



Universitat Autònoma de Barcelona



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BACELONA

ESCOLA D'ENGINYERIA

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA

Estudi de l'expressió i secreció de  
proteïnes recombinants (agarasa i lacasa)  
en una soca SipY<sup>-</sup> de *Streptomyces*  
*lividans*.

Memòria per optar al Grau de Doctora  
per la Universitat Autònoma de Barcelona  
sota la direcció de  
Dr. Josep López i Santín i  
Dra. Glòria Caminal Saperas

Marcel·la Vidal Gabarró

Bellaterra, 2014



JOSEP LÓPEZ SANTÍN, catedràtic del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, i GLÒRIA CAMINAL SAPERAS, investigadora titular del IQAC-CSIC i professora associada del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

Que la Llicenciada en Biotecnologia Marcel·la Vidal Gabarró ha dut a terme sota la nostra direcció el treball amb el títol "Estudi de l'expressió i secreció de proteïnes recombinants (agarasa i lacasa) en una soca SipY<sup>-</sup> de *Streptomyces lividans*" que presenta en aquesta memòria i que constitueix el seu treball per optar al Grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè es prengui coneixement i consti als efectes oportuns, presentem a l'Escola d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada memòria, signant el present certificant a

Bellaterra, setembre del 2014

**Dr. Josep López Santín**

**Dra. Glòria Caminal Saperas**



*“You look at science (or at least talk of it) as some sort of demoralizing invention of man, something apart from real life, and which must be cautiously guarded and kept separate from everyday existence.*

*But science and everyday life cannot and should not be separated. Science, for me, gives a partial explanation for life. In so far as it goes, it is based on fact, experience and experiment.”*

Rosalind Franklin  
*(Carta a Ellis Franklin, possiblement de l'estiu de 1940)*



## AGRAÏMENTS

En primer lloc volia agrair molt especialment als meus directors Josep López i Glòria Caminal la seva confiança durant aquests anys.

Vull agrair també a Rafael Pérez Mellado la seva predisposició a discutir sempre els resultats i per haver-me permès realitzar les estades en el seu laboratori. M'agradaria fer un esment molt especial a la Sonia Gullón i de la Rebeca López Vicente que sempre han estat a punt per ajudar al llarg d'aquets quatre anys.

Agrair a l'Institut John Innes Centre l'haver-me cedit el plasmidi pIJ86 encara que finalment no hagi donat els resultats desitjats.

Agrair també els serveis prestats pel Servei d'Anàlisi Química i el Servei de Genòmica de la UAB.

A tots els companys que han passat pel Departament d'Enginyeria Química durant tots aquests anys. Especialment als companys de Lipases i Aldolases i en particular als fermentatius que m'han ajudat en moments de crisi amb l'Applikon. També agrair-los les estones de dinar i cafès, especialment als incondicionals Carlota, Xavi, Núria, Leti i Dani.

Vull agrair a tota la meva família i amics que m'han donat els ànims que he necessitat durant tot aquest temps. Especialment a les meves increïbles: Helena, Núria, Carlota, Alba i Sandra.

Al Roger, que ha sigut el suport que ho ha aguantat absolutament tot, sempre disposat a escoltar-me i a fer-me desconnectar. Milions de gràcies.

I finalment als meus pares, als qui amb paraules no puc expressar la gratitud, admiració i estimació profunda que sento per ells.





# ÍNDIX

1.	Introducció .....	7
1.1.	El gènere Streptomyces .....	8
1.1.1.	Característiques generals del microorganisme i el seu cicle de vital.....	8
1.1.2.	Importància del microorganisme a nivell industrial.....	10
1.2.	El mecanisme de secreció de proteïnes de Streptomyces.....	10
1.2.1.	La ruta de secreció Sec en Streptomyces.....	11
1.2.2.	La ruta de secreció Tat en Streptomyces .....	12
1.3.	Estudis en l'optimització dels mecanismes de secreció en Streptomyces:.....	13
1.4.	Producció de proteïnes recombinants en Streptomyces.....	16
1.5.	Millora de la producció de proteïnes recombinants.....	19
1.5.1.	Ús de codó.....	19
1.5.2.	Estudi de promotors i vectors .....	19
1.5.3.	Via de secreció seleccionada: via Sec o via Tat .....	20
1.5.4.	Pèptid senyal .....	20
1.5.5.	Peptidases senyal tipus I .....	20
1.5.6.	Altres estratègies.....	20
1.6.	Proteïnes produïdes en aquest treball.....	21
1.6.1.	L'enzim agarasa i el seu interès en la indústria.....	21
1.6.2.	La lacasa i el seu interès en la indústria .....	23
2.	Objectius .....	25
3.	Materials i mètodes .....	27
3.1.	Microorganismes.....	27
3.1.1.	Escherichia coli .....	27
3.1.2.	Streptomyces .....	27
3.2.	Medis de cultiu i conservació.....	28
3.2.1.	Medis de cultiu per E. Coli.....	28
3.2.2.	Medis de cultiu per Streptomyces (Keiser et al. 2000) .....	28
3.2.3.	Solucions de biologia molecular per Streptomyces .....	29
3.3.	Obtenció de soques recombinants .....	29
3.3.1.	Vectors plasmídics.....	29
3.3.2.	Manipulació d'àcids nucleics.....	30
3.3.2.1.	Aïllament de DNA plasmídic d'E.coli .....	30

3.3.2.2.	Aïllament de DNA plasmídic de Streptomyces.....	30
3.3.2.3.	Obtenció de DNA cromosòmic de Streptomyces.....	30
3.3.2.4.	Quantificació dels àcids nucleics .....	30
3.3.3.	Manipulació enzimàtica del DNA .....	30
3.3.3.1.	Digestió enzimàtica .....	30
3.3.3.2.	Lligació del DNA.....	30
3.3.4.	Amplificació del DNA per PCR .....	31
3.3.5.	Electroforesi d'agarosa.....	31
3.3.6.	Introducció del DNA en microorganismes .....	32
3.3.6.1.	Preparació de cèl·lules competents d'E.coli i transformació .....	32
3.3.6.2.	Obtenció de protoplasts de Streptomyces i transformació .....	32
3.4.	Cultius de Streptomyces.....	33
3.4.1.	Cultius en Erlenmeyer .....	33
3.4.1.1.	Pre-inòcul .....	33
3.4.1.2.	Inòcul .....	33
3.4.1.3.	Cultius en Erlenmeyer .....	33
3.4.2.	Cultius en bioreactor .....	33
3.4.2.1.	Pre-inòcul .....	33
3.4.2.2.	Inòcul .....	33
3.4.2.3.	Bioreactor en discontinu .....	33
3.4.2.4.	Bioreactor en discontinu alimentat.....	34
3.4.2.5.	Bioreactor en continu.....	34
3.5.	Anàlisi de les mostres.....	34
3.5.1.	Concentració de biomassa .....	34
3.5.2.	Concentració de mannitol i de glucosa .....	34
3.5.3.	Precipitació de proteïnes .....	35
3.5.3.1.	Precipitació amb sulfat amònic ("salting-out") .....	35
3.5.3.2.	Precipitació amb TCA .....	35
3.5.4.	Concentració de proteïna.....	35
3.5.5.	Electroforesi de proteïnes i Western Blot.....	35

3.5.5.1.	SDS-PAGE.....	35
3.5.5.2.	Western Blot.....	35
3.5.6.	Assaigs d'activitat .....	36
3.5.6.1.	Assaig d'activitat agarasa .....	36
3.5.6.2.	Assaig d'activitat lacasa.....	36
3.5.6.3.	Assaig d'activitat proteasa .....	37
3.5.7.	Anàlisi de la composició elemental .....	37
4.	Resultats I: Estudis preliminars de producció de proteïnes amb <i>Streptomyces</i> .....	39
4.1.	Obtenció de les soques sobreproductores d'agarasa de <i>Streptomyces lividans</i> .....	39
4.2.	Efecte que té la sobreproducció de proteïnes en el creixement de <i>Streptomyces</i> ....	40
4.3.	Estudis inicials de medis de cultiu per a <i>Streptomyces lividans</i> TK21 .....	41
4.3.1.	Efecte de la font de carboni i la producció de proteïna en la soca solvatge: <i>Streptomyces lividans</i> TK21pAGAs5.....	41
4.4.	Efecte de la font de carboni i la producció de proteïna en la soca deficient en SipY: <i>Streptomyces lividans</i> $\Delta$ sipY.....	45
4.5.	Estudi i avaluació alternatives de l'assaig d'activitat agarasa.....	48
4.5.1.	Estudi i optimització de l'assaig d'activitat agarasa .....	49
4.5.1.1.	Estudi de la precipitació de les proteïnes.....	50
4.5.1.2.	Estudi dels components del medi de cultiu .....	50
4.5.1.3.	Estudi de les solucions amortidores.....	51
4.5.1.4.	Estudi del volum de mostra de l'assaig .....	52
4.5.1.5.	Estudi del temps de l'assaig i la cinètica de la reacció .....	52
4.5.1.6.	Disseny de l'assaig final d'activitat agarasa .....	53
4.6.	Comparació entre la soca <i>S. lividans</i> TK21pAGAs5 i la soca <i>S. lividans</i> $\Delta$ sipYpAGAs5 en medi NMMP amb mannitol tenint en compte el canvi en l'assaig enzimàtic.....	53
4.7.	Conclusions finals del capítol I .....	55
5.	Resultats II: Desenvolupament d'una estratègia de producció de proteïnes Tat utilitzant <i>S. lividans</i> $\Delta$ sipYpAGAs5 .....	57
5.1.	Estudi del comportament de la soca <i>S. lividans</i> $\Delta$ sipYpAGAs5 .....	57
5.2.	Estudi de la disminució de la quantitat de fosfats en el medi .....	58

5.2.1.	Estudi en la soca salvatge <i>S. lividans</i> TK21pAGAs5 .....	59
5.2.2.	Estudi en la soca mutada <i>S. lividans</i> $\Delta$ sipYpAGAs5 .....	61
5.3.	Producció d'agarasa en la soca <i>S. lividans</i> $\Delta$ sipYpAGAs5 en discontinu alimentat.....	63
5.3.1.	Operació discontinua alimentada: Addició de casaminoàcids o inici amb concentració doble d'casaminoàcids .....	64
5.3.2.	Addició de manitol .....	69
5.3.3.	Comparativa dels creixements en discontinu alimentat.....	72
5.3.4.	Anàlisi de la proteïna agarasa per Western blot.....	73
5.3.4.1.	Posta a punt del mètode analític .....	73
5.3.4.1.1.	Mostres precipitades: Estudi de la quantitat de la biomassa i el temps de transferència .....	74
5.3.4.2.	Estudi de la detecció de l'agarasa mitjançant el western blot sense precipitar les proteïnes .....	78
5.4.	Comparació dels modes d'operació per a la producció d'agarasa .....	79
5.5.	Conclusions finals del capítol II .....	81
6.	Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en <i>Streptomyces lividans</i> .....	83
6.1.	Generació de les soques sobreproductores de lacasa de <i>Streptomyces lividans</i> TK21	84
6.1.1.	Clonació de la lacasa sota el seu propi promotor (SLI6712p) .....	84
6.1.1.1.	Clonació de la lacasa sota el seu propi promotor utilitzant pIJ487.....	85
6.1.1.2.	Clonació de la lacasa sota el seu propi promotor utilitzant pFD666.....	87
6.2.	Anàlisi de creixement i producció de la soca <i>S. lividans</i> TK21 pFD-lacasa .....	89
6.3.	Promotors alternatius per a la producció de lacasa en <i>S. lividans</i> .....	90
6.3.1.	Clonació de la lacasa sota el promotor del gen de resistència a eritromicina....	90
6.3.2.	Clonació de la lacasa sota el promotor de l'agarasa .....	93
6.4.	Redisseny i modificació del medi NMMP per als creixements en Erlenmeyer i bioreactor per a la producció de lacasa .....	95
6.5.	Expressió de la proteïna lacasa i estudi de producció en dues fonts de carboni.....	97
6.5.1.	Estudi del creixement i producció de la lacasa en dues fonts de carboni i expressant el gen sota el promotor del gen de resistència a eritromicina.....	98
6.5.2.	Estudi del creixement i producció de lacasa en dues fonts de carboni i expressant el gen sota el promotor de l'agarasa .....	99

6.5.2.1.	Cultiu en discontinu utilitzant manitol.....	99
6.5.2.2.	Cultiu en discontinu utilitzant glucosa .....	102
6.6.	Comparació de producció dels cultius .....	105
6.6.1.	Comparativa dels cultius en discontinu .....	105
6.6.1.1.	Cultius en discontinu alimentat utilitzant en dues fonts de carboni: mannitol o glucosa .....	107
6.6.2.	Comparativa dels cultius en discontinu alimentat.....	110
6.7.	Conclusions finals del capítol III .....	115
7.	Conclusions finals.....	117
8.	Bibliografia .....	119



## ÍNDIX DE FIGURES

**Figura 1.** Representació del cicle vital de *Streptomyces*. Adaptat de Angert (2005).

**Figura 2.** Esquema simplificat de la secreció de proteïnes per la via Sec en *Streptomyces*. Adaptat de Anné et al. (2012).

**Figura 3.** Esquema simplificat de la secreció de proteïnes per la via Tat en *Streptomyces*. Adaptat de Anné et al. (2012).

**Figura 4.** Esquema dels mutants de *S. lividans* TK21 deficients en els gens *sip*. Adaptada de Palacín et al. (2002).

**Figura 5.** Morfologia dels mutants deficients en *sip*. A: Pigmentació del miceli de les soques tal com estan indicades en la figura. B: Morfologia del miceli aeri observada al microscopi de contrast de fases de: *S. lividans* TK21 (a), *S. lividans*  $\Delta sipW$  (b), *S. lividans*  $\Delta sipX$  (c), *S. lividans*  $\Delta sipY$  (d) i *S. lividans*  $\Delta sipZ$  (e). Adaptada de Palacín et al. (2002).

**Figura 6.** Proteïnes totals analitzades per SDS-PAGE. A la soca salvatge *S. lividans* TK21 i amb els mutants *S. lividans*  $\Delta sipW$ , *S. lividans*  $\Delta sipX$ , *S. lividans*  $\Delta sipY$  i *S. lividans*  $\Delta sipZ$  a diferents temps de cultiu: 12h (carrils 1), 22h (carrils 2), 36h (carrils 3) i 45h (carrils 4). Adaptada de Palacín et al. (2002).

