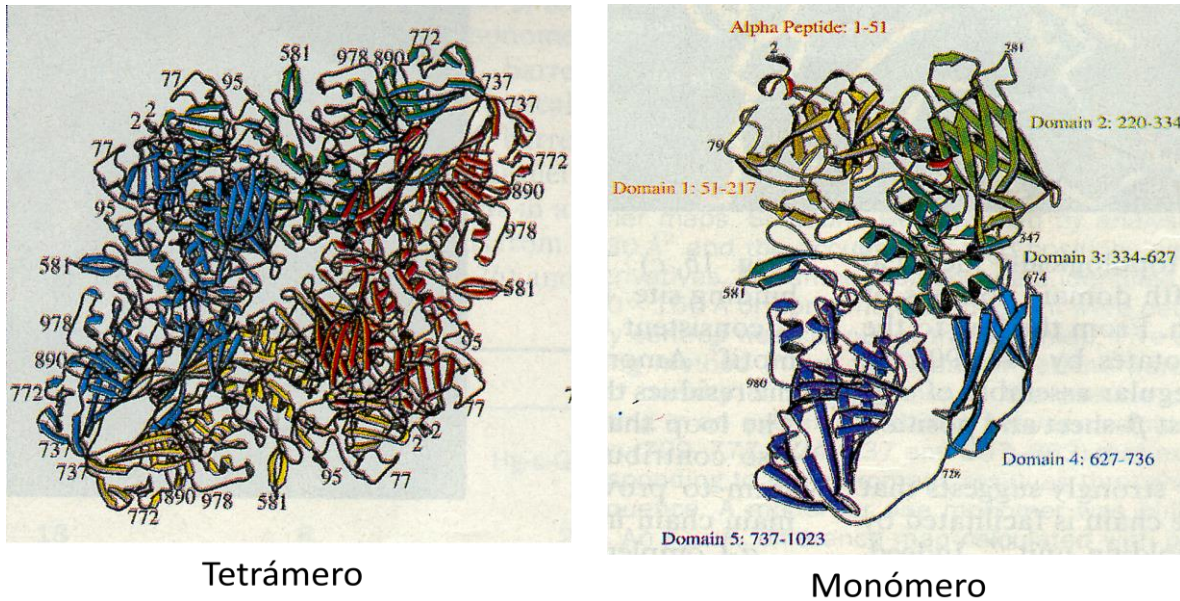
Teniendo en cuenta que la relación entre estructura y función de las proteínas es de una gran complejidad y difícil de predecir, en nuestro laboratorio estudiamos desde hace muchos años cómo los ambientes heterogéneos afectan la relación estructura función de β-Gal. Para ello, producimos la proteína recombinante β-Gal<sub>His</sub>, y demostramos que cuando la enzima soluble se incorpora a un sistema de reacción en presencia de interfases lipídicas, como las formadas por estructuras de autoagregación de baja curvatura como vesículas multilamelares (MLVs), se observa un aumento en la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) de hidrólisis de lactosa[37]. Esta modulación de la actividad enzimática podría estar relacionada en parte, con el cambio en el mecanismo de la reacción, debido a un efecto tipo nucleofílico inducido por el cambio en la condición energética de las moléculas de agua

que participan en la segunda etapa (ver esquema 1) de la reacción (agua libre-agua *versus* estructurada en la interfase lipídica) cuando comparamos la reacción en el seno de una solución con la que transcurre con la enzima interactuando con la membrana[38] pero además porque la enzima adsorbida a interfases queda atrapada en un estado parcialmente plegado[39]. Mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) también demostramos que  $\beta$ -Gal no presenta agregación por temperatura cuando interactúa con MLVs. Si bien se reportaron estados de oligomerización para péptidos como  $\alpha$ -hemolisina una vez que se inserta en la membrana[40] y además se describieron estados oligoméricos de proteínas intrínsecas de membrana como proteínas transmembranas[41]. Podríamos sugerir que cuando  $\beta$ -Gal soluble se incorpora a la interfase al estar parcialmente desplegada se favorecería la oligomerización.

#### *Producción de $\beta$ -Gal recombinante*

La  $\beta$ -Gal recombinante ( $\beta$ -Gal<sub>His</sub>) que producimos contiene en la secuencia primaria 6 residuos de histidina en el carboxilo terminal que facilita la purificación de la enzima por una cromatografía de afinidad por ión metal inmovilizado (IMAC)[42]. La localización de los 6 residuos de histidina fue incorporada en el carboxilo terminal, alejada del sitio activo en la enzima plegada[43] (ver Esquema 3. de la estructura) pero además se reportó que la adición de histidinas en el amino terminal de  $\beta$ -Gal afecta negativamente su función[44]. Si bien existen pocas evidencias en la literatura donde la adición de los residuos de histidina, afecta la función o la estructura de las proteínas[45] estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que  $\beta$ -Gal<sub>His</sub> disminuye su actividad utilizando tanto orto-nitrofenil-galactopiranosido (ONPG) como lactosa como sustratos, cuando la comparamos funcionalmente con una  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, nativa de origen comercial ( $\beta$ -Gal<sub>WT</sub>)[43]. Asumiendo que  $\beta$ -Gal<sub>His</sub> mantiene la estructura de homotetrámero entonces cada monómero contribuiría para que la enzima recombinante contenga un total de 24 aminoácidos de histidina adicionales. La presencia de estos grupos podría inducir una nueva conformación de la proteína que afecte su función.





**Esquema3.** Estructura de  $\beta$ -Galde *E. coli*: Tetrámero: conformado por cuatro monómeros, forma activa de la enzima.

### *$\beta$ -galactosidasa en cuerpos de inclusión*

Cuando  $\beta$ -Gal se sobreexpresa en *E. coli*, se forman los llamados cuerpos de inclusión (CI)[46, 47]. Estos CI son agregados intracelulares de forma generalmente esférica, y formados mayoritariamente por la proteína que se sobreexpresa. La formación de estas partículas insolubles ha sido descrita como el cuello de botella de mayor importancia en la producción microbiana de proteínas recombinantes[48]. Durante mucho tiempo representaron un obstáculo en la producción industrial de enzimas solubles y de biofármacos.

Luego de diversas investigaciones se logra reconocer a los CI como contenedores de grandes cantidades de proteínas funcionales con valor directo en aplicaciones industriales y biomédicas[49]. Por otro lado, la fácil y económica obtención de  $CI_{\beta\text{-Gal}}$  con actividad enzimática, aporta beneficios ya que se evitan las laboriosas etapas de purificación[50].

Estudios de velocidad de proteólisis enzimática demostraron que estos agregados presentan una arquitectura heterogénea en su interior y que coexisten distintas poblaciones de proteína en estados conformacionales diferentes[51].

### *Cuerpos de inclusión*



En el año 1975 Prouty y sus colegas describieron por primera vez la formación de gránulos intracelulares densos, amorfos que aparecían cuando *E.coli* era cultivada en presencia del amino ácido canavanina[52]. Estos gránulos, compuestos principalmente de cadenas polipeptídicas podían ser solubilizados en soluciones de dodecilsulfato de sodio (SDS) y no aparecían confinados por membranas lipídicas. Durante muchos años, estas estructuras consideradas “aberrantes” aparecían en respuesta al crecimiento de la bacteria en condiciones no fisiológicas. Más tarde, la agregación de proteínas *in vivo* se consideró un fenómeno generalizado, que se manifiesta en las células que sobreexpresan proteína heteróloga o proteínas nativas más allá de un cierto nivel, y en las células expuestas a estrés fisiológico[53]. Existe un consenso en la bibliografía donde la agregación de las proteínas ocurre debido al alto nivel de expresión y por lo tanto una gran concentración local de las cadenas polipeptídicas emergentes de los ribosomas, un plegado ineficiente y la saturación de chaperonas a nivel intracelular[54, 55]. Estos agregados se localizan en el citoplasma o en el periplasma de la bacteria. Además, las mutaciones como sustituciones de aminoácidos, deleciones, o inserciones pueden interferir con el plegamiento correcto del polipeptido, causando la formación de agregados de proteínas[56].

Estos agregados intracelulares son partículas densas que refractan el haz de electrones en microscopía electrónica y por lo tanto también se los ha llamado cuerpos refringentes.

Se han producido un millar de proteínas de origen microbiano, de mamíferos y plantas obtenidas y renaturalizadas a partir de cuerpos de inclusión formados en *E. coli*. En la mayoría de los casos la obtención de proteínas puras y activas a partir de cuerpos de inclusión involucra tres pasos[53]:

1. Aislamiento de los CI.
2. Solubilización.
3. Remoción de impurezas y/o replegamiento.

El paso tres puede ser más o menos complejo de acuerdo a la calidad del cuerpo de inclusión que dependerá de la presencia o no de impurezas en su estructura[57].

### *Composición de los cuerpos de inclusión*

Un paso clave en la preparación de los cuerpos de inclusión es la manera en que se produce la lisis y velocidad de centrifugación diferencial de los restos celulares. La eficacia de este paso depende en gran medida del método de disrupción celular y la centrifugación a baja velocidad que da como resultado la sedimentación de las vesículas de membrana y fragmentos de pared celular junto con los cuerpos de inclusión. Además, otros componentes celulares pueden llegar a ser adsorbidos no específicamente sobre la superficie de cuerpos de inclusión después de la lisis celular.

La presencia de sustancias contaminantes causa gran número de complicaciones durante los pasos de solubilización y replegamiento posterior. Las proteasas pueden co-purificar con cuerpos de inclusión durante la alta velocidad de centrifugación [58]. La utilización de elevadas concentraciones de agentes desnaturizantes para solubilizar los CI puede activar a muchas proteasas. Las proteasas activas podrían escindir rápidamente proteínas de interés que se encuentran desplegadas en presencia del agente desnaturizante.

La obtención y el estudio de los CI $_{\beta\text{-Gal}}$  significan un gran desafío para nuestro grupo de investigación. Tenemos las herramientas para abordar el análisis de la relación estructura-función de  $\beta$ -Gal en estos agregados. Y significa un aporte interesante al deslactosado de alimentos la posibilidad de contar con agregados enzimáticos, estables y reusables.

## **HIPÓTESIS**

La producción de  $\beta$ -galactosidasa estructurada en cuerpos de inclusión en la bacteria *E. coli* es viable y las propiedades cinéticas se relacionan con las características del agregado.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Producir cuerpos de inclusión de  $\beta$ -galactosidasa y evaluar su actividad/estabilidad frente a la hidrólisis de lactosa.

### **Objetivos específicos**

- Establecer la metodología apropiada para lograr la producción de cuerpos de inclusión de  $\beta$ -galactosidasa.
- Caracterizar la estabilidad funcional de los cuerpos de inclusión.
- Evaluar los parámetros cinéticos de la enzima proveniente de CI.