**Figura 7.** Patró de secreció d'agarasa en els mutants deficients de *sip*. Es mostra la detecció associada a la cèl·lula i la detecció d'agarasa extracel·lular en la soca salvatge i en els quatre mutants en diferents temps: 12h (carrils 1), 22h (carrils 2), 36h (carrils 3) i 45h (carrils 4). Adaptada de Palacín et al. (2002).

**Figura 8.** Anàlisi dels promotors amb la tècnica de protecció de la nucleasa S1. Nivells de transcrits de RNA del gen *dagA* en la fase final del cultiu en presència de galactosa (GAL), glucosa (GLU) o agar parcialment hidrolitzat (AGAR) i les combinacions entre ells. Els promotors es numeren en p1, p2, p3 i p4 (Servín-González et al. 1994).

**Figura 9.** Corbes de creixement de les soques *S. lividans* TK21pIJ487 i *S. lividans* TK21pAGAs5.

**Figura 10.** Creixement de la soca *S. lividans* TK21pAGAs5 en medi NMMP amb manitol com a font de carboni.

**Figura 11.** Creixement de la soca *S. lividans* TK21pAGAs5 amb glucosa com a font de carboni.

**Figura 12.** Creixement de la soca *S. lividans* TK21pAGAs5 en medi NMMP sense font de carboni.

**Figura 13.** Cultius en discontinu en bioreactor de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ . A: Creixement de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  en manitol. B: Creixement de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  en glucosa.

**Figura 14.** Cromatograma d'un patró de D-galactosa.

**Figura 15.** Cromatograma equivalent per a totes les mostres analitzades en la cinètica de la reacció de l'agarasa. El pic als 7 minuts correspon al tampó imidazol.

**Figura 16.** Estudi de la interferència dels components del medi NMMP en l'assaig enzimàtic. A: Interferència del manitol (0-10g·L<sup>-1</sup>); B: Interferència de la glucosa (0-10g·L<sup>-1</sup>); C: Interferència dels casaminoàcids (0-5g·L<sup>-1</sup>).

**Figura 17.** Estructura de les molècules de les solucions tampó. A: Imidazol. B: Bis-Tris.

**Figura 18.** Cinètica de la reacció de l'assaig agarasa.

**Figura 19.** Creixement model de la soca *S. lividans ΔsipYpAGAs5* que s'utilitza per veure les característiques d'aquesta soca.

**Figura 20.** Cultiu en continu amb la soca *S. lividans ΔsipYpAGAs5* amb medi NMMP amb mannitol i amb tres nivells de fosfat.

**Figura 21.** Cultiu discontinu alimentat amb una addició de casaminoàcids de la soca *S. lividans ΔsipYpAGAs5*.

**Figura 22.** Representació de les activitats específiques del cultiu de *S. lividans ΔsipYpAGAs5* en el cultiu amb addició de casaminoàcids. A: Representació de l'activitat específica per unitat de biomassa. B: Representació de l'activitat específica per unitat de proteïna.

**Figura 23.** Cultiu discontinu alimentat partint d'una concentració de casaminoàcids doble i amb addicions puntuals de mannitol amb la soca *S. lividans ΔsipYpAGAs5*.

**Figura 24.** Representació de les activitats específiques del cultiu de *S. lividans ΔsipYpAGAs5* en el cultiu amb addició de mannitol partint d'una concentració doble de casaminoàcids. A: Representació de l'activitat específica per unitat de biomassa. B: Representació de l'activitat específica per unitat de proteïna.

**Figura 25.** Electroforesi de proteïnes del cultiu amb addicions de mannitol i partint d'una concentració doble de casaminoàcids de *S. lividans ΔsipYpAGAs5*. El carril 1 correspon al marcador de pes molecular i la resta de carrils corresponen a les mostres del cultiu mencionat: 46h (carril 2), 48h (carril 3), 50h (carril 4), 52h (carril 5), 54h (carril 6), 56h (carril 7), 58h (carril 8), 68h (carril 9), 72h (carril 10), 76h (carril 11), 78h (carril 12), 94h (carril 13), 100h (carril 14).

**Figura 26.** Cultiu discontinu alimentat amb addicions puntuals de mannitol amb la soca *S. lividans ΔsipYpAGAs5*.

**Figura 27.** Evolució de l'activitat agarasa i l'aparició de proteases en el medi extracel·lular en el cultiu discontinu amb addicions de mannitol de la soca *S. lividans ΔsipYpAGAs5*.

**Figura 28.** Representació de les activitats específiques del cultiu de *S. lividans ΔsipYpAGAs5* en el cultiu amb addicions de mannitol. A: Representació de l'activitat específica per unitat de biomassa. B: Representació de l'activitat específica per unitat de proteïna.

**Figura 29.** Electroforesi de proteïnes del cultiu amb addicions de mannitol de *S. lividans ΔsipYpAGAs5*. Els carrils 1, 15 i 22 corresponen al marcador de pes molecular i la resta de carrils corresponen a les mostres del cultiu mencionat: 24h (carril 2), 26h (carril 3), 28h (carril 4), 30h (carril 5), 32h (carril 6), 34h (carril 7), 44h (carril 8), 46h (carril 9), 48h (carril 10), 50h (carril 11), 52h (carril 12), 54h (carril 13), 56h (carril 14), 58h (carril 16), 68h (carril 17), 71h (carril 18), 76h (carril 19), 81h (carril 20) i 93h (carril 21).

**Figura 30.** Cultiu discontinu alimentat amb addicions puntuals de mannitol amb la soca *S. lividans ΔsipYpIJ487*. Aquest cultiu serveix com a control negatiu per a l'anàlisi de Western blot.

**Figura 31.** Western de l'estudi preliminar de l'ajustament de la quantitat de mostra a carregar en el gel. En el carril 1 es va carregar un control positiu d'una mostra d'un cultiu prèviament comprovat. Els carrils 2-5 corresponen a les mostres del control negatiu amb *S. lividans*



*ΔsipYpIJ487* amb la quantitat corresponent a 0.5mg (carril 2), 1.0mg (carril 3), 1.5mg (carril 4) i 3.0mg (carril 5). I finalment els carrils 6-9 corresponen al cultiu amb *S. lividans ΔsipYpAGAs5* amb les quantitats 0.5mg (carril 6), 1.0mg (carril 7), 1.5mg (carril 8) i 3.0mg (carril 9).

**Figura 32.** Electroforesi SDS-PAGE del gel utilitzat per al Western. La tinció amb el colorant Comassie es va donar posteriorment a la transferència de les proteïnes des del gel a una membrana mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric. En el carril 1 es va carregar un control positiu d'una mostra d'un cultiu prèviament comprovat. Els carrils 2-5 corresponen a les mostres del control negatiu amb *S. lividans ΔsipYpIJ487* amb la quantitat corresponent a 0.5mg (carril 2), 1.0mg (carril 3), 1.5mg (carril 4) i 3.0mg (carril 5). I finalment els carrils 6-9 corresponen al cultiu amb *S. lividans ΔsipYpAGAs5* amb les quantitats 0.5mg (carril 6), 1.0mg (carril 7), 1.5mg (carril 8) i 3.0mg (carril 9).

**Figura 33.** Evolució de l'activitat agarasa del cultiu de *S. lividans ΔsipYpAGAs5*. Amb cercles vermells estan marcades les mostres que es van analitzar per Western blot.

**Figura 34.** Western blot del cultiu de *S. lividans ΔsipYpAGAs5* amb un ajustament dels precipitats de 0.1mg de pes sec. Els carrils corresponen a l'evolució del cultiu: 24h (carril 1), 34h (carril 2), 46h (carril 3), 50h (carril 4), 58h (carril 5), 68h (carril 6), 76h (carril 7) i 81h (carril 8).

**Figura 35.** Electroforesi SDS-PAGE del gel utilitzat per al Western. Els carrils corresponen a l'evolució del cultiu: marcador de pes molecular (carril 1), 24h (carril 2), 34h (carril 3), 46h (carril 4), 50h (carril 5), 58h (carril 6), 68h (carril 7), 76h (carril 8) i 81h (carril 9).

**Figura 36.** Western blot del cultiu de *S. lividans ΔsipYpAGAs5* amb un ajustament dels precipitats de 0.1mg de pes sec i amb una duració de la transferència de 1.25h. Els carrils corresponen a l'evolució del cultiu: 24h (carril 1), 34h (carril 2), 46h (carril 3), 50h (carril 4), 58h (carril 5), 68h (carril 6), 76h (carril 7) i 81h (carril 8).

**Figura 37.** Western blot del cultiu de *S. lividans ΔsipYpAGAs5* amb un ajustament de les mostres del cultiu cel·lular a 0.02mg de pes sec i amb una duració de la transferència de 1.25h. Els carrils corresponen a l'evolució del cultiu: 24h (carril 1), 34h (carril 2), 46h (carril 3), 50h (carril 4), 58h (carril 5), 68h (carril 6), 76h (carril 7) i 81h (carril 8).

**Figura 38.** Evolució de l'activitat agarasa i l'increment en la intensitat del pic del Western blot.

**Figura 39.** Seqüència amplificada del gen complet de la lacasa de *Streptomyces lividans*. En blau se senyalitza el gen lacasa (des del codó d'inici al codó stop) i en grana la possible regió promotora.

**Figura 40.** Mapa plasmídic de pIJ487: utilitzat en un primer moment per a la clonació de la lacasa sota control del seu propi promotor.

**Figura 41.** Comprovació per PCR de la clonació de la lacasa en el plasmidi pIJ487. Per ordre de carrils: marcador (carril 1), control amb DNA genòmic (carril 2), extracció plasmídica dels 4 clons positius (carrils 3, 4, 5 i 6). Es va fer un control negatiu que va confirmar que no hi havia contaminacions (no mostrat).

**Figura 42.** Plasmidi utilitzat per a *Streptomyces*, pFD666. A) Mapa plasmídic del plasmidi pFD666. B) Comprovació per restricció del plasmidi pFD666 amb els enzims de restricció. Els carrils corresponen a: marcador de pes molecular (carril 1), digestió plasmidi pFD666 amb NotI i SacI que dona lloc a fragments de 569bp, 900bp i 3782bp (carril 2), digestió amb NotI que dona un

fragment de 5251bp (carril 3) i digestió amb NcoI i HindIII que dona dos fragments de 343bp i 4908bp (carril 4).

**Figura 43.** Generació del plasmidi de sobreproducció de la lacasa sota el control del seu propi promotor. A: Representació del plasmidi pFD-laccase per a la construcció de la soca productora de lacasa sota el control del seu propi promotor. B: Anàlisi per restricció d'un dels clons obtinguts. Per ordre d'esquerre a dreta hi ha: el marcador de pes molecular (carril 1), clon 1 (carril 2), clon 2 (carril 3) i clon 3 (carril 4).

**Figura 44.** Creixement de la soca productora sota el control del seu propi promotor en medi NMMP. A: Creixement de la soca *S. lividans* TK21pFD-lacasa en mannitol. B: Creixement de la soca *S. lividans* TK21pFD-lacasa en glucosa.

**Figura 45.** Plasmidi utilitzat per a *Streptomyces*, pIJ86. A) Mapa plasmídic del plasmidi pIJ86. B) Comprovació per restriccions del plasmidi pIJ86 amb enzims de restricció. Els carrils corresponen a: marcador de pes molecular (carril 1), digestió del plasmidi pIJ86 amb SacI que dona lloc a fragments de 751bp, 1132bp i 3912bp (carril 2), digestió amb BamHI que dona un fragment de 5795bp (carril 3) i digestió amb NotI que dona fragments de 1478bp i 4317bp (carril 4).

**Figura 46.** Generació del plasmidi de sobreproducció de lacasa sota el control del promotor de l'agarasa. A: Representació del plasmidi pIJ86-laccase per a la construcció de la soca productora de lacasa sota el control del promotor del gen de resistència a eritromicina. B: Anàlisi per restricció d'un dels clons obtinguts. Per ordre d'esquerre a dreta hi ha: el marcador de pes molecular (carril 1), plasmidi digerit amb BamHI (carril 2) i el resultat de la restricció doble amb BamHI i HindIII (carril 3) en que s'observa una banda al voltant de 6000pb i una altra d'uns 1200pb.

**Figura 47.** Amplicó generat amb els oligonucleòtids DagAp\_Fw i DagAp\_Rv. En lila se senyalitzen les dianes de restricció per a la posterior clonació, en verd la seqüència utilitzada per al disseny dels oligonucleòtids, en grana la seqüència que conté les 5 possibles regions promotores (subratllades) i en blau l'inici de transcripció del gen.

**Figura 48.** Comprovació per PCR colonial de la clonació de DagAp. Presentació del gel d'electroforesi de DNA en el qual hi ha el marcador (carril 1) i el resultat de les PCR colonials dels clons 5 (carril 2), clon 16 (carril 3), clon M (carril 4) i clon R (carril 5).

**Figura 49.** Generació del plasmidi de sobreproducció de la lacasa sota el control del promotor de l'agarasa. A: Representació del plasmidi pFD-DagAp-laccase per a la construcció de la soca productora de lacasa sota el control del promotor de l'agarasa. B: Anàlisi per PCR colonial d'alguns dels clons obtinguts. Per ordre d'esquerre a dreta hi ha: el marcador de pes molecular (carril 1), control negatiu per a determinar possibles contaminacions (carril 2), i els resultats de les PCR colonials diferents clons: clon 26 (carril 3), clon 35 (carril 4), clon 3 (carril 5) i clon 14 (carril 6).

**Figura 50.** Pèl·lets de la soca *S. lividans*  $\Delta$ sipYpFD-DagAp-lacasa en medi NMMP. A: Medi NMMP amb mannitol com a font de carboni. B: Medi NMMP amb glucosa.

**Figura 51.** Seqüència d'aminoàcids de la pre-proteïna lacasa extreta del NCBI.

**Figura 52.** Cultiu en discontinu en bioreactor utilitzant glucosa com a font de carboni de la soca productora *S. lividans*  $\Delta$ sipYpIJ-laccase.

**Figura 53.** Cultius en discontinu en bioreactor utilitzant mannitol com a font de carboni. A: Creixement de la soca control *S. lividans ΔsipY* en mannitol. B: Creixement de la soca productora *S. lividans ΔsipYpFD-DagAp-laccase* en mannitol.

**Figura 54.** Electroforesi de proteïnes dels cultius de la *S. lividans ΔsipY* i la soca *S. lividans ΔsipYpFD-DagAp-laccase*. Els carrils 1 i 8 són el marcador de pes molecular i els carrils de 2-7 corresponen a les mostres del cultiu control: 33h (carril 2), 48h (carril 3), 52h (carril 4), 57h (carril 5), 72h (carril 6) i 76h (carril 7). I els carrils 9-11 corresponen a les mostres del cultiu de la soca *S. lividans ΔsipYpFD-DagAp-laccase*: 57h (carril 9), 72h (carril 10) i 76h (carril 11). En un requadre vermell s'ha assenyalat la banda que correspon al pes molecular de la lacasa (32kDa).

**Figura 55.** Electroforesi de proteïnes del contingut intracel·lular del cultiu de *S. lividans ΔsipYpFD-DagAp-laccase*. Els carrils 1 i 7 són el marcador de pes molecular i els carrils de 2-6 corresponen a les mostres del cultiu control: 48h (carril 2), 52h (carril 3), 57h (carril 4), 72h (carril 5), 76h (carril 6).

**Figura 56.** Cultius en discontinu en bioreactor utilitzant glucosa com a font de carboni. A: Creixement de la soca control *S. lividans ΔsipY*. B: Creixement de la soca productora *S. lividans ΔsipYpFD-DagAp-laccase*.

**Figura 57.** Electroforesi de proteïnes dels cultius de la *S. lividans ΔsipY* i la soca *S. lividans ΔsipYpFD-DagAp-laccase* en glucosa. Els carrils 1 i 7 són el marcador de pes molecular i els carrils de 2-6 corresponen a les mostres del cultiu control: 32h (carril 2), 48h (carril 3), 52h (carril 4), 57h (carril 5) i 72h (carril 6). I els carrils 8-10 corresponen a les mostres del cultiu de la soca *S. lividans ΔsipYpFD-DagAp-laccase*: 52h (carril 8), 57h (carril 9) i 72h (carril 10). En un requadre vermell s'ha assenyalat la banda que correspon al pes molecular de la lacasa (32kDa).

**Figura 58.** Electroforesi de proteïnes del contingut intracel·lular del cultiu de *S. lividans ΔsipYpFD-DagAp-laccase* en glucosa. Els carrils 1 i 8 són el marcador de pes molecular i els carrils de 2-7 corresponen a les mostres del cultiu control: 28h (carril 2), 32h (carril 3), 48h (carril 4), 52h (carril 5), 57h (carril 6) i 72h (carril 7).

**Figura 59.** Comparativa dels processos en discontinu utilitzant mannitol o glucosa. Evolució amb el temps de: l'activitat específica per gram de biomassa (A), l'activitat específica per mil·ligram de proteïna (B), l'activitat específica de lacasa (C) i el percentatge de lacasa en el total de proteïnes del sobrenedant (D). En tots els gràfics les barres negres corresponen al cultiu en mannitol i les barres grises al cultiu en glucosa.

**Figura 60.** Cultius en discontinuo alimentat en bioreactor. A: Creixement de la soca *S. lividans ΔsipYpFD-DagAp-laccase* en mannitol. B: Creixement de la soca productora *S. lividans ΔsipYpFD-DagAp-laccase* en glucosa.

**Figura 61.** Electroforesi de proteïnes dels cultius discontinus alimentats de la soca *S. lividans ΔsipYpFD-DagAp-laccase*. Els carrils 1 i 8 corresponen al marcador de pes molecular. Els carrils de 2-7 corresponen a les mostres del cultiu discontinu alimentat amb addició de mannitol (Figura 60A): 48h (carril 2), 55h (carril 3), 58h (carril 4), 72h (carril 5), 82h (carril 6) i 96h (carril 7). Els carrils de 9-14 corresponen a les mostres del cultiu discontinu alimentat amb addicions de glucosa (Figura 60B): 47h (carril 9), 49h (carril 10), 51h (carril 11), 53h (carril 12), 56h (carril 13) i 72h (carril 14).

**Figura 62.** Comparativa dels processos en discontinu alimentat utilitzant mannitol o glucosa. Activitat específica per gram de biomassa

**Figura 63.** Comparativa dels processos en discontinu alimentat utilitzant manitol o glucosa. Activitat específica per mil·ligram de proteïna

**Figura 64.** Comparativa dels processos en discontinu alimentat utilitzant manitol o glucosa. Activitat específica per mil·ligram de lacasa en el temps. En el cas de la glucosa només es presenta la segona addició.

**Figura 65.** Comparativa dels processos en discontinu alimentat utilitzant manitol o glucosa. Percentatge de lacasa en el total de proteïnes del sobrenedant.

## ÍNDIX DE TAULES

**Taula 1.** Alguns antibiòtics produïts comercialment per **Streptomyces**. Adaptada de Madigan et al. (1999).

**Taula 2.** Nombre de proteïnes sensibles de ser secretades per la via Tat d'alguns microorganismes. Adaptada de Palmer & Berks (2012)

**Taula 3.** Exemples recents de la producció de proteïnes en *Streptomyces lividans*. Adaptada de Anné et al. (2012).

**Taula 4.** Soques d'*Escherichia coli* utilitzades en aquest treball.

**Taula 5.** Soques de *Streptomyces lividans* utilitzades en aquest treball.

**Taula 6.** Enumeració, descripció i origen dels vectors utilitzats en aquest treball.

**Taula 7.** Programes utilitzats en les reaccions de PCR.

**Taula 8.** Oligonucleòtids utilitzats com a encebadors per a les reaccions de PCR. Els fragments destacats en negreta corresponen a les dianes de restricció.

**Taula 9.** Composició del medi NMMP (Keiser et al. 2000).

**Taula 10.** Comparativa dels punts màxims d'activitat agarasa dels processos en manitol i en glucosa amb la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ . \*Aquesta activitat va ser mesurada quan no quedava glucosa en el medi

**Taula 11.** Comparació dels valors de les activitats. Els valors expressats a la taula són de les mateixes mostres mesurades directament del medi extracel·lular o amb un pas previ de precipitació. Els valors que es presenten estan en base la unitat de volum de medi del reactor.

**Taula 12.** Estudi qualitatiu de la influència del tampó en l'activitat enzimàtica.

**Taula 13.** Influència del volum de mostra en l'assaig d'activitat.

**Taula 14.** Comparació de les soques *S. lividans* TK21pAGAs5 i *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  tenint en compte la nova anàlisi d'activitat.

**Taula 15.** Composició elemental del microorganisme *S. lividans* TK21pAGAs5

**Taula 16.** Nivells de fosfat establerts per l'estudi l'efecte d'aquest compost en el cultiu de *S. lividans*.

**Taula 17.** Resum dels processos en continu amb la soca *S. lividans* TK21pAGAs5. Els valors destacats en cursiva que corresponen a la condició de nivell de fosfat intermedi que és possible que no siguin ajustats a la realitat degut als problemes morfològics destacats anteriorment.

**Taula 18.** Resum dels processos en continu amb la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ .

**Taula 19.** Comparació final de les soques estudiades.

**Taula 20.** Resum dels cultius en discontinu alimentat realitzats per a la producció d'agarasa.

**Taula 21.** Resum de les produccions d'agarasa i produccions específiques de biomassa i proteïna total dels tres modes d'operació.

**Taula 22.** Resum de les productivitats d'agarasa i productivitats específiques de biomassa i proteïna total dels tres modes d'operació.

**Taula 23.** Anàlisi de la composició aminoacídica de la proteïna lacasa de *Streptomyces*. Dades obtingudes amb l'eina ProtParam de l'ExPASy.

**Taula 24.** Comparació dels valors màxims d'activitat en els cultius de *S. lividans*  $\Delta sipYpFD$ -DagAp-lacasa en manitol o glucosa.

**Taula 25.** Comparació dels valors màxims d'activitat en els cultius de *S. lividans*  $\Delta sipYpFD$ -DagAp-lacasa en manitol o glucosa abans i després de les addicions de substrat.

## RESUM

La producció de proteïnes homòlogues i heteròlogues a escala industrial requereix sistemes d'expressió variats i eficients. Els bacteris grampositius, com *Streptomyces*, poden ser una alternativa per a la producció de proteïnes recombinants ja que aquestes són produïdes i secretades al medi. La seqüenciació del genoma d'algunes espècies de *Streptomyces* i el seu anàlisi post-genòmic ha permès determinar i caracteritzar la seva maquinària de secreció. Així, se sap que els precursors de les proteïnes que s'han de secretar són exportats majoritàriament per una via principal de secreció (via Sec) o bé per una via secundària (via Tat). Aquests precursors contenen un pèptid senyal de tipus I que permet la seva correcta translocació a través de la membrana plasmàtica, la seqüència del qual determina per quina de les dues vies es dirigeix. Un cop translocades, les peptidases senyal de tipus I (SPases) processen la majoria d'aquestes proteïnes secretades i les alliberen al medi extracel·lular en la seva forma madura.

Estudis previs en la maquinària de secreció han determinat que *Streptomyces lividans* té quatre peptidases senyal Sip (SipW, SipX, SipY i SipZ) de les quals, SipY és la que desenvolupa el paper majoritari. La soca deficient en aquesta proteïna SipY té la capacitat de secreció notablement afectada però, paradoxalment, és un bon hoste per a la sobreproducció de proteïnes secretades, ja que presenta una activitat proteàsica considerablement disminuïda.

En aquest treball s'ha estudiat la producció d'agarasa i de lacasa en la soca SipY (*S. lividans*  $\Delta sipY$ ) a escala de bioreactor per avaluar si aquesta soca pot ser considerada com a possible hoste per a la producció de proteïnes recombinants per la indústria. Aquestes dues proteïnes se secreten majoritàriament per la via Tat. En el cas de l'enzim agarasa, el gen expressat prové de *S. coelicolor* A3(2) i s'ha produït l'enzim en discontinu amb la soca salvatge (*S. lividans* TK21pAGAs5) i la soca mutada (*S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ ). La soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  ha presentat una millor producció i s'ha seleccionat el medi més adequat per tal de produir aquesta proteïna estudiant el seu comportament operant en continu. També s'han estudiat diferents estratègies en discontinu alimentat, entre les quals la major producció s'ha obtingut amb una addició de mannitol i evitant que aquesta font de carboni s'esgoti en el medi.

En el cas de la lacasa, s'han construït tres soques en les quals el gen de la pròpia lacasa de *S. lividans* és regulat per tres promotors diferents: el promotor propi de la lacasa, el promotor del gen de resistència a eritromicina i el promotor del gen agarasa de *S. coelicolor*. La soca en el qual el gen és regulat pel promotor del gen agarasa (*S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagA-laccase$ ) ha estat seleccionada i s'ha estudiat la producció de l'enzim utilitzant mannitol o glucosa com a font de carboni en discontinu i discontinu alimentat. En l'operació en discontinu alimentat van ser necessàries dues addicions de glucosa per assolir els mateixos nivells de producció que amb una addició de mannitol.





## SUMMARY

Recombinant protein production on industrial scale requires varied and efficient expression systems. Gram-positive bacteria such as *Streptomyces*, may be an alternative since proteins are secreted through the medium. The sequence of the genome of several *Streptomyces* species and their post-genomic analysis has allowed to determine and characterize the secretion machinery. Two secretion pathways are mainly use in *Streptomyces*: Sec pathway and Tat pathway. Protein precursors contain type I signal peptide that allows a proper translocation though membrane and whose sequence determines which pathway must be used in order to export each protein. During its translocation, type I signal peptidases (SPases) cleave the signal peptide leading the secretion of the mature protein through the medium. Previous studies on the secretory machinery have described four signal peptidases in *Streptomyces lividans* (SipW, SipX, SipY and Sip Z) and they have postulate SipY as the one which develops the main role in protein secretion. SipY deficient strain has a secretion ability significantly affected but, paradoxically, it is a good host for the protein overproduction since it has a considerably reduced protease activity.

In this work, we have studied the production of agarase and laccase in SipY<sup>-</sup> strain (*S. lividans*  $\Delta sipY$ ) in a bioreactor scale to assess whether this strain can be considered as a host for the production of recombinant proteins in the industry. These two proteins are mainly secreted by Tat pathway. Firstly, agarase from *S. coelicolor* A3(2) was cloned in a multicopy plasmid in *S. lividans* wild type strain and SipY<sup>-</sup> mutant strain (*S. lividans* TK21pAGAs5 and *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ ). Batch cultures have been carried out and *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  of which has presented better agarase production and it has been selected. Appropriated medium has been also selected operating in continuous.

Secondly, focusing on laccase production, three strains have been constructed in which the homologous gene of *S. lividans* is regulated by three different promoters: its own promoter, the promoter of erythromycin resistance gene and the *S. coelicolor* agarase promoter. The strain in which the laccase gene is regulated by agarase promoter (*S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagAp-laccase$ ) has been selected and studied in batch and fed-batch mode using mannitol or glucoses as carbon source. In fed-batch cultures, two glucose addition have been necessary to achieve the same production as unic mannitol addition.