**CAPÍTULO 2**  
**Materiales y Métodos**

## MATERIALES y MÉTODOS

### 2.1-Sobreexpresión de $\beta$ -galactosidasa

Se utilizó la cepa bacteriana de *E.coli* (BL21 $\lambda$ pir-codonplus) donada por el laboratorio del Dr Carlos Argaraña y transformada con el plásmido pET 26+ conteniendo el gen de  $\beta$ -galactosidasa[43]. El plásmido pET 26+ contiene, además, la secuencia que le da resistencia a la Kanamicina a la bacteria que lo contienen.

Se tomó con un ansa estéril una muestra de bacterias congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para ser incubadas en medio de cultivo Luria Bertani (LB) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda una noche(ON) con agitación a 200 rpm. Al día siguiente se constató el crecimiento de las bacterias por el aumento en la turbidez del medio. Se tomaron 6ml del cultivo para ser centrifugados a 4.000 rpm (10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). El pellet se resuspendió en 600ml de LB con kanamicina (20  $\mu\text{g/ml}$ ) y nuevamente se permitió que las bacterias crezcan a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación a 200 rpm.

El cultivo creció hasta que alcanzó una densidad óptica adecuada ( $\text{DO}=0,4-1$ ) durante 3 horas aproximadamente. Seguidamente se indujo el cultivo con IPTG 0,4 mM. Se realizaron pruebas de temperatura de inducción en un rango de 20 a  $37^{\circ}\text{C}$  ON.

### 2.2-Producción de cuerpos de inclusión de $\beta$ -Galactosidasa recombinante

Posteriormente, las células se concentraron por centrifugación, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 20 ml de buffer fosfato 0,05 M y NaCl 1mM, pH 6.8. Luego las células fueron lisadas por tres ciclos consecutivos de sonicación, congelación (aire líquido  $-196^{\circ}\text{C}$ ) y descongelación (baño termostatizado a  $30^{\circ}\text{C}$ ).

Sonicación: Los ciclos de trabajo fueron de 5s para sonicación y de 2s de pulsado, con amplitud del 40 % y frecuencia de 40 kHz.

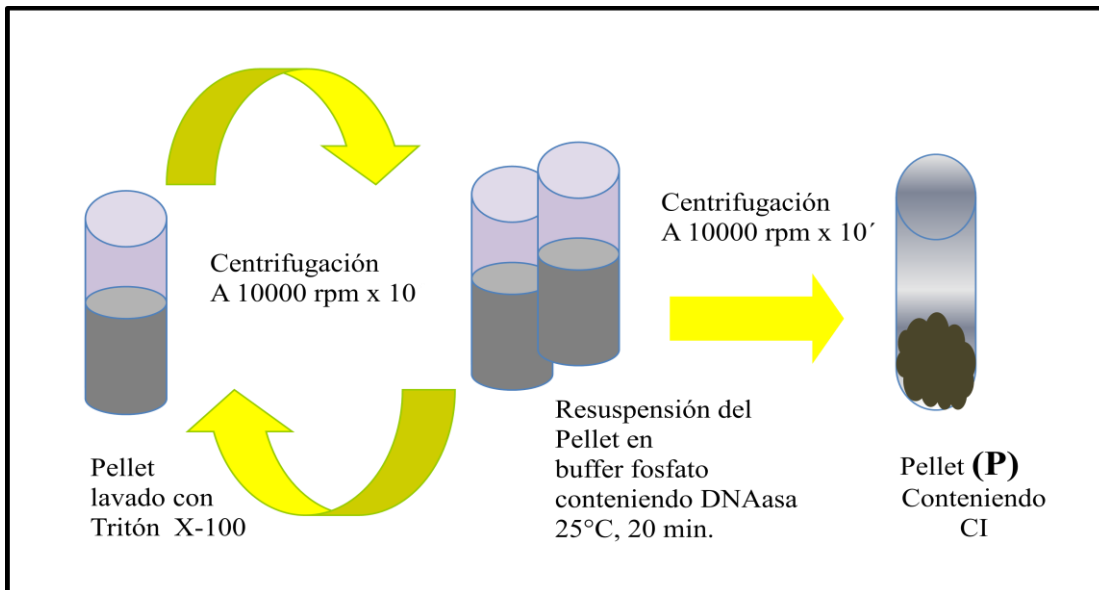
#### 2.2-1 Obtención de $\text{CI}_{\beta\text{-Gal}}$

El pellet obtenido del lisado bacteriano, se resuspendió en 1,5 ml de la solución de lavado N°1 (0,5% TritonX-100, 50mM Tris-HCl pH8, 100mM NaCl), y se centrifugó a 12000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en solución de lavado N°2 (buffer fosfato 0,05 M, pH 6,8) al cual se le adicionó ADN a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos, posteriormente se realizó una centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos. La

muestra resultante fue sometida a 2 lavados consecutivos con solución de lavado N°2. El pellet resultante (P) contuvo los CI (esquema 4).

### 2.2-2 $\beta$ -Gal en CI

La presencia y pureza de  $\beta$ -Gal en CI se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). El contenido de proteína se cuantificó por el método de Lowry[59].



**Esquema 4.** Obtención de los CI (ver detalles en el texto).

### 2.3- Medición de la actividad de $\beta$ -Gal estructurada en CI ( $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>)

La actividad de  $\beta$ -Gal se determinó por el método de Huber y colaboradores. El medio de reacción contuvo 20  $\mu$ l de muestra de CI (entre 0,1 y 0,2 mg/l) y 80  $\mu$ l lactosa (250 mM o 9 P/V %), ambos componentes disueltos en buffer fosfato 0,05 M pH 6,8, la reacción se mantuvo a 37°C durante 20 minutos (condición estándar), para detener la reacción el sistema de incubación se calentó a 100°C durante 5 minutos, de este modo la proteína se desnaturaliza.

Uno de los productos de hidrólisis (glucosa) se cuantificó por el método de glucosa oxidasa.

Eventualmente se determinó la actividad enzimática de  $\beta$ -Gal<sub>Cl</sub> en presencia de orto-nitroenil-galactopiranosido (ONPG)[38, 60]. El sistema de incubación contuvo 0,3 ml de buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,8, 0,03 ml de sustrato (ONPG) en un rango de 0 a 3 mM y 0,003 ml de enzima ( $\beta$ -Gal<sub>Cl</sub>). Se incubó a 37°C durante 15 min. La reacción se detuvo por el agregado de 0,03 ml de carbonato de sodio 1,4 M (0,18 M en el volumen final). Se leyó la absorbancia del ONP<sub>x</sub> formado (ONP<sub>x</sub> es la forma disociada de ONP que predomina en medios altamente básicos) a 420 nm por espectrofotometría visible. Para el cálculo de la concentración de ONP formado se consideró un coeficiente de extinción molar de ONP<sub>x</sub> de 4.5 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Se realizaron curvas de saturación con sustrato a los fines de determinar  $V_{\max}$  y  $K_M$ . 1 UI de enzima se definió como 1  $\mu$ mol de ONP formado por min. a 37°C[38].

#### *2.3-1 Determinación de los parámetros cinéticos de $\beta$ -Gal<sub>Cl</sub>*

Los parámetros cinéticos se determinaron por medio de un análisis de regresión no lineal por el método de los cuadrados mínimos de las curvas de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato, ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten[61].

#### *2.3-2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de $\beta$ -Gal<sub>Cl</sub>*

Para evaluar el efecto de la temperatura, la actividad enzimática de  $\beta$ -Gal<sub>Cl</sub> se midió en un rango de temperatura de 22°C a 66°C a manteniendo constante la concentración del sustrato lactosa 4%, el tiempo de incubación (20 min.) y el pH con buffer fosfato de sodio 0,05 M (pH=6.8).

#### *2.3-3 Efecto del pH sobre la actividad de $\beta$ -Gal<sub>Cl</sub>*

Para estudiar el efecto del pH se midió la actividad de  $\beta$ -Gal<sub>Cl</sub> en un rango de pH de 3 a 9 logrado por buffer citrato (3 a 6,21), fosfato (5,83 a 8,13) y Tris/HCl (7,53 a 9) manteniendo constante la concentración del sustrato lactosa 4%, el tiempo de incubación (20 min.) y la temperatura de 37°C.

#### *2.3-4 Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad de $\beta$ -Gal<sub>Cl</sub>*

El efecto de la enzima se determinó midiendo la reacción a 37°C y buffer fosfato 0,05 M pH 6,8 durante 20 min como se describió en el primer párrafo de la sección 2.3.

## **2.4-Estabilidad funcional y estructural de $\beta$ -Gal estructurada en CI**

### *2.4-1 Estabilidad funcional de CI*

#### *2.4-1-1 Temperatura de conservación*

En primer lugar se estudió el efecto de la temperatura de conservación (-20°C o 4°C) sobre la funcionalidad de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>. Los pellets libres de sobrenadante se preincubaron a las dos condiciones de temperatura. Después de 5 días se resuspendieron en buffer fosfato de sodio y se evaluó la actividad enzimática de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>.

#### *2.4-1-2 Funcionalidad de la $\beta$ -Gal*

En este trabajo de tesis evaluamos la respuesta de los CI a su conservación por períodos prolongados y la posible desorción ( $\beta$ -Gal<sub>L</sub>) de la enzima desde estos agregados. Se resuspendió el pellet (P) en buffer fosfato de sodio pH 6,8 se dejó interactuar 10 min., se midió la actividad de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> como se describió en la sección 3 de M & M y posteriormente se centrifugó la muestra a 10.000 rpm durante 10 min. a 4°C y  $\beta$ -Gal liberada de los CI, ( $\beta$ -Gal<sub>L</sub>), que apareció en la fracción sobrenadante (S), fue sometida a estudios cinéticos y estructurales. La proteína se cuantificó por el método de Lowry[59]. Este procedimiento se repitió cada 15 días durante 6 meses (Ver Esquema 5).

#### *2.4-1-3 Dilución de los CI*

Se midió la actividad enzimática de muestras provenientes de un único pellet (P) y sobrenadante (S), pero sometidas previamente a sucesivas diluciones. Como se muestra en el (Esquema 6).

#### *2.4-1-4 Resistencia a la inactivación térmica de $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>*

Se realizaron estudios de reversibilidad de la actividad de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>, preincubandola muestra durante 30 minutos a distintas temperaturas y luego se midió la actividad en condiciones estándar como se describió previamente[62].