## NOMENCLATURA

ATP: adenosina trifosfat  
Bis-Tris: bis(2-hidroxietil)-amino-tris(hidroximetil)-metà  
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*  
CDA: antibiòtics depenents de calci  
CHO: Chinese Hamster Ovary  
CNB: Centro Nacional de Biotecnología  
CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
dagA: gen agarasa de *S. coelicolor*  
DDT: diclorodifenilticloroetà  
DMP: 2,6-Dimetilfenol  
DMSO: dimetilsulfòxid  
DNA: àcid desoxiribonucleic  
dNTPs: desoxiribonucleòtids trifosfat  
*E.*: *Escherichia*  
EDTA: àcid etilendiamina tetracètic  
*ermE*: gen de resistència a eritromicina  
et al.: i altres  
FDA: Food and Drug Administration  
GC: guanina/citosina  
kb: kilobase  
kDa: kilodalton  
L: litres  
Mb: megabases  
mg: mil·lígrams  
mM: mil·limolar  
NCBI: National Centre of Biotechnology Information  
*neo*: gen de resistència a neomicina  
nitA: promotor de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous*  
p: regió promotora  
PAHs: hidrocarburs aromàtics policíclics  
pb: parells de bases  
PCR: reacció en cadena de la polimerasa  
pre-DagA: precursor de la proteïna agara  
RNA: àcid ribonucleic  
rpm: revolucions per minut  
rRNA: àcid ribonucleic ribosomal  
*S.*: *Streptomyces*  
SAM: S-Adenosinametonina  
SDS: dodecilsulfat sòdic  
Sec: via de secreció principal  
SLAC: gen de la lacasa de *Streptomyces*  
*sp.*: espècie  
SPases: peptidases senyal  
SRP: partícula senyal de reconeixement  
TAE: tampó tris-acetat-Na-EDTA

Tat: Twin Arginine Translocation  
TCA: àcid tricloroacètic  
TES: àcid N-tris-hidroximetil-metil-2-aminoetà sulfònic  
tipA: promotor induïble per thioestrepton  
TNBSA: àcid trinitrobenzenosulfònic  
tRNA: àcid ribonucleic de transferència  
trs: gen de resistència a thioestrepton  
μ: micro

## 1. Introducció

La producció de proteïnes recombinants en sistemes microbiològics va revolucionar, sense cap mena de dubte, la bioquímica. Els antics projectes d'obtenció de petites quantitats de proteïna a partir de grans proporcions de teixits d'animals o de plantes es van convertir en nous projectes de producció de proteïnes recombinants en grans quantitats a partir del desenvolupament de processos industrials (Walsh 2012). Aquesta tècnica va esdevenir i és actualment una eina indispensable en la recerca pública en centres d'investigació i universitats però també en el món empresarial privat, on es busca desenvolupar nous productes que puguin satisfer diverses necessitats humanes.

Al llarg de les últimes dècades s'han desenvolupat diversos sistemes d'expressió en els quals es poden produir aquetes proteïnes recombinants (Overton 2014). L'elecció del sistema d'expressió per a cada procés depèn de varis factors: el producte i la seva destinació, el cost de desenvolupament del procés de producció, la senzillesa del procés, la complexitat i la necessitat d'afinament del procés de purificació, l'estat del mercat d'aquest producte i la necessitat de modificacions post-traduccionals del producte final, entre d'altres. Actualment, els fàrmacs aprovats per la FDA (Food and Drug Administration) per a l'ús terapèutic són produïts per un grup molt reduït de sistemes d'expressió: *Escherichia coli*, cèl·lules d'ovari de hamster xinès (CHO), *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris* tot i que el més utilitzat és *E. coli* (Ferrer-Miralles et al. 2009). No obstant, *E. coli* no sempre és la millor opció principalment a causa de la insolubilitat que adquireix la proteïna sobreexpressada a l'interior cel·lular, els anomenats cossos d'inclusió (Baneux & Mujacic 2004). Aquests agregats proteics contenen proteïna inactiva i és complicat recuperar-la en la seva forma nativa. La secreció de les proteïnes a l'exterior cel·lular esdevé, doncs, una possibilitat molt avantatjosa ja que el medi de cultiu és normalment oxidant, fet que propicia la formació dels ponts disulfur i, per tant, provoca un plegament correcte de la proteïna. A més a més, la secreció facilita el procés de purificació. Per tots aquests avantatges, s'han fet diversos intents per a conduir les proteïnes expressades en *E. coli* cap a l'exterior cel·lular (Yoon et al. 2010) però en pocs casos s'està utilitzant a escala industrial (Cesare et al. 2013). La paret dels bacteris gramnegatius està formada per dues membranes (interna i externa) que separen l'espai periplasmàtic i això complica la secreció i, a més a més, la membrana externa conté lipopolisacàrids, que són una font d'endotoxines important.

Una de les alternatives actualment disponibles per a la producció de proteïnes recombinants és la utilització de bacteris grampositius, entre els quals es troba el gènere *Streptomyces*. L'estructura de la seva paret bacteriana amb una única capa de peptidoglicà fa que siguin considerats uns hostes interessants sobretot per la seva capacitat potencial de secreció de les proteïnes directament al medi de cultiu. Els *Streptomyces* tenen una capacitat de secreció molt desenvolupada d'una gran varietat d'enzims hidrolítics que podrà ser aprofitada per a produir extracel·lularment les proteïnes desitjades (Gilbert et al. 1995).

En qualsevol cas, l'optimització de la producció de proteïnes d'interès industrial és crucial pel desenvolupament de processos biotecnològics per tal d'obtenir proteïnes per a destins tan diferents com: productes terapèutics, de diagnosi, mediambientals, alimentaris, per a l'agricultura, per a la producció de vacunes, per a biocatàlisi, etc. Un ampli ventall de sistemes d'expressió ajudarà a poder cobrir el rang de productes a produir. En aquest treball se centraran els esforços a produir proteïnes en *Streptomyces lividans*.

### 1.1. El gènere *Streptomyces*

El gènere *Streptomyces* és un grup de bacteris grampositius filamentosos aerobis de la família Streptomycetaceae, dins de l'ordre dels Actinomycetales (Anderson & Wellington 2001). Com la majoria d'actinomicets, *Streptomyces* té un alt contingut en citosina i guanina en el seu genoma (~73%) i desenvolupa un cicle vital complex que ha conduït a l'estudi exhaustiu de la seva genètica (Keiser et al. 2000).

Aquest grup de bacteris és àmpliament present en la naturalesa, principalment al sòl, on és capaç de degradar una gran varietat de compostos orgànics que el converteixen en un grup molt important en el procés de reciclatge del carboni (Bentley et al. 2002). La capacitat de degradació està estretament relacionada amb la secreció d'un gran nombre d'enzims hidrolítics a l'exterior cel·lular que permeten la seva adaptació al medi natural, format principalment per polímers insolubles (Gilbert et al. 1995). En aquest entorn se'ls identifica per l'olor a terra humida, que és el resultat de la secreció del compost geosmina (Gust et al. 2003). A més a més, aquest gènere és capaç de sintetitzar una gran varietat de metabòlits secundaris amb aplicacions en medicina, veterinària i agricultura. Principalment sintetitza antibiòtics però també antimicòtics, herbicides, pigments, agents antitumorals, etc. (Procópio et al. 2012; Thompson et al. 2002; Chater 2006; Olano et al. 2009). La diversitat i complexitat metabòlica va quedar palesa amb la seqüenciació del genoma de diverses espècies com per exemple *Streptomyces coelicolor* (Bentley et al. 2002). Es va revelar que la mida total del seu cromosoma era de 8.6 Mb, 3.8Mb de les quals estaven dedicades a la síntesi de metabòlits secundaris i exoenzims.

#### 1.1.1. Característiques generals del microorganisme i el seu cicle de vital

La morfologia de *Streptomyces* és filamentosa i recorda a la morfologia dels fongs, tot i tenir un origen evolutiu totalment diferent. Es creu que aquesta semblança pot ser deguda a l'adaptació dels dos tipus d'organismes a la supervivència en nínxols similars (Flärdh & Buttner 2009).

El diàmetre de les hifes oscil·la 1 i 5 µm i la seva longitud pot arribar a ser d'uns quants mil·límetres. Les hifes creixen de forma apical i el creixement exponencial d'aquest microorganisme es produeix per la ramificació addicional de les hifes. En funció de les condicions del procés i de la soca amb la qual es treballa, el creixement en medis submergits té lloc en forma d'agregats de micelis (pèl·lets) o de forma més dispersa. L'estructura dels pèl·lets condiciona la transferència d'oxigen i de nutrients en les cèl·lules (Sarrà Adroguer 1994).

El cicle de vida dels *Streptomyces* es caracteritza per ser morfològicament molt complex i perquè recorda el cicle de molts fongs filamentosos. Aquest cicle biològic (Figura 1) comença amb la germinació d'una espora mononucleada quan aquesta es troba en unes condicions que li són favorables. Aquesta espora forma un o dos tubs germinatius en un suport sòlid que s'estenen de forma apical donant lloc a llargues hifes multinucleades que conformen el miceli substrat. Passat un cert temps i en resposta a les limitacions nutricionals del medi o a altres factors d'estrès (Takano & Bibb 1994), s'inicia una cascada de senyals d'activació de gens que provoquen simultàniament la producció de metabòlits secundaris i la diferenciació morfològica. Sobre el miceli substrat comencen a formar-se hifes aèries (esporòfors) que s'escapen de l'entorn sòlid donant lloc al miceli aeri. La formació de septes forma cadenes d'espores

uninucleades (conidis), que seran les responsables de la dispersió del microorganisme. Tot i que les espores de *Streptomyces* no són tan resistents com les d'altres bacteris grampositius com *Bacillus sp.*, se sap que es poden mantenir grans períodes de latència al sòl (Flärdh & Buttner 2009) fins a trobar-se en condicions propenses per a la seva germinació. Tot i la complexitat d'aquest procés, fa uns anys s'ha vist que aquest el cicle vital era encara més complex i heterogeni però es representa esquemàticament a la Figura 1.

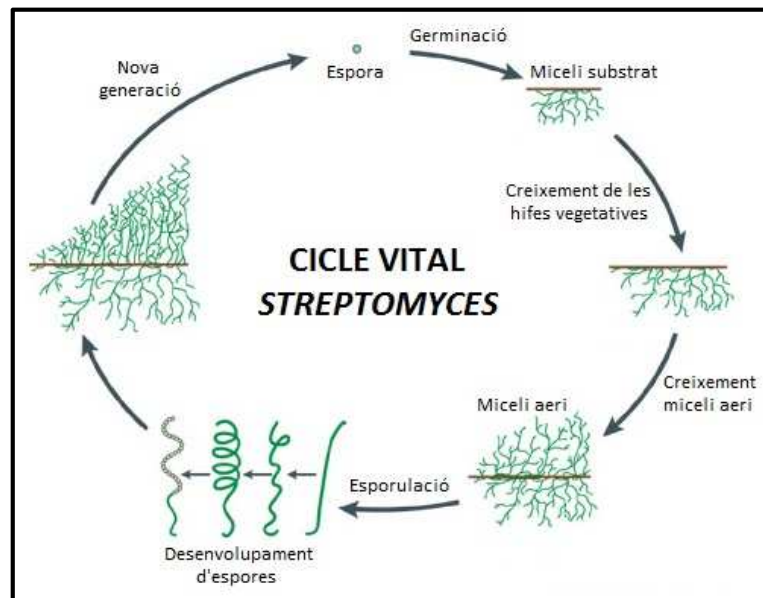


Figura 1. Representació del cicle vital de *Streptomyces*. Adaptat de Angert (2005).

En el gènere *Streptomyces* destaquen dues espècies que han estat estudiades àmpliament: *Streptomyces griseus*, que va ser la primera espècie utilitzada industrialment per a la producció de l'antibiòtic estreptomicina; i *Streptomyces coelicolor* A3(2), que ha servit de soca model per a l'estudi genètic i molecular (Keiser et al. 2000). El genoma d'aquestes, però també el d'altres espècies, ja han sigut seqüenciats: *S. griseus* (Ohnishi et al. 2008), *S. coelicolor* A3(2) (Bentley et al. 2002), *S. avermitilis* (Ikeda et al. 2003), *S. bingchengensis* (Wang et al. 2010), *S. scabiei* (Bignell et al. 2010) i *S. cattelya* (Barbe et al. 2011).

La seqüenciació del genoma complet de *S. coelicolor* A3(2) va permetre entendre la complexitat d'aquest gènere. El seu cromosoma únic i lineal està format per 8667507 parells de bases amb 7825 seqüències predites que són codificants, cosa que el converteix en el genoma bacterià més gran seqüenciat. La distribució dels gens al llarg del genoma és bastant uniforme tot i que, si s'analitza la tipologia de gens, es poden diferenciar tres zones: una zona central de 4.9Mb i dos braços als extrems de 1.5Mb (braç esquerre) i de 2.3Mb (braç dret). A la zona central hi ha codificades les seqüències relacionades amb funcions primàries de la cèl·lula: divisió cel·lular, replicació del DNA, transcripció i traducció, biosíntesi d'aminoàcids, etc. Mentre que en els braços s'hi codifiquen els gens de contingència, relacionats bàsicament amb la síntesi de metabòlits secundaris, exoenzims hidrolítics, transport de metabòlits, etc. És a dir, una sèrie de gens l'absència dels quals no comprometrien la viabilitat cel·lular però que proporcionen al microorganisme d'un metabolisme secundari molt complex. També cal destacar els 56 gens anotats de *S. coelicolor* que codifiquen per proteases: 27 serina proteases, 8 metal·loproteases

i 21 aminopeptidases que jugaran un paper clau en l'assimilació de nitrogen a partir de substàncies proteiques complexes del sòl com la queratina.

Els genomes de *S. coelicolor* A3(2) i de *S. lividans* TK21 presenten una alta homologia, fins a un 99.7% d'homologia en el 16S rRNA. Tot i això, hi ha certes diferències en alguns agrupaments genètics (illes genòmiques) que no són presents en *S. lividans* TK21 (Jayapal et al. 2007). El grup de gens relacionats amb els antibiòtics dependents del calci (CDA), el grup de gens relacionats amb la síntesi de l'antibiòtic actinorhodina, el gens relacionats amb la síntesi de S-Adenosinametonina (SAM) o les metiltransferases dependents de SAM i també algunes endonucleases de restricció sensibles als grups metil són alguns dels exemples de les diferències entre ambdues espècies (Lewis et al. 2010).

### 1.1.2. Importància del microorganisme a nivell industrial

La importància industrial del gènere *Streptomyces* ha estat tradicionalment alta per què és el productor de nombrosos antibiòtics i altres metabòlits secundaris biològicament actius. El nombre d'antibiòtics produïts per la família dels actinomicets representa dos terços del total d'antibiòtics coneguts produïts per microorganismes i d'aquests el 80% són produïts pel gènere *Streptomyces* (Keiser et al. 2000). A la Taula 1 es poden veure alguns exemples d'antibiòtics sintetitzats per espècies de *Streptomyces*.

**Taula 1. Alguns antibiòtics produïts comercialment per *Streptomyces*.** Adaptada de Madigan et al. (1999).

Antibiòtic	Microorganisme productor
Cicloheximida	<i>S. griseus</i>
Cicloserina	<i>S. orchidaceus</i>
Eritromicina	<i>S. erythreus</i>
Kanamicina	<i>S. kanamyceticus</i>
Lincomicina	<i>S. lincolnensis</i>
Neomicina	<i>S. fradiae</i>
Nistatina	<i>S. noursei</i>
Estreptomina	<i>S. griseus</i>
Tetraciclina	<i>S. rimosus</i>

### 1.2. El mecanisme de secreció de proteïnes de *Streptomyces*

L'optimització de la producció i la secreció de proteïnes recombinants és indispensable per tal de seguir avançant en la recerca i desenvolupament de nous productes a nivell industrial. Els processos en els quals el producte és secretat en el medi de cultiu tenen diversos avantatges respecte a aquells en què el producte es queda a l'interior cel·lular, entre els quals destaquen la reducció, en molts casos, dels costos de purificació i la possibilitat d'obtenir la proteïna en la seva forma nativa. Tot i això, s'ha descrit que la sobreproducció de proteïnes en bacteris grampositius pot comportar l'acumulació de la proteïna mal plegada, cosa que pot provocar un mal funcionament de la maquinària de secreció i comprometre la viabilitat cel·lular (Sarvas et al. 2004).

Com s'ha dit anteriorment, en els últims anys s'ha observat un interès creixent en la utilització del bacteri *Streptomyces* com a hoste per a la producció de proteïnes recombinants. El fet que aquests gènere de bacteris habiti normalment al sòl l'obliga a tenir una capacitat enzimàtica per explotar material orgànic complex per tal d'obtenir-ne els nutrients i això també



implica tenir una gran capacitat de secreció. Conèixer els sistemes de secreció de proteïnes en *Streptomyces* i els seus mecanismes de control de qualitat de les proteïnes secretades serà important per tal de saber en quins punts es pot millorar el procés.

El transport de proteïnes cap a la membrana per a la seva secreció és un procés essencial per a la cèl·lula que ha conservat al llarg de l'evolució. Amb la seqüenciació del genoma de *S. coelicolor* es va veure que 614 proteïnes (7.8%) tenien funcions predites relacionades amb la secreció i que 819 proteïnes (10.5%) eren sensibles de ser secretades al medi extracel·lular, especialment hidrolases (Bentley et al. 2002).

La via principal de secreció, la via Sec, i la via més minoritària, via Tat (Twin-Arginine-Translocation), són presents en *Streptomyces*. Però en aquest gènere bacterià, com en altres actinobacteris, també és present la via ESX-1 (Anné et al. 2014). Les proteïnes que són secretades per les dues primeres vies són sintetitzades com a pre-proteïnes i contenen un pèptid senyal que és una cadena d'aminoàcids a l'extrem N-terminal, la seqüència de la qual la conduirà per la via Sec o per la via Tat. En canvi, les proteïnes secretades per la via ESX-1 no tenen aquest pèptid senyal però tenen un senyal de secreció de set aminoàcids a l'extrem C-terminal (Daleke et al. 2012).

El pèptid senyal de les proteïnes secretades per la via Sec és d'una llargada aproximada de 35 aminoàcids (Gilbert et al. 1995). Aquest pèptid senyal és més llarg que el que tenen de mitjana altres bacteris grampositius (29-31 aminoàcids) i que el que tenen els bacteris gramnegatius (24 aminoàcids). La seqüència d'aquest pèptid senyal dona lloc a un domini N carregat positivament a l'extrem N-terminal del pèptid, seguit d'un domini H central que és hidrofòbic i un fragment C-terminal que conté els aminoàcids que constitueixen el lloc de reconeixement de la peptidasa senyal. Les peptidases senyal tipus I (SPase I) són els enzims encarregats d'eliminar el pèptid senyal durant o després de la translocació. El pèptid senyal de les pre-proteïnes que van per la via Tat són semblants als de la via Sec però tenen un motiu altament conservat amb la seqüència següent: S/T-R-R-x-F-L-K (Berks et al. 2005), que és el responsable de conduir les proteïnes cap a la via de secreció Tat.

Aquesta tesi se centrarà especialment en la via de secreció Tat que és la via per la qual se secreten majoritàriament les dues proteïnes que es produiran en aquest treball: agarasa i lacasa.

### 1.2.1. La ruta de secreció Sec en *Streptomyces*

La sobreexpressió de proteïnes que se secreten per la via Sec pot provocar que aquestes proteïnes siguin secretades a l'exterior cel·lular parcialment desplegades i això pot provocar una acumulació al medi extracel·lular de proteïna mal plegada. Aquest procés es dona en altres bacteris grampositius i és conegut com a estrès per secreció (Antelmann et al. 2003).

El translocó de la via Sec està format per SecY, SecE, SecG i YajC, també per les proteïnes de membrana SecF i SecD i la translocasa interna de membrana YidC identificada en el genoma de *S. lividans* (Cruz-Morales et al. 2013). En la Figura 2 es pot veure un esquema simplificat d'aquesta via de secreció. La pre-proteïna es dirigeix al translocó format per SecY, SecE i SecG que serà l'encarregat de dur a terme la translocació a través de la membrana plasmàtica utilitzant l'energia alliberada per la hidròlisi de ATP juntament amb la força protó-motriu de la membrana (Lycklama A Nijeholt & Driessen 2012).

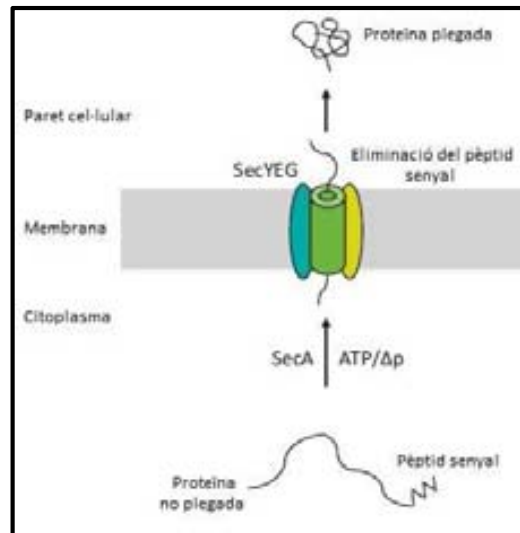


Figura 2. Esquema simplificat de la secreció de proteïnes per la via Sec en *Streptomyces*. Adaptat de Anné et al. (2012).

A diferència d'altres microorganismes, en *Streptomyces* no hi ha una proteïna que transporti les pre-proteïnes cap al translocó sinó que té un sistema de secreció co-traduccional. La partícula reconeixedora del senyal (SRP) està formada per la proteïna Ffh, un cadena curta de RNA i el receptor FtsY. Aquest FtsY facilita el transport co-traduccional de la pre-proteïna que s'està sintetitzant, la SRP i el ribosoma cap al translocó SecYEG (Anné et al. 2014). En *S. lividans*, la implicació de la SRP en el procés de secreció va ser demostrat experimentalment per Palacín et al. (2003).

Durant o després de la translocació, el pèptid senyal és eliminat per part de les peptidases senyal de tipus I del qual en *Streptomyces* s'han descrit quatre: SipX, SipW, SipY i SipZ (Parro et al. 1999). S'ha demostrat que SipY és la que desenvolupa un paper més important i la soca deficient en aquesta proteïna té una capacitat de secreció afectada severament (Palacín et al. 2002). Més endavant s'aprofundirà en aquest aspecte.

### 1.2.2. La ruta de secreció Tat en *Streptomyces*

La via Tat (Figura 3) va ser descrita en *Streptomyces* (Schaerlaekens 2004; Widdick et al. 2006; Palmer & Berks 2012) i difereix de la via Sec perquè exporta proteïnes totalment plegades i fins i tot, en alguns casos, unides a cofactors. L'energia pel transport a través de la membrana s'obté únicament a través de la força protó-motriu. Com els bacteris gramnegatius, *Streptomyces* conté els components essencials d'aquesta via que són TatA, TatB i TatC (Schaerlaekens et al. 2001) i això el diferencia d'altres bacteris grampositius els quals no posseeixen TatB.

Estudis recents han determinat que les pre-proteïnes que s'han de secretar per la via Tat s'uneixen primer al complex format per TatB i TatC i després d'interaccionar es condueix el complex cap al porus de translocació que està format per múltiples còpies de TatA (De Keersmaecker et al. 2007).

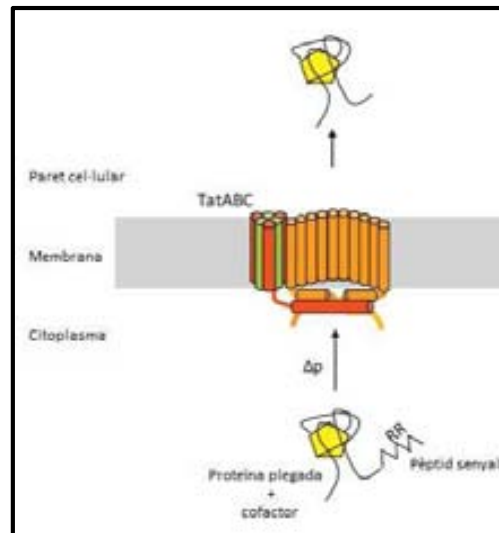


Figura 3. Esquema simplificat de la secreció de proteïnes per la via Tat en *Streptomyces*. Adaptat de Anné et al. (2012).

Aquesta via de secreció no s'utilitza gaire en la majoria de microorganismes però té una importància que cal destacar en *Streptomyces* (Taula 2): la quantitat de proteïnes sensibles a ser secretades per aquesta via és molt major que en la resta de microorganismes i en *S. coelicolor* representen entre un 18-23% del total de proteïnes secretades. No obstant això, només s'ha pogut demostrar experimentalment que 27 proteïnes de les 145-189 predites són secretades per la via Tat (Widdick et al. 2006).

Taula 2. Nombre de proteïnes sensibles de ser secretades per la via Tat d'alguns microorganismes. Adaptada de Palmer & Berks (2012)

Organisme	Nombre de proteïnes sensibles de ser secretades per la via Tat	Referència bibliogràfica
<i>Escherichia coli</i>	27	(Palmer et al. 2010)
<i>Salmonella entèrica</i>	29	(Palmer et al. 2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	5-7	(Dilks et al. 2003)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	(Biswas et al. 2009)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	145-189	(Dilks et al. 2003; Widdick et al. 2006; Bendtsen et al. 2005)
<i>Streptomyces scabies</i>	126	(Joshi et al. 2010)

### 1.3. Estudis en l'optimització dels mecanismes de secreció en *Streptomyces*:

La producció de proteïnes recombinants en *S. lividans* ha incrementat considerablement els darrers anys i en alguns casos s'han obtinguts rendiments satisfactoris de més de 500mg·L<sup>-1</sup> de proteïna en la seva conformació nativa, mentre que en altres casos només s'han obtingut nivells de proteïna molt baixos (Anné et al. 2012). Les causes d'aquestes diferències en la producció no s'han clarificat i és que el coll d'ampolla pot estar en qualsevol punt de procés de producció: en la transcripció, en la traducció, en la secreció o en el plegament.

L'optimització de la producció es pot donar en diversos punts: optimització de l'ús de codó, l'ús de promotors més forts o induïbles, l'ús de plasmidis d'alt nombre de còpies estables, etc. Una altra manera de fer-ho és intentar maximitzar la secreció de la proteïna d'interès o disminuir la secreció de la resta de proteïnes per tal d'obtenir un sobrenedant amb la proteïna d'interès

## 1. Introducció

més pura. Per aconseguir-ho s'hauria d'obtenir un mutant deficient d'algun dels components de la maquinària de secreció que impliqués una capacitat secretora altament perjudicada però que aquest fenotip no comprometés la seva viabilitat cel·lular. La proteïna mutada o delecionada hauria de realitzar una funció que fos present en les dues vies de secreció (via Sec i via Tat). Aquesta proteïna serà la peptidasa senyal SipY.

Tal com s'ha dit anteriorment, les peptidases senyal s'encarreguen d'eliminar el pèptid senyal de les pre-proteïnes abans de ser secretades al medi extracel·lular. La identificació de les peptidases senyal en *S. lividans* (Parro et al. 1999) es va dur a terme abans de conèixer la seva seqüència i la de *S. coelicolor*. És per això que per identificar-les es van dissenyar oligonucleòtids a partir de seqüències altament conservades de gens *sip* (van Dijn et al. 1992). En els estudis duts a terme per Parro et al. (1999) es va determinar que *S. lividans* tenia quatre peptidases senyal en el seu genoma: SipW, SipX, SipY i SipZ. Els tres gens d'aquestes peptidases senyal estan en un mateix operó ja que entre *sipW* i *sipX* hi ha 8 parells de bases de distància i entre *sipX* i *sipY* hi ha 9 parells de bases. El quart gen *sipZ* està en un altre operó ja que la seva transcripció sembla que està regulada independentment i es troba a 104 parells de bases de distància.

Per tal de determinar la importància de cada una de les peptidases senyal en la funció de secreció de proteïnes en *S. lividans*, el grup del CNB va obtenir els 4 mutants deficients per cada un dels gens *sip* obtenint les soques *S. lividans*  $\Delta sipW$ , *S. lividans*  $\Delta sipX$ , *S. lividans*  $\Delta sipY$  i *S. lividans*  $\Delta sipZ$  (Figura 4). La mutació es va aconseguir per la inserció dirigida del gen *tsr* que dona resistència a l'antibiòtic thiostrepton (Palacín et al. 2002). Les noves soques se seleccionaven amb la presència d'aquest antibiòtic al medi de cultiu. L'anàlisi d'aquestes soques va determinar que cap de les mutacions comprometia el creixement del microorganisme, és a dir, que cap dels quatre gens resulten essencials per a la viabilitat del microorganisme. No obstant això, la soca *S. lividans*  $\Delta sipY$  presentava canvis morfològics respecte a la soca salvatge i a la resta de les soques deficients de les altres peptidases senyal. A la Figura 5A es pot veure com aquesta soca no presenta un fenotip de esporulació. La formació de miceli aeri i esporulació es pot observar amb la típica coloració grisosa dels cultius en medi sòlid. La soca *S. lividans*  $\Delta sipY$  presenta una coloració grogosa. La morfologia d'aquest miceli observada en el microscopi de contrast de fase també era diferent (Figura 5B).