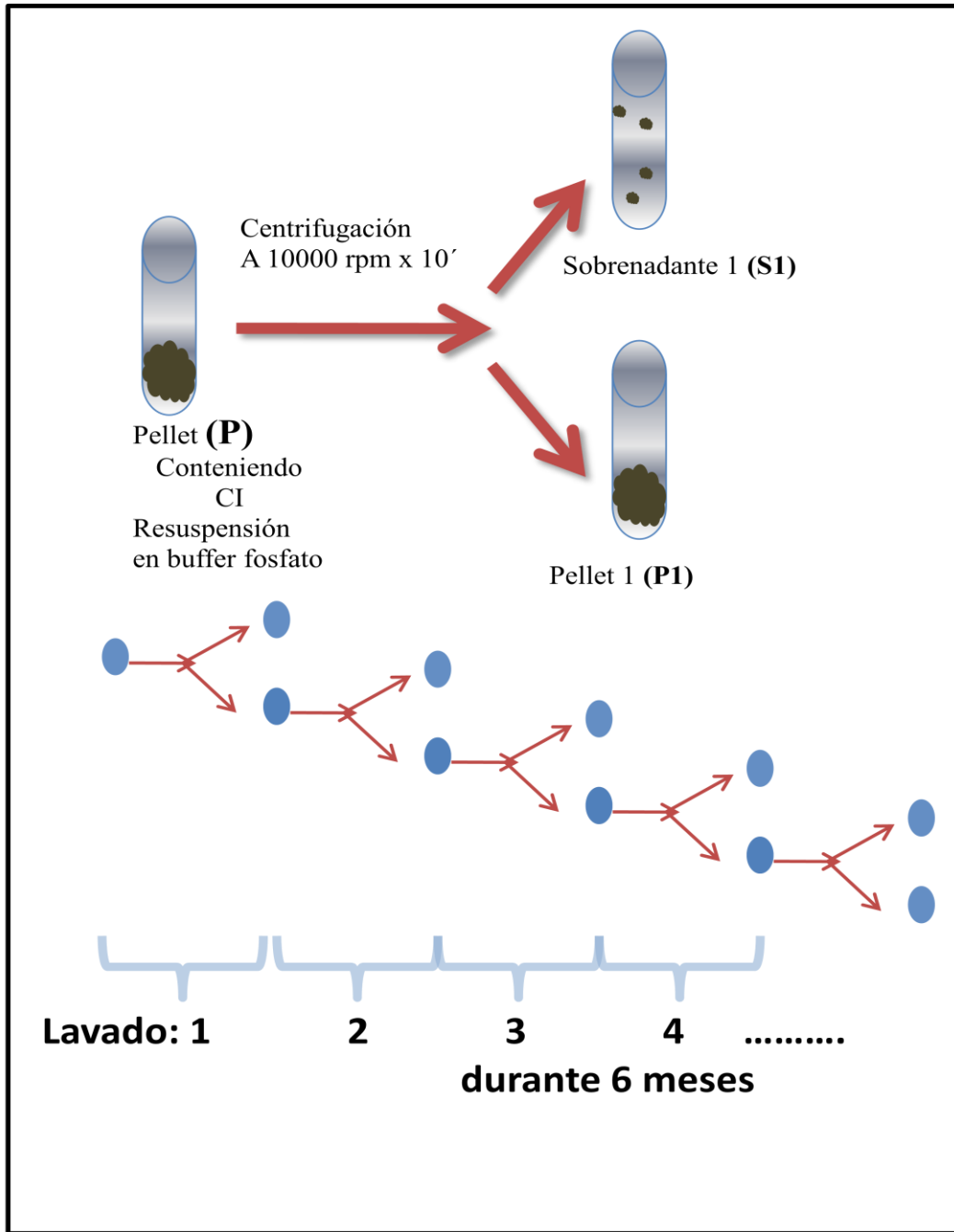


#### *2.4-2 Estabilidad estructural de CI*

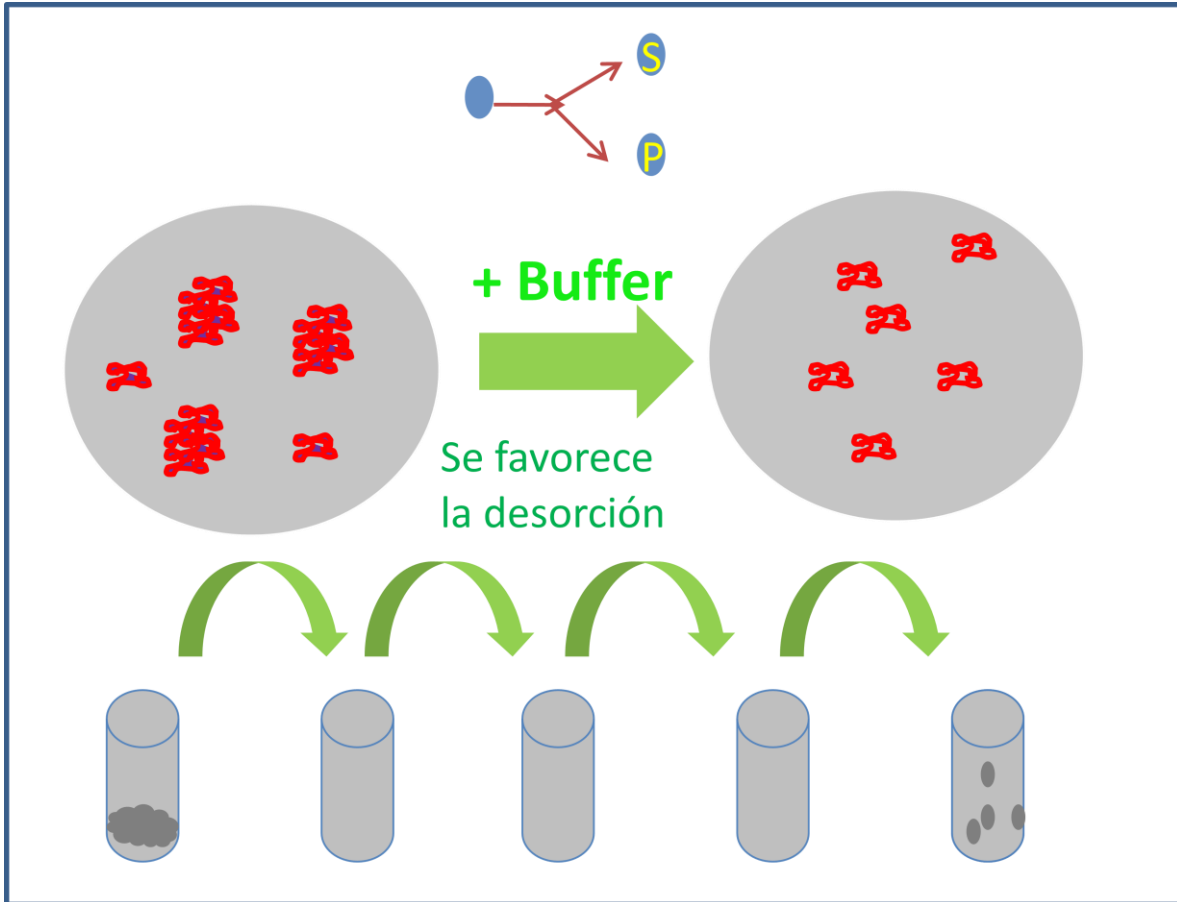
La estructura de  $\beta$ -Gal en los CI se estudió por espectrofluorometría. Se realizó un espectro de emisión intrínseca de la fluorescencia de los Triptofanos de las muestras  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>. Se utilizó un espectrofluorómetro Fluoromax Spex-3, Jovin Yvon (Horiba, New Jersey, USA) con celda termostaticada, equipado con una lámpara de arco Xe, y un tubo fotomultiplicador como detector de la señal, la cual, es leída por un módulo de conteo de fotones.

#### *2.4-2-1 Tamaños de los CI*

Para determinar los tamaños de los CI se tomaron muestras de distintos pellets (P) y se diluyeron al 20% v/v en buffer previamente filtrado a través de un filtro de fluoruro polivinilideno (GVWP, Millipore). Las mediciones se realizaron a 22°C. Se utilizó un equipo Nicomp™ 380, (Nicomp Particle Sizer Systems, Santa Bárbara, CA) que opera a 532 nm y a una tasa de recuento media entre 250 y 500 kHz. El tiempo de registro fue de alrededor de 8 min. para la mayoría de las muestras [38]. Este aparato está optimizado para determinar tamaños de partícula de menos de aproximadamente 1  $\mu$ m, y por lo tanto valores de tamaño promedio iguales o mayores a 1  $\mu$ m deben considerarse una aproximación.



**Esquema 5.** *Lavado de CI.* El pellet mantenido a 4°C fue semana de por medio sometido a una resuspensión en buffer fosfato de sodio durante 20 min., posterior centrifugación a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se separó del pellet y se evaluó estructura y función de ambos fragmentos.



**Esquema 6.** *Dilución de CI.* Tanto pellet como el sobrenadante fueron sometidos a sucesivas diluciones en buffer fosfato de sodio pH 6,8. Posteriormente se midió la actividad enzimática de cada dilución.

## **CAPÍTULO 3**

### **Resultados y Discusión**

## **RESULTADOS y DISCUSIÓN**

### **3.1 Condiciones de producción y conservación de CI**

Los primeros estudios fueron tendientes a evaluar las condiciones óptimas de obtención y aislamiento de los CI y por esto se realizaron pruebas preliminares.

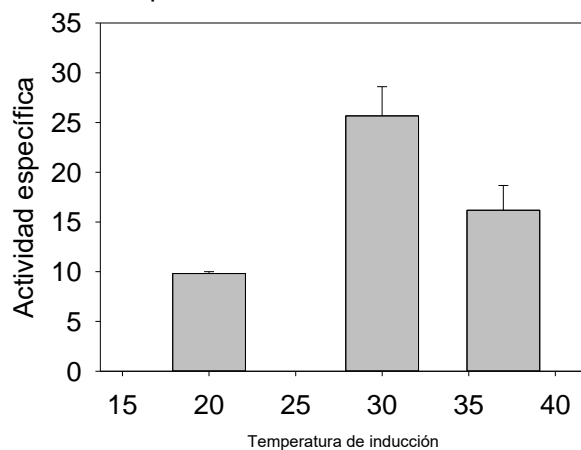
#### *3.1-1 Concentración de DNAasa*

Como se explicó en la sección 2-1 y en el Esquema 1 el sedimento proveniente del lisado de bacterias es tratado primero con detergentes y después se lo incuba en presencia de DNAasa durante 20 min. a temperatura ambiente. Este proceso enzimático permite hidrolizar el ADN presente en la muestra que además de contaminar los CI presenta una consistencia viscosa que impide manipular el pellet. Se probaron 4 concentraciones de DNAasa (0,5, 1, 2 y 2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) y finalmente se estableció que se utilizaría la concentración (25  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### *3.1-2 Temperatura de inducción*

Como se indicó en la sección 2 de M&M una vez lograda la DO deseada se agregó IPTG (0,4 mM) para inducir la expresión de la enzima y el cultivo se mantuvo en agitación O.N. El cultivo se dividió en 3 partes iguales y cada una se mantuvo a diferente temperatura. Posteriormente se aislaron los CI como se indica en la sección 2-1 de M&M y se midió la actividad frente a ONPG como sustrato.