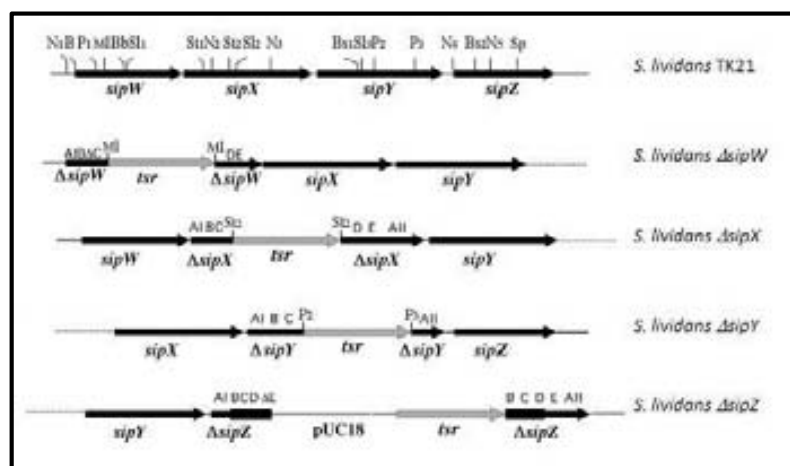
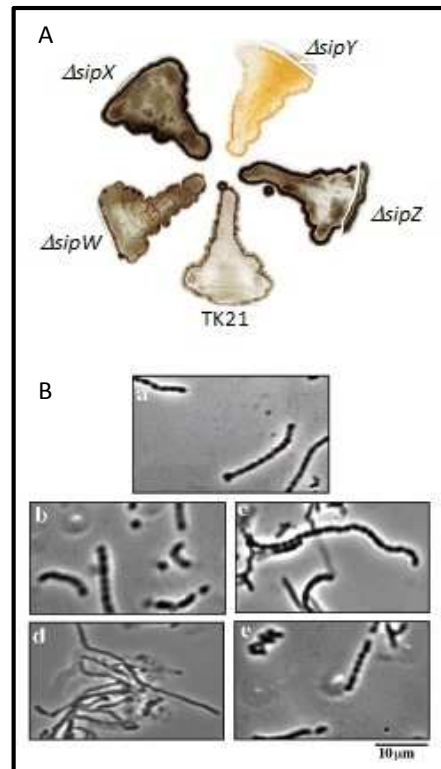
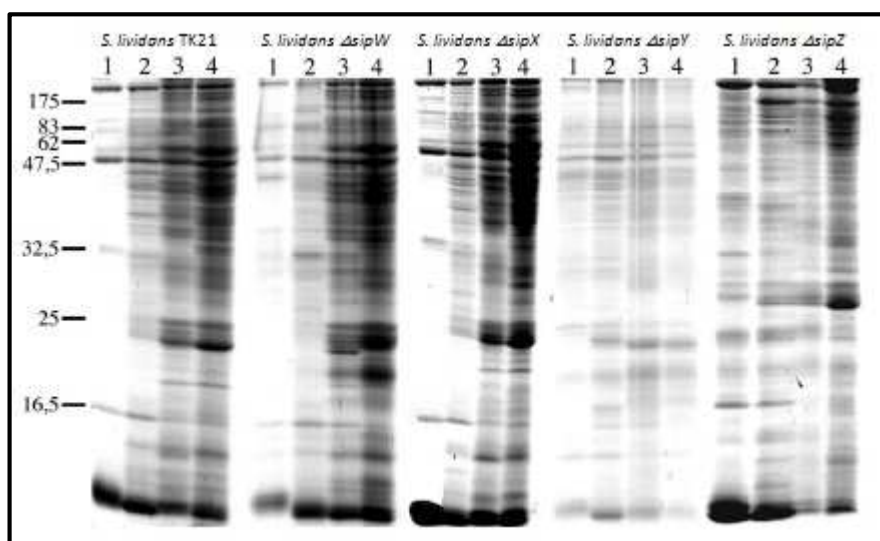


Figura 4. Esquema dels mutants de *S. lividans* TK21 deficients en els gens *sip*. Adaptada de Palacín et al. (2002).



**Figura 5. Morfologia dels mutants deficientes en sip.** A: Pigmentació del miceli de les soques tal com estan indicades en la figura. B: Morfologia del miceli aeri observada al microscopi de contrast de fases de: *S. lividans* TK21 (a), *S. lividans*  $\Delta sipW$  (b), *S. lividans*  $\Delta sipX$  (c), *S. lividans*  $\Delta sipY$  (d) i *S. lividans*  $\Delta sipZ$  (e). Adaptada de Palacín et al. (2002).

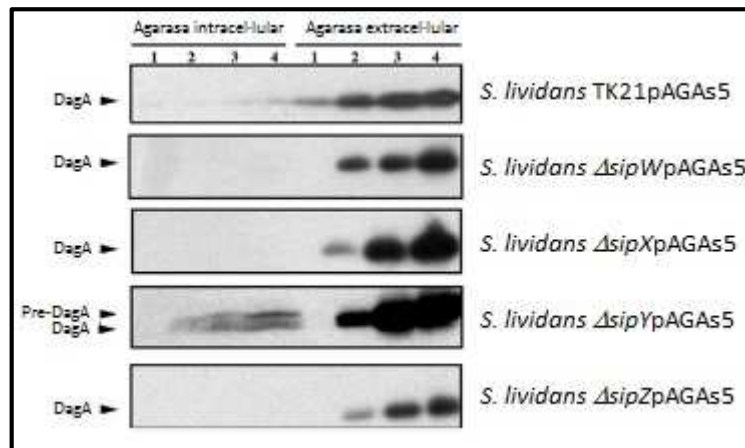
L'estudi de la secreció de proteïnes va determinar que el mutant *S. lividans*  $\Delta sipY$  era el que presentava la capacitat de secreció més afectada. A la Figura 6 es pot veure com l'acumulació de proteïnes extracel·lulars en aquest mutant deficient de la proteïna SipY es veu afectada severament. Per altra banda, l'activitat de proteases analitzada a l'exterior cel·lular dels mutants era inferior comparada amb la de la soca salvatge. En la soca deficient en SipY, l'activitat de les proteases extracel·lulars disminuïa fins a límits indetectables (Palacín et al. 2002).



**Figura 6. Proteïnes totals analitzades per SDS-PAGE.** A la soca salvatge *S. lividans* TK21 i amb els mutants *S. lividans*  $\Delta sipW$ , *S. lividans*  $\Delta sipX$ , *S. lividans*  $\Delta sipY$  i *S. lividans*  $\Delta sipZ$  a diferents temps de cultiu: 12h (carrils 1), 22h (carrils 2), 36h (carrils 3) i 45h (carrils 4). Adaptada de Palacín et al. (2002).

## 1. Introducció

L'estudi de la sobreproducció de proteïnes en les quatre soques deficientes en algun dels gens *sip* va ser dut a terme propagant el plasmidi pAGAs5 que contenia el gen agarasa (*dagA*) de *S. coelicolor* A3(2). La Figura 7 mostra els resultats de l'anàlisi de Western blot realitzat amb anticossos específics contra l'agarasa. Es va observar que només en la soca deficient en SipY s'observa agarasa intracel·lular i es va confirmar que: la peptidasa senyal SipY exercia una funció majoritària en la funció de peptidasa senyal però que la presència de les altres tres peptidases senyal podien compensar la seva absència i permetre la secreció de la proteïna agarasa (Palacín et al. 2002).



**Figura 7. Patró de secreció d'agarasa en els mutants deficientes de *sip*.** Es mostra la detecció associada a la cèl·lula i la detecció d'agarasa extracel·lular en la soca salvatge i en els quatre mutants en diferents temps: 12h (carrils 1), 22h (carrils 2), 36h (carrils 3) i 45h (carrils 4). Adaptada de Palacín et al. (2002).

Aquest estudi preliminar en cultius en Erlenmeyer postulava la soca *S. lividans*  $\Delta sipY$  com a possible hoste per a la producció de proteïnes recombinants. La possibilitat de produir i secretar proteïnes clonades en plasmidis multicòpia en aquesta soca malgrat tenir la capacitat de secreció severament afectada sumat al fet que no es detecta activitat de proteases extracel·lular li confereix un important potencial per a la producció de proteïnes recombinants.

### 1.4. Producció de proteïnes recombinants en *Streptomyces*

La producció de proteïnes recombinants en *Streptomyces*, com ja s'ha dit anteriorment, té com a avantatge principal que el producte és extracel·lular i això facilita considerablement, en la majoria dels casos, el procés de purificació.

Diverses espècies de *Streptomyces* produeixen enzims valuosos en termes econòmics. Per exemple, l'enzim glucosa isomerasa produït per *S. olivaceus*, *S. olivochromogenes*, *S. rubiginosus* i *S. murinus* s'utilitza per a la producció de xarop d'alt contingut en fructosa (Heady 1978) o bé l'enzim transglutaminasa de *S. mobaraensis* que s'aplica per millorar els productes de carn i peix precuinats o per la millora de la textura de la pasta (Motoki & Seguro 1998). També en el camp de la producció d'energia biosostenible, els estreptomicets són capaços de produir xilanas que poden lisar la hemicel·lulosa i aquesta funció pot ser utilitzada per a la degradació de materials lignocel·lulòsics per a l'obtenció de bioetanol entre d'altres aplicacions

(Subramaniyan & Prema 2002). Així doncs, molts enzims produïts per *Streptomyces* són econòmicament valuosos i tenen aplicacions en camps de la medicina, de la indústria alimentària, tèxtil, de la pell i també per processos analítics.

L'espècie model de *Streptomyces* per a l'estudi de la morfologia i de la genètica ha estat sempre *S. coelicolor* (Keiser et al. 2000). No obstant, per a la clonació i producció de proteïnes recombinants se sol utilitzar *S. lividans* perquè té un sistema de restricció insensible al DNA metilat i és una espècie amb poca activitat proteasa endògena (Nakashima et al. 2005). Aquestes dues característiques postulen a *S. lividans* com a un organisme hoste atractiu per a la producció de proteïnes recombinants (Gilbert et al. 1995). La seqüenciació del genoma de *S. lividans* 1326 (Cruz-Morales et al. 2013) i l'esborrany de *S. lividans* TK24 donaran més oportunitats de seguir entenent i investigant els mecanismes de secreció, l'estrès per secreció i les causes del col·lapse metabòlic per tal de millorar i optimitzar la producció de les soques d'aquesta espècie. A la Taula 3 es poden veure alguns exemples de produccions de proteïnes recombinants en aquesta espècie.

Les causes de les diferències de producció de diferents proteïnes en la mateixa soca no són clares i és difícil concretar-les. Probablement els problemes vénen del procés global i no hi ha un sol punt limitant. Així doncs, el coll d'ampolla pot trobar-se a nivell de transcripció, a nivell de traducció i secreció i en últim terme a nivell final de plegament. Per això, tant si la producció és satisfactòria com si no ho és, es pot intentar millorar des de molts punts: optimització de l'ús de codó, escaneig de promotors i de vectors, variació de la ruta de secreció (Sec o Tat), escaneig i modificació de pèptids senyal, sobreexpressió o deleció de peptidases senyal, entre d'altres (Anné et al. 2012).

## 1. Introducció

Taula 3. Exemples recents de la producció de proteïnes en *Streptomyces lividans*. Adaptada de Anné et al. (2012).

S. <i>lividans</i>	Pèptid senyal [vector]	Proteïna [origen]	Mida (kDa)	Rendiment	Referència bibliogràfica
TK24	<i>vsI</i> [pCBS2mTNFa+2]	mTNF- $\alpha$ [ratolí]	36kDa	200-300mg·L <sup>-1</sup>	(Pozidis et al. 2001)
TK24	<i>gpp</i> [pSGLgpp]	IL-4R [humà]	24kDa	10mg·L <sup>-1</sup>	(Zhang et al. 2004)
1326	Pèptid senyal sintètic [pIJ699]	$\alpha$ Integrina CD11b A [rata]	21kDa	8mg·L <sup>-1</sup>	(Ayadi et al. 2007)
TK24	<i>melC1</i> [pMGA]	Glucagó [humà]	3.5kDa	24mg·L <sup>-1</sup>	(Qi et al. 2008)
TK24	<i>cagA</i> [pIMB4]	IL-6 [humà]	≈20kDa	0.61mg·L <sup>-1</sup>	(Zhu et al. 2011)
IAF10-164	<i>celA</i> [pIJF811-A.8]	Proteïna antigènica [ <i>M. tuberculosis</i> ]	19kDa 38kDa	200mg·L <sup>-1</sup> 80mg·L <sup>-1</sup>	(Tremblay et al. 2002)
1326	Natiu [pIJ6021]	Oxidasa L-aminoàcid [ <i>Rhodococcus opacus</i> ]	54.2kDa	0.18U·mL <sup>-1</sup>	(Geueke & Hummel 2003)
JI66	<i>xys1</i> [pIJ702]	Xilanasa [ <i>A. nidulans</i> ]	22kDa	19U·mL <sup>-1</sup>	(Díaz et al. 2004)
1326	Natiu [pIJ486]	Glicoproteïna [ <i>M. tuberculosis</i> ]	45/47kDa	5mg·L <sup>-1</sup>	(Lara et al. 2004)
1326	Pèptid senyal de <i>Stv. cinnamoneum</i> [pUC702]	Fosfolipasa D [ <i>Stv. cinnamoneum</i> ]	56kDa	118mg·L <sup>-1</sup>	(Ogino et al. 2004)
1326	Pèptid senyal de <i>Stv. cinnamoneum</i> [pUC702]	Fosfolipasa D [ <i>Stv. cinnamoneum</i> ]	56kDa	118mg·L <sup>-1</sup>	(Ogino et al. 2004)
JT46	Natiu [pAE053]	Transgluotaminasa [ <i>S. plantensis</i> ]	38kDa	2.2U·mL <sup>-1</sup>	(Lin et al. 2006)
TK24	<i>vsI</i> [pIJ486]	Xiloglucanasa [ <i>Jonesia spp.</i> ]	100kDa	100-150mg·L <sup>-1</sup>	(Sianidis et al. 2006)
TK24	<i>dag</i> [pRAGA1]	Proteïna APA [ <i>M. tuberculosis</i> ]	45/47kDa	80mg·L <sup>-1</sup>	(Vallin et al. 2006)
TK24	<i>vsI</i> [pOW15]	Estreptoquinasa [ <i>Streptococcus equisimilis</i> ]	47kDa	15mg·L <sup>-1</sup>	(Pimienta et al. 2007)
JI66	<i>phoA</i> [pIJ702]	Fosfatasa alcalina [ <i>Thermus thermophilus</i> ]	54.7kDa	266.9U·mL <sup>-1</sup>	(Díaz et al. 2008)
JT46	Natiu [pAE053]	Transglutaminasa [ <i>Stv. platensis</i> ]	38kDa	2.54-5.36U·mL <sup>-1</sup>	(Lin et al. 2008)
<i>misk</i> * *	Natiu [pIAFD95A]	Lipasa termostable [aïllat metagenòmic]	32.6kDa	11.3mg·L <sup>-1</sup>	(Meilleur et al. 2009)
1326	Pèptid de PLD de <i>Stv. cinnamoneum</i> [pUC702]	$\beta$ -1,4-endoglucanasa; $\beta$ -glucosidasa [ <i>Thermobifida fusca</i> YX]	53kDa, 43kDa	114mg·L <sup>-1</sup> , 230mg·L <sup>-1</sup>	(Noda et al. 2010)
1326	Pèptid de PLD de <i>Stv. cinnamoneum</i> [pUC702]	Transglutaminasa [ <i>Stv. cinnamoneum</i> ]	38kDa	64.3mg·L <sup>-1</sup>	(Noda et al. 2010)
1326	Natiu [pZRJ362- <i>cel6A</i> ]	Endogluocanasa Cel6A [ <i>Thermobifida fusca</i> ]		173mg·L <sup>-1</sup>	(Li et al. 2013)



### 1.5. Millora de la producció de proteïnes recombinants

A continuació es presenten alguns dels punts on es podria millorar la producció i secreció de proteïnes recombinants en *Streptomyces* en termes de modificacions genètiques.

#### 1.5.1. Ús de codó

L'ús de codó difereix considerablement entre organismes i aquest és el principal motiu pel qual molts gens humans són difícilment expressats en bacteris. Una de les principals estratègies és optimitzar l'ús de codó substituint els codons existents per aquells que són més adequats pel microorganisme amb el qual s'està treballant (Gustafsson et al. 2004). O bé expressar heteròlogament en l'hoste els gens de tRNA que li són més estranys.

En el cas de *S. lividans*, l'alt contingut en guanina i citosina ( $\approx 73\%$  GC) serà una avantatge o un inconvenient per a la producció de proteïnes recombinants depenent de l'origen del gen d'interès. No obstant, s'ha vist que seqüències amb baix contingut en GC són expressades satisfactòriament en estreptomicets (Anné et al. 2012).

En aquest treball, s'expressaran dos enzims que provenen del mateix gènere *Streptomyces* i, per tant, no serà necessari l'optimització de l'ús de codó.

#### 1.5.2. Estudi de promotors i vectors

El ventall de vectors disponible per a *Streptomyces* és extens (Keiser et al. 2000) i en la majoria de casos el mètode de selecció dels microorganismes amb plasmidi és la presència d'algun gen de resistència a antibiòtic en el plasmidi. Això implica haver d'addicionar l'antibiòtic corresponent al medi cosa que encareix el procés i resulta poc recomanable a nivell industrial. Recentment s'han desenvolupat mètodes de selecció per a *S. lividans* de toxina-antoxina (Sevillano et al. 2012) que aconsegueixen mantenir l'alt nombre de còpies del plasmidi sense necessitat d'addicionar antibiòtic al medi.

El promotor també és important ja que de la seva fortalesa dependrà l'expressió de la proteïna d'interès i també el comportament de la soca ja que aquesta expressió pot acabar condicionant al creixement del microorganisme. Existeixen promotors forts constitutius com per exemple el promotor del gen *vsi* (inhibidor de la subtilisina) de *S. venezuelae* (Lammertyn et al. 1997), el promotor del gen de metaloendopeptidasa de *S. cinnamoneus* (Hatanaka et al. 2008) o bé el promotor del gen *ermE* (gen de resistència a eritromicina) de *S. erythraeus* (Bibb et al. 1985). Aquest últim és un dels que s'ha utilitzat en aquest treball.

També existeixen alguns promotors induïbles com el promotor del gen *nitA* (nitrilasa) de *Rhodococcus rhodochrous* (Herai et al. 2004) o el promotor induïble per thioestrepton (*tipA*) de *S. lividans* (Murakami et al. 1989).

En aquest treball s'expressarà l'agarasa amb el seu propi promotor i la lacasa amb tres promotors: el seu propi promotor, el promotor de l'agarasa i el promotor del gen de resistència a eritromicina.

### 1.5.3. Via de secreció seleccionada: via Sec o via Tat

En la majoria dels casos de producció de proteïnes recombinants en *S. lividans* s'utilitza la via Sec per a la secreció de les proteïnes. Es va fer la comparació de producció d'una mateixa proteïna en la qual la secreció sigui per la via Sec o la via Tat i es va veure que en determinats casos la producció era més baixa quan la secreció anava per la via Tat (Schaerlaekens et al. 2004). No obstant, la via Tat ha de ser utilitzada en determinats casos per a una correcta secreció i plegament.

En aquest treball, les proteïnes expressades seran secretades per la via Tat ja que en ambdós casos es conserven els pèptids senyal nadius i aquests condueixen a l'agarasa i a la lacasa a la secreció per la via Tat majoritàriament.

### 1.5.4. Pèptid senyal

En la producció de proteïnes recombinants provinents d'altres organismes, l'elecció del pèptid senyal és determinant per a aconseguir una bona eficiència de secreció d'aquesta proteïna d'interès. Tot i que s'han fet varis estudis per tal d'estudiar l'efecte que provoquen certes mutacions al pèptid senyal en la secreció (Lammertyn & Anné 1998), saber relacionar la idoneïtat de pèptids senyal amb cada proteïna o el seu intercanvi (Morosoli et al. 1997), no s'ha pogut determinar amb exactitud l'efecte de canvis aminoacídics en la producció final de la proteïna. Calen més estudis per tal de poder-ho acabar de definir.

### 1.5.5. Peptidases senyal tipus I

Com ja s'ha explicat anteriorment, les peptidases senyal tipus I juguen un paper molt important en la secreció ja que són les encarregades de eliminar el pèptid senyal i aquesta és una funció que es creu que és clau en l'eficient secreció de proteïnes recombinants. S'ha estudiat l'especificitat de substrat de les peptidases senyal dels bacteris grampositius (van Roosmalen et al. 2004) però no s'ha pogut comprovar cap tipus de preferència per a cada una de les peptidases senyal. En *S. lividans* tampoc s'ha vist especificitat. Ara bé, quan la sobreproducció d'una proteïna es realitzava en els mutants de cada una de les peptidases senyal sí que s'observaven diferències (explicat anteriorment). Tampoc es va detectar que les peptidases senyal actuessin tenint preferència a la via de secreció Sec o Tat.

Una alternativa per a millorar la secreció pot ser sobreexpressar les peptidases senyal. Això ja ha donat bons resultats en *E. coli* (Maarten van Dijl et al. 1991) o en *Bacillus* (Malten et al. 2005) entre d'altres.

Per altra banda, el mutant d'una de les peptidases senyal SipY en *S. lividans* va esdevenir una soca potencialment molt interessant per a la sobreproducció de proteïnes recombinants (Palacín et al. 2002) per la capacitat secretora mostrada en els estudis de producció d'agarasa. La soca *S. lividans*  $\Delta sipY$  serà la soca amb la qual es treballarà en aquest tesi doctoral.

### 1.5.6. Altres estratègies

Es poden seguir nombroses estratègies com ara modular l'expressió de la proteïna SecA per a incrementar la secreció de les proteïnes que van per la via Sec o bé tot el sistema secYEG (Mulder et al. 2013). O també sobreexpressar les components del translocó Tat per incrementar les proteïnes que van per aquesta via.

### 1.6. Proteïnes produïdes en aquest treball

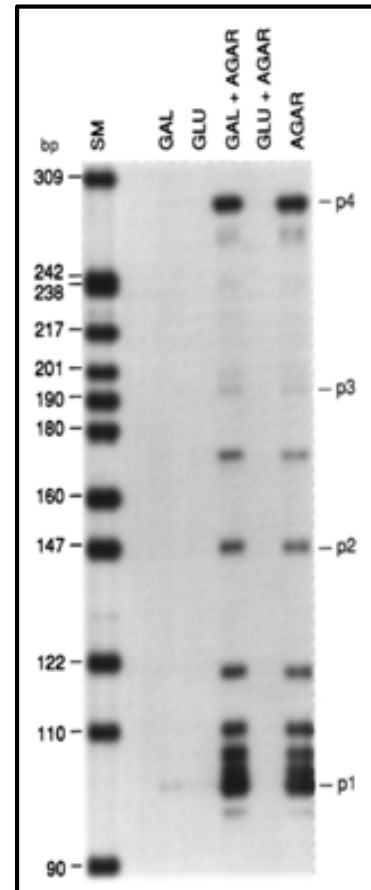
En aquest treball es produiran dues proteïnes: l'agarasa i la lacasa. Ambdues proteïnes tenen un pèptid senyal que condueix a la proteïna a secretar-se per la via Tat.

#### 1.6.1. L'enzim agarasa i el seu interès en la indústria

*Streptomyces coelicolor* A3(2) és un dels pocs microorganismes bacterians capaç d'utilitzar l'agar com a font de carboni (Stanier 1942). L'agar és un polisacàrid altament heterogeni format pels monòmers D-galactosa i anhidre-L-galactosa units per enllaços  $\beta 1 \rightarrow 4$  i  $\alpha 1 \rightarrow 3$  alternativament. L'agarasa (EC 3.2.1.81) és el primer enzim a actuar en la cadena metabòlica per a la degradació i utilització de l'agar com a font de carboni. La majoria d'agarases descrites en la bibliografia hidrolitzen l'enllaç  $(1-3)\beta$ -galactopiranosid i  $(1-4)$ -3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galactòsid que constitueix el polímer de l'agarosa i el resultat de la hidròlisi dóna lloc a oligosacàrids de neoagarobiosa. Aquests oligosacàrids seran degradats a la membrana cel·lular o seran transportats cap a dins la cèl·lula per ser degradats intracel·lularment. I finalment els productes de la última degradació són modificats per poder ser metabolitzats pels enzims del metabolisme de la galactosa (Hodgson & Charter 1981).

La regió de DNA del cromosoma de *S. coelicolor* que codifica pel gen complet de l'agarasa és de 1.77kb (Buttner et al. 1987). La seqüència primària predita del gen dóna lloc a un producte de 309 aminoàcids i una massa molecular de 35.1kDa. La comparació d'aquesta predicció amb la seqüència de la proteïna madura revela que la seqüència primària conté 30 aminoàcids corresponents al pèptid senyal. Aquest pèptid senyal conduirà la proteïna a la via de secreció (Widdick et al. 2008). L'anàlisi de la transcripció també determina que la regió reguladora conté 4 promotors. Les quatre regions promotores són reconegudes per, almenys, tres holoenzims de RNA polimerases que contenen diferents factors  $\sigma$  (Buttner et al. 1988). Sembla que la producció d'agarasa està induïda per la presència dels oligosacàrids produïts de la hidròlisi parcial de l'agarosa i, en canvi, la presència de glucosa en el medi implica una forta repressió de l'expressió del gen (Hodgson 1982; Bibb et al. 1987; Servín-González et al. 1994).

A la Figura 8 es pot veure un exemple d'anàlisi de l'existència dels quatre promotors per a l'expressió del gen *dagA* quan era expressat en *S. coelicolor* i de la repressió que pateix aquest gen en presència de glucosa i d'altres fonts de carboni (Servín-González et al. 1994). Es pot observar que en presència de glucosa i galactosa no hi ha expressió del gen, en canvi, la presència d'agar parcialment hidrolitzat induïx l'expressió de *dagA*. Es va descriure una



**Figura 8. Anàlisi dels promotors amb la tècnica de protecció de la nucleasa S1.** Nivells de transcrits de RNA del gen *dagA* en la fase final del cultiu en presència de galactosa (GAL), glucosa (GLU) o agar parcialment hidrolitzat (AGAR) i les combinacions entre ells. Els promotors es numeren en p1, p2, p3 i p4 (Servín-González et al. 1994).

possible cinquena regió promotora d'aquest gen (Parro & Mellado 1993) que en la Figura 8 es pot observar amb la banda que es troba entre p2 i p3. La resta de bandes properes a p1 es creu que són al degradació de transcrits més llargs.

La producció d'aquest gen ha estat principalment estudiada en el gènere *S. lividans* que no posseeix el gen *dagA* en el seu genoma i per tant és fenotípicament DagA<sup>-</sup> (Kendall & Cullum 1984; Parro & Mellado 1993; Parro et al. 1997). Alguns dels estudis que s'han realitzat en *S. lividans* són, per exemple, l'avaluació de l'efecte de la font de carboni sobre la producció d'agarasa (Parro & Mellado 1994), les mesures d'optimització de la producció d'agarasa en bioreactor (Parro et al. 1997) i l'estudi de la limitació de fosfats en cultius en bioreactor (Parro et al. 1998). El coneixement adquirit en aquests treballs s'utilitzarà per plantejar l'estudi realitzat en aquesta tesi doctoral.

Respecte a l'estudi de la font de carboni, està descrit que la producció d'agarasa està subjecte a repressió per catabòlit (Hodgson & Charter 1981; Servín-González et al. 1994). No obstant això, quan el gen és clonat en alt nombre de còpies, la glucosa no inhibeix la transcripció però sí que té un efecte negatiu en la producció d'agarasa en *S. lividans* i *S. coelicolor* a nivell post-transcripcional. Probablement, el problema es troba en la secreció i en la degradació de la proteïna per part de proteases intracel·lulars. Per altra banda, la utilització de mannitol com a font de carboni millora considerablement la producció d'agarasa en *S. lividans*. Els nivells d'activitat detectats són molt més grans tant intracel·lular com extracel·lulars, però, per contra, la quantitat de proteases extracel·lulars és també molt major (Parro & Mellado 1994). Així doncs, quedava clar en aquest estudi que el mannitol donava una producció final molt més elevada.

Posteriorment, es va intentar millorar la producció d'agarasa mitjançant el control d'un promotor actiu en la fase exponencial del creixement, el promotor del bacteriòfag  $\phi$ 29A3. La comparació de la producció del creixement de la soca amb el promotor propi del gen agarasa i la soca amb el gen agarasa sota el control del promotor del bacteriòfag  $\phi$ 29A3 es va fer en mannitol i el resultat va aclarir que el control sobre el propi promotor de *dagA* donava millors resultats (Parro et al. 1997). De nou, cal destacar el paper del mannitol com a font de carboni escollida per a la producció.