En la Fig. 1 se muestra el efecto de la temperatura de inducción sobre la actividad específica de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>.

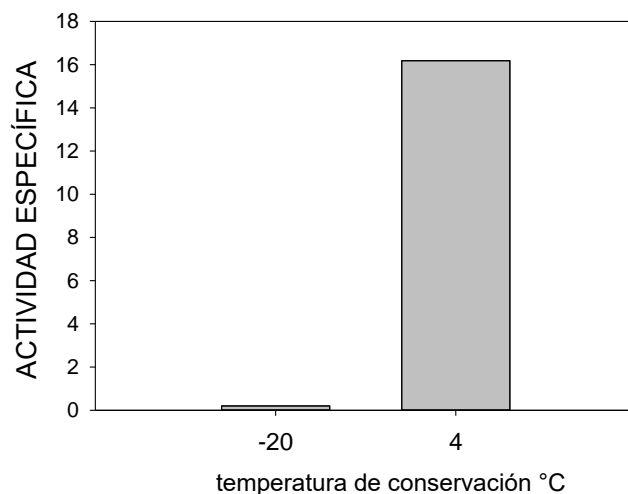


**Figura 1.** Actividad específica de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> en función de la temperatura de inducción del cultivo del que proviene (la Actividad específica se midió como  $\mu$ moles de ONP/min/mg de proteína)

Se observa que a 30°C de inducción de la expresión de  $\beta$ -Galse generan CI cuya “calidad” enzimática es óptima con respecto a las otras dos temperaturas probadas. No podemos establecer si en el CI aparece una población de enzimas que presenta una conformación más activa o que simplemente en el agregado hay una mayor proporción de enzimas correctamente plegadas. La sobreexpresión a menores temperaturas favorecería la calidad del plegamiento de la proteína de interés pero en detrimento de la pureza de la misma. A mayores temperaturas ocurriría lo inverso y se esperaría que la sobreexpresión a 37°C favorezca la pureza de  $\beta$ -Gal en los agregados pero no garantizaría la calidad estructural con respecto a la sobreexpresión a menores temperaturas.

### 3.1-3 Temperatura de conservación

Se estudiaron dos temperaturas de conservación del pellet y se midió la actividad específica de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> en cada tratamiento.



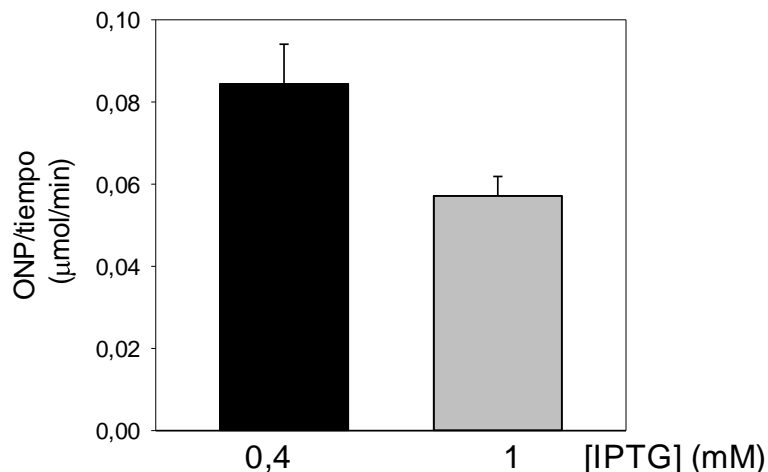
**Figura 2.** Actividad específica de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> en función de la temperatura de conservación de los CI.

Se observó que la conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$  inactivó completamente a la enzima y que esto probablemente está relacionado a la deshidratación de la enzima por congelamiento del agua. Así como las proteínas presentan una temperatura de desnaturalización por calor ( $T_m$ ) también presentan una temperatura por desnaturalización en frío [63].

Además se demostró previamente en nuestro laboratorio que la versión soluble de la proteína se inactiva completamente cuando se mantiene a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.1-4 Concentración de IPTG

Se reportó en la bibliografía que la concentración de IPTG afecta notablemente la calidad del agregado [64] y como es de esperar esto es debido a la cinética de formación del agregado. La actividad específica de la enzima soluble en función de la concentración de IPTG utilizada para inducir se muestra en la Fig. 3. Una concentración mayor de IPTG afecta negativamente la proporción de enzima.



**Figura 3.** Actividad específica de  $\beta$ -Galsoluble en función de la concentración de IPTG.

La figura 3 representa la actividad enzimática de beta galactosidasa presente en la fracción de sobrenadante luego del lisado de la bacteria. Si bien no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las medias ( $p=0,1$ ), la actividad promedio de beta galactosidasa fue mayor cuando se utilizó 0,4 mM de IPTG con respecto a 1 mM de IPTG. Teniendo en cuenta que el ensayo se inició con la misma densidad de bacterias ( $DO=1$ ) se podría sugerir que una concentración de 1 mM de IPTG disminuye la cantidad de enzima soluble probablemente en favor de la estructuración de la misma en cuerpos de inclusión aunque no se descarta que haya aumentado, en esta condición, la población de enzima inactiva.

### 3.2 Condiciones óptimas de actividad de $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>

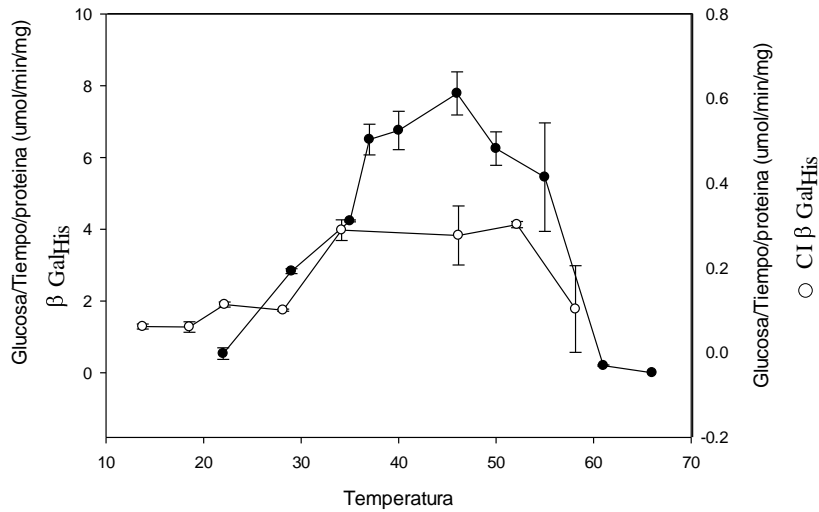
Posteriormente se realizaron experimentos para establecer las condiciones óptimas de actividad de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>.

#### 3.2-1 Temperatura óptima de actividad de $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>

La Fig. 4 muestra un perfil de temperatura de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> muy similar al de su contraparte soluble. El hecho de que no se logren los mismos valores de actividad específica que se alcanzaron con la enzima soluble, en primer lugar puede ser debido a que no toda la enzima



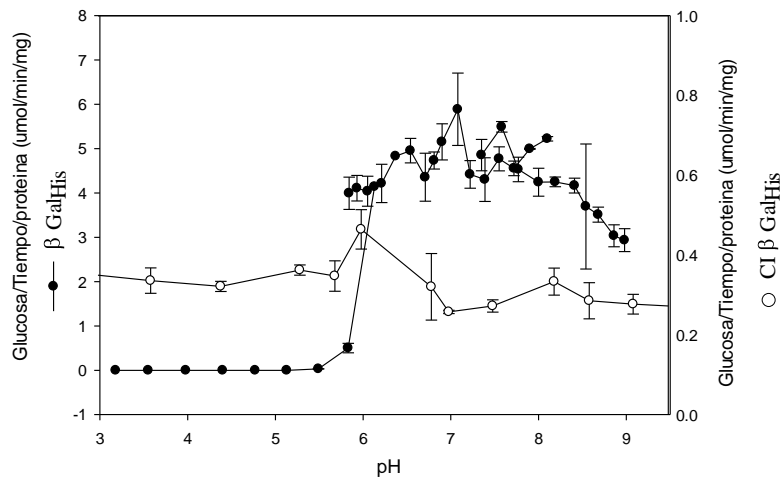
presente en el agregado es activa, pero además podría ser debido a que la accesibilidad del sustrato lactosa a una enzima confinada en un agregado sea más lenta.



**Figura 4.** Actividad específica de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> en función de la temperatura (la Actividad específica se midió como  $\mu$ moles de Glucosa/min/mg de proteína).

### 3.2-2 pH óptimo de actividad de $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>

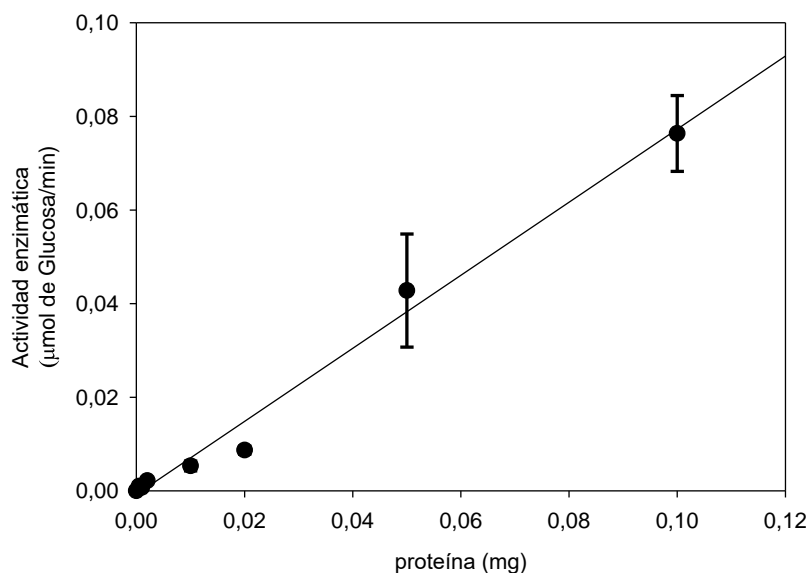
El perfil de pH de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> es significativamente diferente con respecto a la enzima soluble, se observa una tolerancia funcional en todo el rango de pH (Fig. 5).



**Figura 5.** Actividad específica de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> en función del pH (la Actividad específica se midió como  $\mu$ moles de Glucosa/min/mg de proteína).

Si bien a pH ácidos  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> presenta una elevada actividad específica, el pH óptimo de actividad es 6. Este resultado es muy interesante desde el punto de vista industrial particularmente para la utilización de CI para el tratamiento de la lactosa presente en sueros ácidos y por lo tanto para el tratamiento y utilización de un desecho de la industria quesera [65]. Además en la Figura se observa que la enzima soluble (símbolos negros) es sensible también a la composición de los buffers utilizados. Se observa particularmente en dos rangos de pHs: entre 5,8 y 6,5 y entre 7,2 y 8,3. El buffer fosfato de sodio (ver sección 2.3-3) en los dos rangos señalados activa levemente a la enzima.

### 3.2-3 Concentración de enzima



**Figura 6.** Actividad enzimática de  $\beta$ -Gal en función de la cantidad de proteína.

Como se observa en la Fig. 6 se determinó la concentración de enzima óptima para los estudios cinéticos posteriores donde se determinarían los parámetros cinéticos de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>.

Se determinó una cantidad de enzima de 0,05 mg en el sistema de incubación para la posterior determinación de los parámetros cinéticos.

### 3.3 Estabilidad funcional y estructural de $\beta$ -Gal estructurada en CI

En esta sección del trabajo se evaluó la estabilidad funcional y estructural de  $\beta$ -Gal como se describió en la sección 2.4.

En primer lugar se evaluó la posibilidad de que  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> pueda desorberse de los CI y hacia la forma  $\beta$ -Gal<sub>L</sub> (ver esquema 7) debido a la resuspensión de los CI en un medio de baja osmolaridad como buffer fosfato de sodio pH6.8, 50 mM.

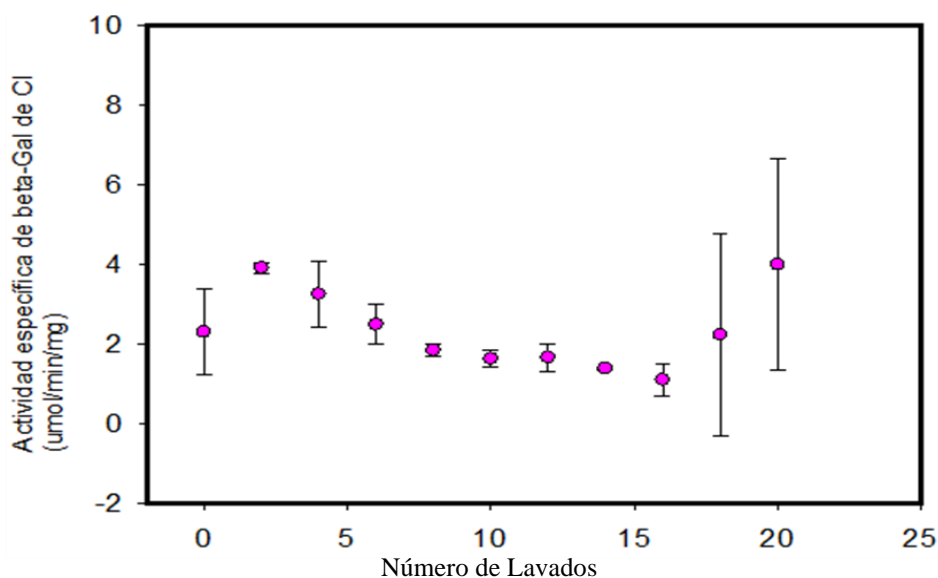


**Esquema 7.** Equilibrio de enzima liberada de CI  $\beta$ -Gal<sub>L</sub> con respecto a la permanece estructurada en los CI  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>

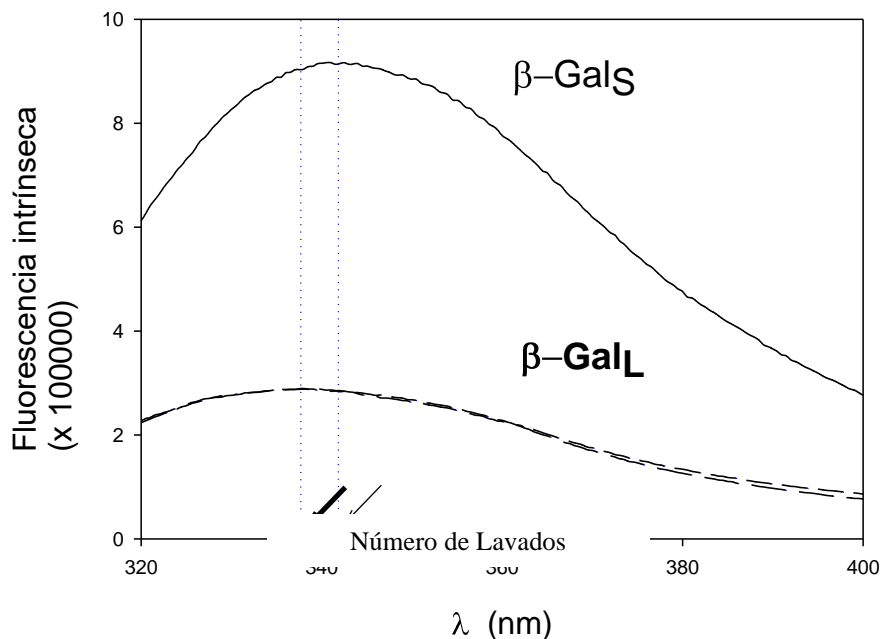
$\beta$ -Gal<sub>L</sub>

Si bien se postula en la bibliografía que los CI presentan estabilidad mecánica[63] y no se ha reportado pérdida de material desde los mismos una vez que son aislados y además son insensibles a la osmolaridad del medio [52], se intentó evaluar la funcionalidad de proteínas que se desorbían de estos agregados.

Los resultados se muestran en la Fig. 7.



**Figura 7.** Actividad específica de  $\beta$ -Gal<sub>L</sub> correspondiente al número de sobrenadante indicado que provino de la centrifugación sucesiva. De acuerdo al esquema 2 en MyM.

**Figura 8.**

de proteína presente en cada sobrenadante.

Cantidad

La Fig. 7 muestra claramente que a medida que se resuspende el pellet se libera  $\beta$ -Gal desde los CI ( $\beta$ -Gal<sub>L</sub>). Por otro lado el hecho de que la actividad específica sea fluctuante a medida que se desorbe de la proteína de los CI sugiere una calidad proteica heterogénea dentro de estos agregados. Como se ha demostrado previamente para otras proteínas estructuradas en CI con patrones de organización interna diferente[51].

Por otro lado la Fig. 8 muestra que también fluctúa la cantidad de proteína que se desorbe de los CI. Esta variación está probablemente asociada a interacciones cualitativamente diferentes dentro del agregado proteico.

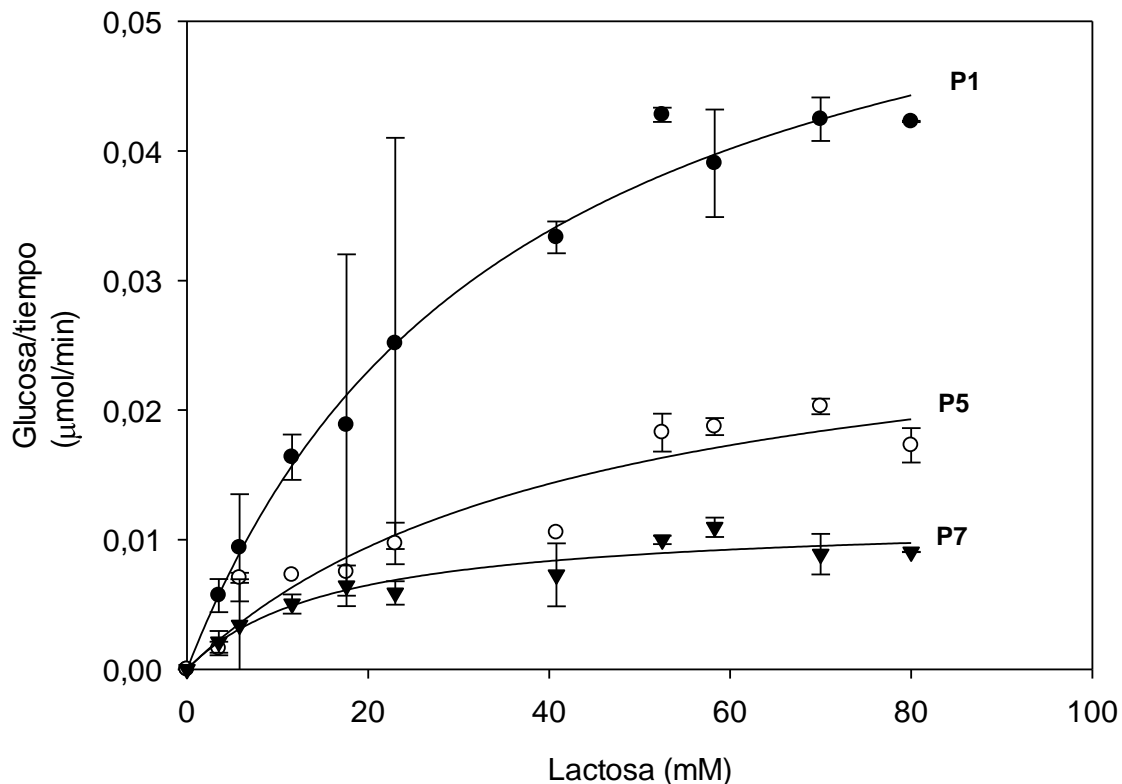
Para indagar en este tema se tomó una muestra de dos de los sobrenadantes (S5, S8) y se realizó un espectro de emisión de la fluorescencia de los triptófanos de  $\beta$ -Gal<sub>L</sub> (Fig. 9). Se observó que efectivamente  $\beta$ -Gal<sub>L</sub> presenta un espectro de emisión cuya longitud de onda de máxima está levemente desplazada hacia el azul con respecto a la  $\beta$ -Gal soluble que no proviene de un cuerpo de inclusión (Fig. 9).

**Figura 9.** Espectro de emisión de triptófanos de  $\beta$ -Gal<sub>L</sub> correspondiente al S5 y S8. Además se muestra el espectro de emisión de la enzima soluble  $\beta$ -Gal<sub>S</sub> que nunca formó parte de CI y se aisló de la bacteria en forma soluble.

*$\beta$ -Gal<sub>CI</sub>*

Una vez que demostramos que la enzima puede desorberse espontáneamente de los CI y que además tiene actividad, abordamos los estudios de las muestras de CI es decir aquellas provenientes del pellet.

Como habíamos establecido previamente las condiciones óptimas para determinar los parámetros cinéticos (sección 2.3.1 de M&M) se realizó la curva de saturación que se muestra en la Fig. 10.



**Figura 10.** Curva de Saturación de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> frente a lactosa. Cada una de las curvas representa la muestra proveniente de pellets de diferentes lavados (esquema 5 en la sección de M&M). Los puntos experimentales fueron ajustados a una curva hiperbólica de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten. El análisis de regresión de estas curvas se muestra en la Tabla 3.

En primer lugar se observa claramente que la actividad de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> frente a lactosa presenta una cinética michaeliana. Los resultados del análisis de regresión no-lineal se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>

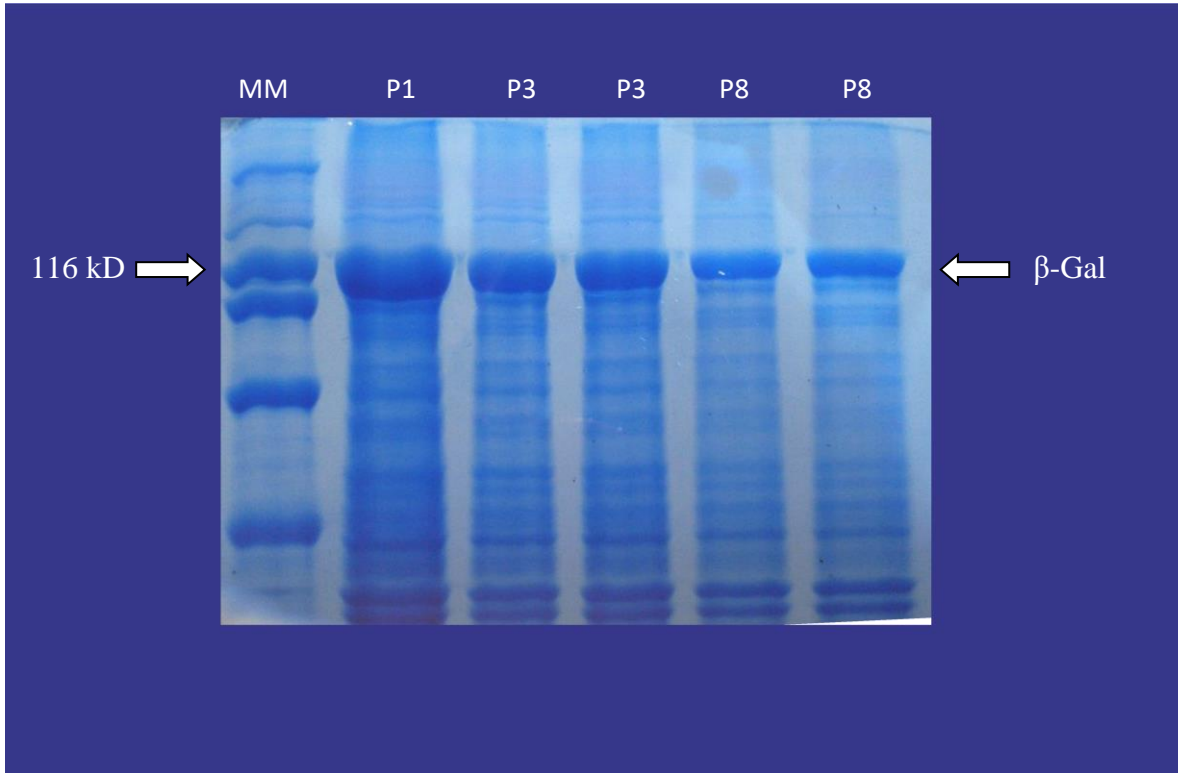
Pellet	$K_M V_{max}$
	$135,75 \pm 5,70, 064 \pm 0,004$
	$542,67 \pm 190,029 \pm 0,006$
7	$16 \pm 4,60, 012 \pm 0,001$

**Tabla 3.** Los resultados mostrados corresponden a la media  $\pm$  s.e.m. Los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  fueron calculados por un análisis de regresión no lineal de la velocidad inicial vs la concentración de sustrato.

Las curvas de saturación de sustrato correspondiente a las distintas muestras de pellet evidencian una disminución de velocidad de reacción conforme avanzan los lavados. Esto podría relacionarse con una pérdida de enzima. El resultado que llama la atención es la disminución de  $K_M$  cuando  $\beta$ -Gal proviene de los CI de la muestra P7. Si bien  $K_M$  podría reflejar una estructura promedio del sitio activo de  $\beta$ -Gal diferente a la que presentan los de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub>provenientes de los lavados anteriores, podría sugerir también una mayor accesibilidad del sustrato al sitio activo debido a una mayor hidratación de los agregados. La estructura de los CI presenta una alta porosidad e hidratación [66] que podría ser afectada por la desorción de proteína de la capa externa del agregado. Así mismo, no se puede descartar la presencia de un inhibidor competitivo, en los primeros lavados que afecte la actividad enzimática de las primeras muestras, que sea eliminado luego de sucesivo lavados y que mejore la actividad enzimática (menor valor de  $K_M$ ). Para ello se podrían plantear experimentos futuros donde se mida la actividad de la enzima soluble en presencia de las diferentes soluciones de lavado.

Se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE, para contar con una aproximación de la composición. En la Fig. 11 se muestran estos resultados. Se comprueba efectivamente que los lavados sucesivos decrecen la cantidad de  $\beta$ -Gal de las muestras de pellet y esto es debido a la desorción de la proteína ya demostrada en la Fig. 7. Sin embargo se observa que existe una población de proteínas de menor peso molecular que aparece muy marcada y con una leve disminución a medida que se avanza en los lavados. El hecho de que aparezca en todas las muestras podría sugerir una población de proteínas

que está inmersa en el interior de los CI, “atrapada” e inaccesible al solvente. Probablemente estas proteínas están relacionadas con la estructuración de los mismos en zonas o puntos de nucleación. Los cuerpos de inclusión crecen a partir de intermedios de plegado estructurados a velocidades casi constantes y alrededor de puntos de nucleación que son mutuamente excluyentes[67]. Quizá podrían representar chaperonas y/o proteasas que quedan atrapadas durante la formación del CI [68; 69].



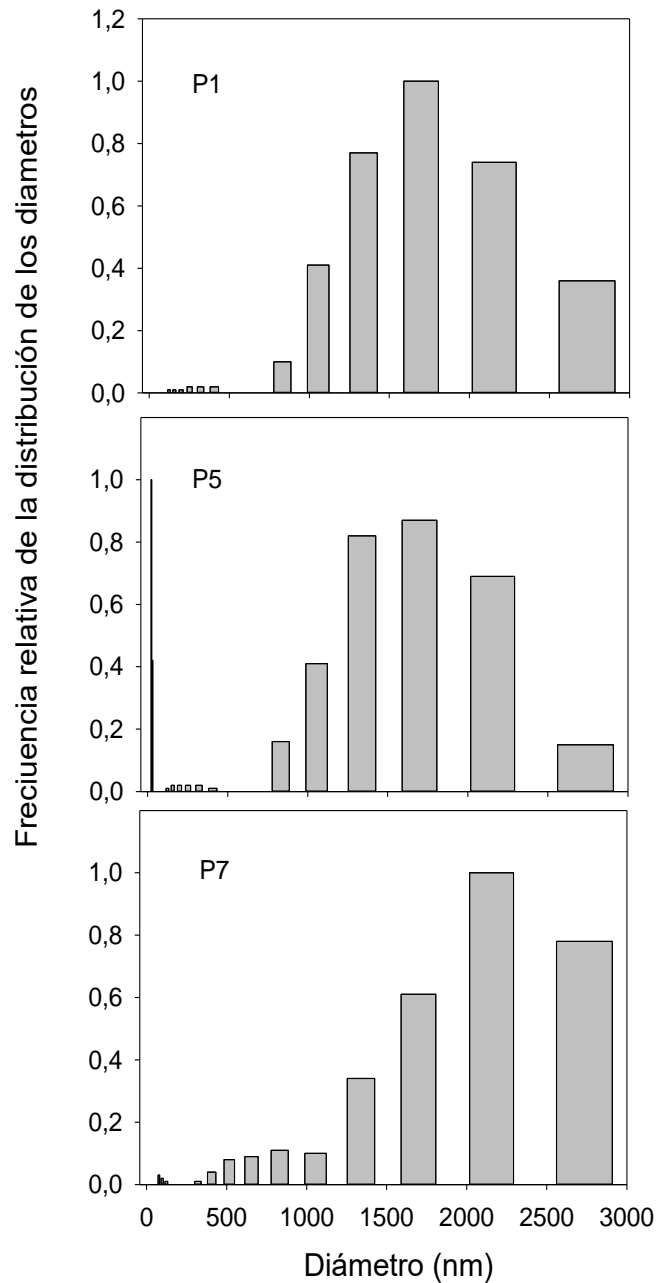
**Figura 11.** *Electroforesis SDS PAGE de muestras provenientes de los diferentes pellet que se indican en cada calle. MM: marcador molecular.*

Estos resultados nos llevaron a pensar en estructuras más pequeñas debido a la pérdida de material y propusimos estudiar los tamaños de los agregados en los sucesivos lavados. Para esto se aplicó la técnica de dispersión cuasielástica de la luz (ver detalles en sección 2.4-1-6).

Estos resultados se muestran en la Fig. 12, donde se observa que a medida que ocurren los lavados de los pellets aparece una mayor heterogeneidad de tamaños de las estructuras. Sin embargo como el límite superior en la sensibilidad del equipo es de

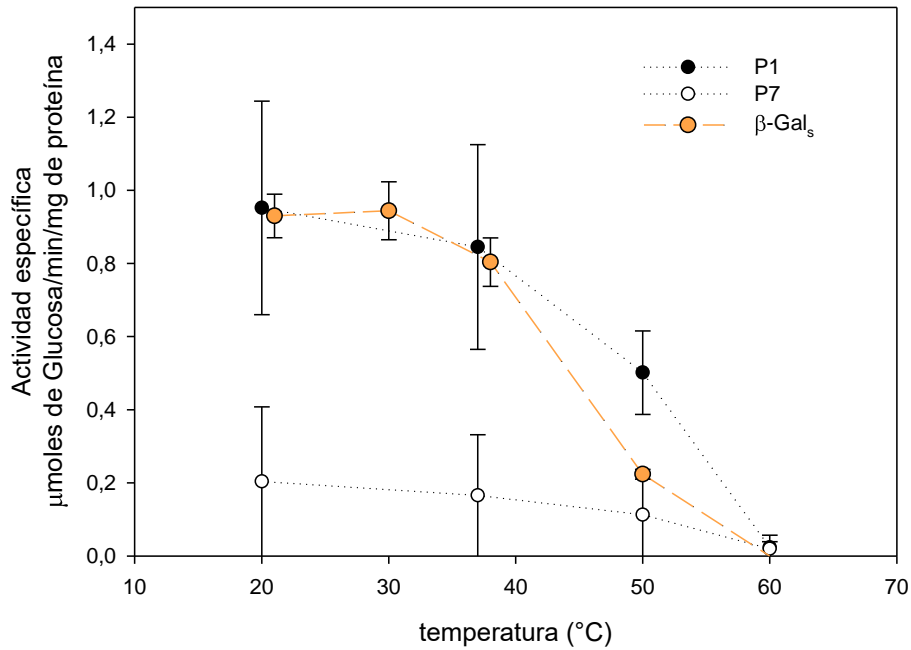


estructuras de un tamaño de hasta 1.000 nm, sólo pudimos evaluar este experimento desde un punto de vista cualitativo ya que el tamaño promedio está representado por estructuras de tamaño mayor a 1.000 nm.



**Figura 12.** Frecuencia relativa de distribución de tamaños determinada por dispersión quasiselástica de la luz.

Se evaluó la estabilidad funcional frente a la preincubación a diferentes temperaturas de los CI provenientes de los diferentes pellets. En la Fig. 13 se observa que  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> presenta mayor resistencia frente a la inactivación térmica comparada a lo que ocurre con  $\beta$ -Gal<sub>s</sub>.



**Figura 13.** Actividad específica en función de la temperatura de preincubación de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> proveniente de pellets de diferentes lavados. La curva de color naranja representa el comportamiento de  $\beta$ -Gal<sub>s</sub>.

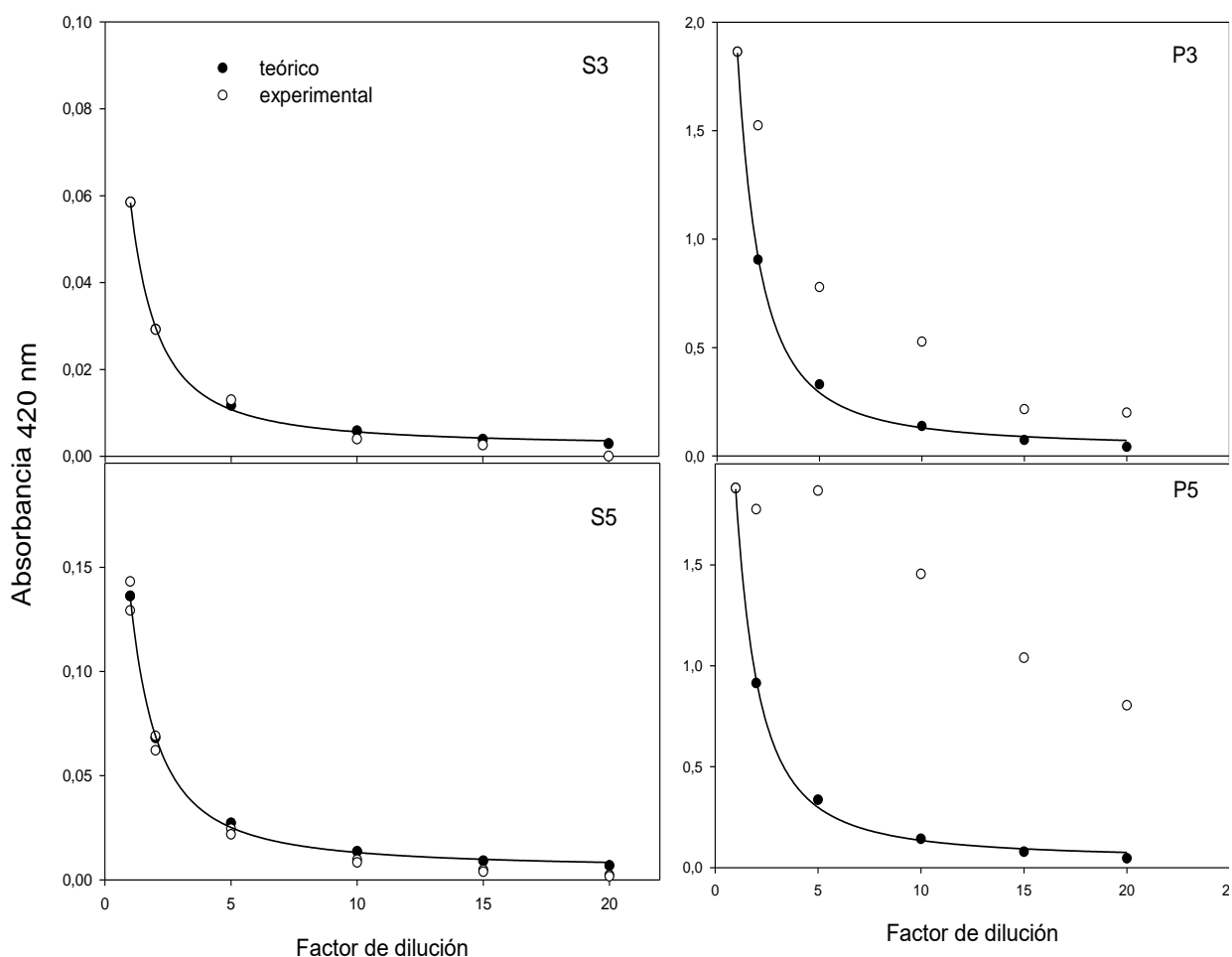
La mayor resistencia a la inactivación térmica de  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> representa también un resultado interesante desde el punto de vista tecnológico.

Luego de haber demostrado la ocurrencia de la desorción de la proteína con la simple resuspensión de los CI en buffer (Esquema 5) debido a un desplazamiento del equilibrio desde  $\beta$ -Gal<sub>CI</sub> a  $\beta$ -Gal<sub>L</sub> (esquema 7) planteamos un experimento muy sencillo basado en la dependencia de la velocidad de reacción con la cantidad de enzima en el medio.

$$v = k_{cat} \times E_T \tag{ec.1}$$

La hipótesis que se propuso es que la enzima se desorbe de los CI y una vez soluble adquiere funcionalidad, o sea que la adquisición de una conformación activa ocurre cuando la enzima se libera de CI. Aunque podrían ser otros los factores que afecten la funcionalidad de la enzima, como, el acceso del sustrato al sitio activo.

En la Fig. 14 se muestra el efecto de las diluciones sucesivas sobre la actividad enzimática.



**Figura 14.** Absorbancia a 420 del ONPx (producto de reacción de la hidrólisis de ONPG catalizada por  $\beta$ -Gal) en función del factor de dilución de CI.

En la Fig. 14 se observa claramente que tanto la enzima presente en el sobrenadante,  $\beta$ -Gal<sub>L</sub> como en el pellet,  $\beta$ -Gal<sub>C</sub> catalizan la hidrólisis de ONPG, donde uno de los productos que se libera es el ONP. La hidrólisis se detiene por el agregado de un

álcali(carbonato de sodio, pH=12) y en estas condiciones ONP predomina bajo su forma ONPx que puede ser cuantificada por espectrofotometría a 420 nm[38]. En la figura se observa claramente que  $\beta$ -Gal<sub>L</sub> manifiesta un comportamiento igual al esperado a medida que aumenta el factor de dilución de la muestra. Y por lo tanto responde a la dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de enzima total (ecuación 1). Sin embargo, los gráficos de la derecha que representan el comportamiento de las muestras de  $\beta$ -Gal<sub>C</sub> muestran un comportamiento muy diferente al predicho por la ecuación 1, sugiriendo que la totalidad de la enzima presente en los CI no es activa, y por lo tanto una proporción de enzimas adquiriría actividad sólo cuando se diluyen los mismos y se favorece la presencia de  $\beta$ -Gal<sub>L</sub>. Este resultado representa un hallazgo en los estudios previos realizados sobre CI ya que por primera vez se describe la solubilización de proteína activa sin el agregado de chaperonas y un entorno citoplasmático que favorezca el plegamiento correcto[46].

# **CAPÍTULO 4**

## **Conclusión**

## CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de tesis se describió el comportamiento cinético de  $\beta$ -Gal agregada en CI.

Si bien en la bibliografía se ha sugerido el uso de los CI como fuente de proteínas por la facilidad de obtención ya que quedan atrapadas en la fase particulada se demostró que  $\beta$ -Gal presente en CI es funcional y presenta propiedades cinéticas, estructurales y de estabilidad diferentes a la proteína soluble. Por otro lado, el gran interés que está adquiriendo el uso de CI como fuente enzimática debe atender el hecho de que la proteína se desorbe espontáneamente de los mismos. Para esto es necesario recurrir a métodos que aseguren una permanencia de la proteína en los confines del CI para evitar la contaminación del producto de reacción. Este trabajo de tesis abre un campo de exploración y estudio muy interesante desde el punto de vista aplicado.

Los resultados de este trabajo de tesis permitieron comenzar con nuevas líneas de investigación en nuestro laboratorio relacionadas con:

*Entrampamiento de cuerpos de inclusión:* Se utilizarán estructuras de autoagregación lipídicas, para encapsular los CI y evitar el problema de la pérdida de material y simultáneamente el mantenimiento de las características propias de las proteínas estructuradas.

*Supervivencia de bacterias que producen CI:* Se ha demostrado que la presencia de los CI en bacterias disminuye las posibilidades de supervivencia de la misma.



## **Bibliografía**



## BIBLIOGRAFÍA

1. Tanaka, H. and K. Suzuki, *Lactosylceramide beta-galactosidase in human sphingolipidoses. Evidence for two genetically distinct enzymes*. J Biol Chem, 1975. **250**(6): p. 2324-32.
2. Brenchley, J.E., *Psycrophilic microorganism and their cold active enzyme*. J Ind Microbiol Biotechnol 1996. **17**: p. 432-437.
3. Dey, P.M., I.R. Rached, and K. Wallenfels, *A simple method for the determination of the endo or exo nature of carbohydrases acting on polymeric substrates*. Biochem J, 1972. **130**(1): p. 39P-40P.
4. Huber, R.E., G. Kurz, and K. Wallenfels, *A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of beta-galactosidase (E. coli) on lactose*. Biochemistry, 1976. **15**(9): p. 1994-2001.
5. Huber, R.E., M.T. Gaunt, and K.L. Hurlburt, *Binding and reactivity at the "glucose" site of galactosyl-beta-galactosidase (Escherichia coli)*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1984. **234**(1): p. 151-160.
6. Mahoney, R.R., *Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review*. Food Chemistry, 1998. **63**(2): p. 147-154.
7. Sako, T., K. Matsumoto, and R. Tanaka, *Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides*. International Dairy Journal, 1999. **9**(1): p. 69-80.
8. Maischberger, T., et al., *Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid*. Carbohydr Res, 2008. **343**(12): p. 2140-7.
9. Pervaiz, S. and K. Brew, *Composition of the milks of the bottlenose dolphin (Tursiops truncatus) and the Florida manatee (Trichechus manatus latirostris)*. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol, 1986. **84**(2): p. 357-60.
10. Vesa, T.H., P. Marteau, and R. Korpela, *Lactose intolerance*. J Am Coll Nutr, 2000. **19**(2 Suppl): p. 165S-175S.
11. Swallow, D.M., *Genetics of lactase persistence and lactose intolerance*. Annu Rev Genet, 2003. **37**: p. 197-219.
12. Brown-Esters, O., P. Mc Namara, and D. Savaiano, *Dietary and biological factors influencing lactose intolerance*. International Dairy Journal 2012. **22**: p. 98-103.
13. Enattah, N.S., et al., *Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia*. Nat Genet, 2002. **30**(2): p. 233-7.
14. Deng, Y., et al., *Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management*. Nutrients, 2015. **7**(9): p. 8020-35.
15. Carrara, C.R. and A.C. Rubiolo, *Immobilization of β-galactosidase on chitosan*. Biotechnol. Prog., 1994. **10**: p. 220-224.
16. Pivarnik, L.F., A.G. Senecal, and A.G. Rand, *Hydrolytic and transgalactosylic activities of commercial beta-galactosidase (lactase) in food processing*. Adv Food Nutr Res, 1995. **38**: p. 1-102.
17. Gekas, V. and M. Lopez-Leiva, V. Gekas and M. Lopez-Leiva, "Hydrolysis of lactose: a

- literature review," Process Biochemistry, vol. 20, pp. 2–12, 1985. Process Biochemistry, 1985. 20(2-12).*
18. Gekas, V. and M. Lopez Leiva, *Hydrolysis of lactose. A literature review. Process. Biochem, 1985. 20: p. 2-12.*
  19. Panesar, P.S., S. Kumari, and R. Panesar, *Potential Applications of Immobilized beta-Galactosidase in Food Processing Industries. Enzyme Res, 2011. 2010: p. 473137.*
  20. Polaina, J., *Estructura, función e ingeniería molecular de enzima implicadas en la digestión de carbohidratos. , in MENSAJE BIOQUÍMICO, Vol. . 2004.*
  21. Randez-Gil, F., P. Sanz, and J.A. Prieto, *Engineering baker's yeast: room for improvement. Trends Biotechnol, 1999. 17(6): p. 237-44.*
  22. Belli, G., et all., *Structure-function analysis of yeast Grx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein. J Biol Chem, 2002. 277(40): p. 37590-6.*
  23. Oakley, A.J., et all., *Characterization of a family 11 xylanase from Bacillus subtilis B230 used for paper bleaching. . Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 2003. 59: p. 627-636.*
  24. Pastor, F.I., et all., *Molecular cloning and characterization of a multidomain endoglucanase from Paenibacillus sp BP-23: evaluation of its performance in pulp refining. Appl Microbiol Biotechnol, 2001. 55(1): p. 61-8.*
  25. German, J.H., *Applied enzymology of lactose hydrolysis in Milk Powders for the Future. 1997. p. pp. 81–87.*
  26. Steen Redeker, E., et all., *Protein engineering for directed immobilization. Bioconj Chem, 2013. 24(11): p. 1761-77.*
  27. Contesini, F.J., et all., *Potential applications of carbohydrases immobilization in the food industry. Int J Mol Sci, 2013. 14(1): p. 1335-69.*
  28. Quinn, Z.K., X. Zhou, and C. Dong, *Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized beta-galactosidase from Kluyveromyces lactis. Biochemical Engineering Journal, 2001. 9: p. 33-40.*
  29. Flores, H. and A.D. Ellington, *Increasing the thermal stability of an oligomeric protein, beta-glucuronidase. J Mol Biol, 2002. 315(3): p. 325-37.*
  30. Blazquez, J., et all., *Antimicrobials as promoters of genetic variation. Curr Opin Microbiol. 15(5): p. 561-9.*
  31. Stemmer, W.P., *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. Nature, 1994. 370(6488): p. 389-91.*
  32. Zhang, Y.X., et all., *Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. Nature, 2002. 415(6872): p. 644-6.*
  33. Jacobson, R.H., et al., *Three-dimensional structure of beta-galactosidase from E. coli. Nature, 1994. 369(6483): p. 761-6.*
  34. Ban, N., et all., *The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. Science, 2000. 289(5481): p. 905-20.*
  35. Wynne, S.A., R.A. Crowther, and A.G. Leslie, *The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. Mol Cell, 1999. 3(6): p. 771-80.*
  36. Oliveira, C., P.M.R. Guimarães, and L. Domingues, *Recombinant microbial systems for improved β-galactosidase production and biotechnological applications. Biotechnology Advances, 2011. 29(6): p. 600-609.*

37. Flores, S., Bianco, MJ, Perillo MA y Sanchez JM. . *Caracterización de lactasa superactiva frente a la hidrólisis de lactosa, en presencia de vesículas de fosfolípidos.* . in *V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2014)*. 2014. Córdoba. Argentina.
38. Sanchez, J.M. and M.A. Perillo, *Membrane adsorption or penetration differentially modulates beta-galactosidase activity against soluble substrates.* *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002. **24**(1): p. 21-31.
39. Sanchez, J.M., V. Nolan, and M.A. Perillo, *beta-Galactosidase at the membrane-water interface: A case of an active enzyme with non-native conformation.* *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013. **108**(0): p. 1-7.
40. Bakas, L., et all., *Paradoxical Lipid Dependence of Pores Formed by the Escherichia coli alpha-Hemolysin in Planar Phospholipid Bilayer Membranes.* *Biophysical Journal*, 2006. **91**(10): p. 3748-3755.
41. Duarte, J., et all., *An analysis of oligomerization interfaces in transmembrane proteins.* *BMC Structural Biology*, 2013. **13**(1): p. 21.
42. Goel, A., et al., *Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct.* *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1523**(1): p. 13-20.
43. Sánchez, J.M., et all., *Interfasial activity of beta-galactosidase from E. coli fused to an histidine hexapeptide.* *Biocell*, 2009. **33**: p. A263.
44. Coker, J.A., et all., *Biochemical characterization of a beta-galactosidase with a low temperature optimum obtained from an Antarctic arthrobacter isolate.* *J Bacteriol*, 2003. **185**(18): p. 5473-82.
45. Carson, M., et all., *His-tag impact on structure.* *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2007. **63**(Pt 3): p. 295-301.
46. Villaverde, A. and M.M. Carrio, *Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies.* *Biotechnol Lett*, 2003. **25**(17): p. 1385-95.
47. Carrio, M.M. and A. Villaverde, *Role of molecular chaperones in inclusion body formation.* *FEBS Lett*, 2003. **537**(1-3): p. 215-21.
48. Carrio, M.M. and A. Villaverde, *Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible.* *FEBS Lett*, 2001. **489**(1): p. 29-33.
49. Pearce, J.M., *The Lewy body.* *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2001. **71**(2): p. 214.
50. Lee, S.H., et all., *True euglycemic diabetic ketoacidosis in a person with type 2 diabetes and Duchenne muscular dystrophy.* *Diabetes Res Clin Pract*, 2011. **92**(1): p. e7-8.
51. Carrio, M.M., R. Cubarsi, and A. Villaverde, *Fine architecture of bacterial inclusion bodies.* *FEBS Lett*, 2000. **471**(1): p. 7-11.
52. Prouty, W.F., M.J. Karnovsky, and A.L. Goldberg, *Degradation of abnormal proteins in Escherichia coli. Formation of protein inclusions in cells exposed to amino acid analogs.* *J Biol Chem*, 1975. **250**(3): p. 1112-22.
53. Georgiou, G. and P. Valax, *Isolating inclusion bodies from bacteria.* *Methods Enzymol*, 1999. **309**: p. 48-58.
54. Ventura, S., *Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility.* *Microb Cell Fact*, 2005. **4**(1): p. 11.

55. Rinas, U. and J.E. Bailey, *Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 1992. **37**(5): p. 609-14.
56. Fink, A.L., *Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid*. Fold Des, 1998. **3**(1): p. R9-23.
57. Valax, P. and G. Georgiou, *Molecular characterization of beta-lactamase inclusion bodies produced in Escherichia coli. 1. Composition*. Biotechnol Prog, 1993. **9**(5): p. 539-47.
58. Betton, J.M., et al., *Degradation versus aggregation of misfolded maltose-binding protein in the periplasm of Escherichia coli*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 8897-902.
59. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem. , 1951. **193**(1): p. 265-275.
60. Sanchez, J.M. and M.A. Perillo, *Membrane topology modulates beta-galactosidase activity against soluble substrates*. Biophysical Chemistry, 2002. **99**(3): p. 281-295.
61. Michaelis, L. and M.L. Menten, *Kinetics for invertase action*. Biochemische Zeitsung, 1913. **49**: p. 333-369.
62. Sanchez, J.M., V. Nolan, and M.A. Perillo, *beta-galactosidase at the membrane-water interface: a case of an active enzyme with non-native conformation*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013. **108**: p. 1-7.
63. Sanfelice, D. and P.A. Temussi, *Cold denaturation as a tool to measure protein stability*. BiophysChem, 2016. **208**: p. 4-8.
64. Baneyx, F. and M. Mujacic, *Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(11): p. 1399-408.
65. Dutra Rosolen, M., et al., *Lactose Hydrolysis in Milk and Dairy Whey Using Microbial beta-Galactosidases*. Enzyme Res, 2015. 2015: p. 806240.
66. Vazquez, E., et al., *Functional inclusion bodies produced in bacteria as naturally occurring nanopills for advanced cell therapies*. Adv Mater, 2012. **24**(13): p. 1742-7.
67. Oberg, K., et al., *Nativelike secondary structure in interleukin-1 beta inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR*. Biochemistry, 1994. **33**(9): p. 2628-34.
68. Carrio, M.M. and A. Villaverde, *Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies*. J Biotechnol, 2002. **96**(1): p. 3-12.
69. Miot, M. and J.M. Betton, *Protein quality control in the bacterial periplasm*. Microb Cell Fact, 2004. **3**(1): p. 4.