Finalment es va estudiar com afectava la limitació de fosfat en la producció d'agarasa quan es treballava amb glucosa com a font de carboni. Anteriorment s'havia vist que la concentració de fosfat tenia un gran efecte sobre l'expressió d'alguns gens d'altres bacteris grampositius com *Bacillus subtilis* (Antelmann et al. 2000). La disminució de la quantitat de fosfat en el medi va comportar un augment considerable de la producció d'agarasa en *S. lividans* a nivell transcripcional i traduccional. A nivell de proteïna es va confirmar per l'anàlisi d'activitat agarasa i per anàlisi de Western blot. Aquest augment de la síntesi d'agarasa pot ser explicat per l'activació/repressió específica de la transcripció o de la via de resposta a l'estrès (Parro et al. 1998).

En aquest treball l'agarasa s'utilitzarà com a proteïna model que va per la via de secreció Tat per tal d'estudiar la seva producció en bioreactor. El plasmidi pAGAs5 construït i utilitzat en els estudis explicats (Parro et al. 1997; Parro et al. 1998) serà introduït en la soca *S. lividans*  $\Delta$ sipY que podria tenir diversos avantatges anteriorment anomenats per a la sobreproducció. L'estudi realitzat per a demostrar aquesta hipòtesi conformarà la primera part d'aquest treball.

### 1.6.2. La lacasa i el seu interès en la indústria

L'enzim lacasa (EC 1.10.3.2, p-difenol:dioxigen oxidoreductases) són enzims que pertanyet a un gran grup anomenats enzims multi-coure. Van ser descrites per primera vegada l'any 1883 (Yoshida 1883) i anys més tard es va descriure que eren oxidases que contenen àtoms metàl·lics (Bertrand 1896). Són enzims àmpliament distribuïts a la natura, s'han descrit en bacteris (Diamantidis et al. 2000), fongs (Thurston 1994), insectes (Kramer et al. 2001) i plantes (Benfield et al. 1964; Mayer & Harel 1979).

Les lacases són molècules estructurades en dímers o tetràmers. Cada monòmer conté, normalment, quatre àtoms de coure units distribuïts en tres llocs redox (Solomon et al. 1996). Són molècules que poden degradar un rang molt ampli de compostos: orto i paradifenols, aminofenols, polifenols, poliamines, lignines i també alguns compostos inorgànics. Aquesta poca especificitat de substrat fa que tingui un ampli potencial biotecnològic en aplicacions molt variades (Rodríguez Couto & Toca Herrera 2006).

En la indústria alimentària poden participar en processos d'intensificació o modificació del color de begudes i menjars. Participen també en l'eliminació de compostos fenòlics no desitjables en suc de fruita, cervesa i vi que provoquen l'enfosquiment o terbolesa d'aquestes begudes (Minussi et al. 2002). També són interessants en la indústria del pa ja que pot fer enllaços creuats de biopolímers i incrementar la resistència de la massa (Selinheimo et al. 2006).

En la indústria del paper es requereix la separació i degradació de la lignina en la polpa de la fusta. Els procediments convencionals són altament contaminants i s'està treballant per desenvolupar-ne d'alternatius. Tot i que s'ha estudiat àmpliament el desenvolupament d'estratègies basades en sistemes biològics (Widsten & Kandelbauer 2008), aquests encara no presenten la capacitat blanquejant i de deslignificació que tenen els processos químics.

En la indústria tèxtil es consumeix un gran volum de tints, cosa que comporta la utilització de grans volums d'aigua i de químics per al processament de teixits. Els compostos químics utilitzats són molt diversos en la seva composició química: van des de petites molècules inorgàniques fins a polímers i substàncies orgàniques. La seva complexa composició fa que siguin difícils d'eliminar dels efluents i això resulta altament contaminant pel medi ambient i perillós per a la humanitat ja que hi ha compostos que s'utilitzen per a la tinció de teixits que són carcinògens com ara la benzidina i altres compostos aromàtics. La utilització de lacases per a la degradació d'aquests compostos (Blánquez et al. 2004) està resultant cada vegada més atractiva per a les indústries que han de complir legislacions cada vegada més estrictes imposades pels governs en matèria mediambiental.

En la nanobiotecnologia també està desenvolupant un paper important. Les lacases són capaces de catalitzar reaccions amb transferència d'electrons sense necessitat de cofactors i per això estan sent estudiades per a crear biosensors per a detectar compostos fenòlics, oxigen o azides. També biosensors per a detectar morfina i codeïna (Bauer et al. 1999), catecholamines (Ferry & Leech 2005), flavonoides de les plantes (Jarosz-Wilkolazka et al. 2004) i també per a assajos electroimmunològics (Kuznetsov et al. 2001).

La baixa especificitat pel substrat que presenten les lacases, assistides per mediadors, també fa que tinguin un important paper en la bioremediació. Per exemple els hidrocarburs

aromàtics policíclics (PAHs) provinents dels jaciments naturals d'olis o els provinents de la utilització de combustibles fòssils, poden ser degradats per lacases (Pointing 2001).

Les lacases també poden jugar un paper important en la indústria química de síntesi de nous compostos d'interès. En la producció de polímers complexos que puguin ser candidats a productes per a la salut humana (Kunamneni et al. 2008).

Finalment en la indústria de la cosmètica on per exemple els tints de cabell en els quals s'utilitzen lacases són menys irritants i més fàcils de manipular ja que les lacases substitueixen el peròxid d'hidrogen com a agent oxidant (Jeon et al. 2010). També comença a estar present en preparacions dermatològiques (Golz-Berner et al. 2004).

L'objectiu més a curt termini de la indústria és poder obtenir una gran quantitat d'aquest biocatalitzador a un preu baix i, si cal, modificar-lo genèticament perquè sigui més robust i més actiu. Així doncs, es proposa la lacasa de *S. lividans* com a un possible candidat a ser sobreproduït per tal de satisfer les necessitats de la indústria.

L'enzim lacasa de *S. lividans* va ser caracteritzat l'any 2004 (Machczynski et al. 2004) i si fins llavors les lacases que s'havien descrit tenien tres o més dominis, amb la caracterització d'aquesta lacasa es va descriure una nova família de lacases que només posseïen dos dominis. S'anomenarà enzim SLAC de l'anglès "Small LACcase". En aquesta caracterització, la lacasa de *S. lividans* va presentar una altra resistència als detergents, una alta estabilitat tèrmica i era activa com a dímer en gels i en solució. En aquest estudi es va determinar que el pH òptim de l'enzim era 8-9 i que les anàlisis d'activitat era millor fer-los amb DMP (2,6-dimetilfenol) perquè és el compost més estable a pH bàsics. Cal destacar el fet que sigui un enzim amb alta activitat alcalina ja que normalment els enzim lacasa d'origen fúngic tenen pH òptim àcid. Aquest fet cobrarà importància a l'hora de poder trobar-li aplicacions en la indústria ja que normalment el pH d'aquests és bàsic i en el camp de la biocatàlisi quan s'hagi d'utilitzar en reaccions acoblades amb altres enzims alcalins.

Cal destacar alguns dels treballs que ja han sigut publicats sobre les aplicacions que podria tenir aquest enzim. Per exemple la utilització de SLAC de *S. coelicolor* per a la decoloració de tints en els efluent de la indústria tèxtil (Dubé et al. 2008). I també s'han realitzat estudis de la degradació in vivo i in vitro de la lignina per part de la lacasa de diverses espècies de *Streptomyces* (Majumdar et al. 2014).

## 2. Objectius

Els objectius principals que es pretén assolir en aquest treball de tesi doctoral són:

- Disseny d'un procés de producció de proteïnes en la soca *Streptomyces lividans*  $\Delta sipY$  utilitzant l'agarasa com a proteïna model.
  - Estudi comparatiu entre les soca salvatge i la soca mutada en la producció en discontinu d'agarasa expressada en un plasmidi multicòpia.
  - Estudi del comportament de la soca SipY<sup>-</sup> en les diferents etapes d'un cultiu en discontinu.
  - Avaluació de l'efecte de limitació d'un component del medi de cultiu (fòsfor) sobre la producció.
  - Estudi de diferents estratègies d'operació en continu i discontinu alimentat.
  
- Clonació i expressió del gen lacasa en *S. lividans*  $\Delta sipY$ .
  - Generació de tres soques productores de la pròpia lacasa de *S. lividans* sota el control de tres promotors diferents: el promotor propi de la lacasa, el promotor del gen de resistència a eritromicina i el promotor del gen agarasa en plasmidis multicòpia.
  - Selecció de les soques productores.
  - Avaluació de l'efecte de la font de carboni en processos en discontinu i discontinu alimentat amb la soca productora de lacasa sota el control del promotor del gen agarasa.





### 3. Materials i mètodes

#### 3.1. Microorganismes

Els microorganismes emprats en aquest treball són presentats en les següents taules:

##### 3.1.1. *Escherichia coli*

Les soques d'*E. coli* van ser utilitzades per tal de crear els constructes necessaris per després poder introduir aquest constructes a la soca de *Streptomyces sp.* corresponent.

Taula 4. Soques d'*Escherichia coli* utilitzades en aquest treball

Soca	Genotip	Procedència
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG, $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), $\lambda$ -endA1, gyrA96(nal <sup>R</sup> ), thi-1, recA1, relA1,	(Hanahan 1983)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	lac, glnV44, F' [::Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15], hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue pFD666	XL1-Blue amb pFD666	CNB-CSIC (Madrid)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue (pFD-lac)	XL1-Blue amb pFD-lac	Present treball
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ (pFD-DagAp-lac)	DH5 $\alpha$ amb pFD-DagAp-lac	Present treball
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ pIJ86	DH5 $\alpha$ amb pIJ86	John Innes Centre (Norwich)
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ (pIJ86-lac)	DH5 $\alpha$ amb pIJ86-lac	Present treball

Les soques eren emmagatzemades en un stock en Cryo-billes a -80°C i el creixement es duia a terme a una temperatura de 37°C i en agitació orbital de 150rpm.

##### 3.1.2. *Streptomyces*

Les soques de *Streptomyces* necessàries per a la realització d'aquest treball són llistades en la següent taula.

Taula 5. Soques de *Streptomyces lividans* utilitzades en aquest treball.

Soca	Genotip	Procedència
<i>Streptomyces lividans</i> TK21	SLP2-, SLP3-	(Hopwood et al. 1983)
<i>Streptomyces lividans</i> TK21pIJ487	<i>S. lividans</i> amb pIJ487	(Palacín et al. 2002)
<i>Streptomyces lividans</i> TK21pAGAs1	<i>S. lividans</i> amb pAGAs1	(Parro et al. 1998)
<i>Streptomyces lividans</i> TK21pAGAs5	<i>S. lividans</i> amb pAGAs5	(Palacín et al. 2002)
<i>Streptomyces lividans</i> $\Delta$ sipY	SLP2-, SLP3-, sipY::tsr	(Palacín et al. 2002)
<i>Streptomyces lividans</i> $\Delta$ sipYpIJ487	$\Delta$ sipY amb pIJ487	(Palacín et al. 2002)

### 3. Materials i mètodes

<i>Streptomyces lividans</i> $\Delta sipY$ pAGAs5	$\Delta sipY$ amb pAGAs5	(Palacín et al. 2002)
<i>Streptomyces lividans</i> $\Delta sipY$ pFD	$\Delta sipY$ amb pFD666	Present treball
<i>Streptomyces lividans</i> $\Delta sipY$ pFD-lac	$\Delta sipY$ amb pFD-lac	Present treball
<i>Streptomyces lividans</i> $\Delta sipY$ pIJ86-lac	$\Delta sipY$ amb pIJ86-lac	Present treball
<i>Streptomyces lividans</i> $\Delta sipY$ pFD-DagAp-lac	$\Delta sipY$ amb pFD-DagAp-lac	Present treball

Les soques eren emmagatzemades per duplicat en cultius sòlids en placa a 4°C i en cultius líquids de miceli a -80°C en una solució 50% v/v de glicerol. El creixement de *Streptomyces* es duia a terme a una temperatura de 30°C i en agitació orbital de 150rpm.

#### 3.2. Medis de cultiu i conservació

Els mètodes de cultiu i conservació per *E. coli* són els descrits per Sambrook et al. (1989) i per *Streptomyces* els descrits per Keiser et al. (2000).

##### 3.2.1. Medis de cultiu per *E. Coli*

**Medi LB** (Sambrook et al. 1989) en g·L<sup>-1</sup>: triptona (10), extracte de llevat (5), NaCl (10). Aquest medi s'utilitza en forma líquida o sòlida afegint agar al 1.8% (w/v). Els antibiòtics utilitzats per seleccionar *E. coli* van ser kanamicina (50µg·mL<sup>-1</sup> concentració final) i apramicina (50µg·mL<sup>-1</sup> concentració final) en les mateixes concentracions en medi líquid i medi sòlid.

##### 3.2.2. Medis de cultiu per *Streptomyces* (Keiser et al. 2000)

**Medi R5 (R2YE)** en g·L<sup>-1</sup>: sacarosa (103), K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (10.12), glucosa (10), casaminoàcids (0.1), extracte de llevat (5), TES (5.73), elements traça (2mL), pH 7.2. Després d'autoclavar se suplementa amb 10mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.5% w/v), 8mL CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (5M), 15mL L-Prolina (20% w/v) i 7mL NaOH (1M). La solució d'elements traça conté en mg·L<sup>-1</sup>: ZnCl<sub>2</sub> (40), FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (200), CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (10), MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (10), Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O (10) i (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O (10). Aquest medi s'utilitza en forma líquida o sòlida afegint agar al 2.2% (w/v)

**Medi manitol-farina de soja (MS)** en g·L<sup>-1</sup>: agar (20), manitol (20), farina de soja (20). En la formulació d'aquest medi no s'utilitza aigua destil·lada sinó que s'utilitza aigua corrent. Aquest medi només pot utilitzar-se en forma sòlida i per la soca salvatge.

**Medi de nutrients suau (SNA)** en g·L<sup>-1</sup>: Nutrient Broth (8), agar (5). Aquest medi és semi-sòlid i s'utilitza suplementat amb l'antibiòtic de selecció per cobrir les plaques després de la transformació de *Streptomyces*.

**Medi YEME** en g·L<sup>-1</sup>: extracte de llevat (3), peptona (5), extracte de malta (3), glucosa (10), sacarosa (340g). Després d'autoclavar se suplementa amb MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (5mM concentració final) i amb glicina (0.5% w/v concentració final).

**Medi NMMP** en g·L<sup>-1</sup>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2.61), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.8), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2), casaminoàcids (5), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.6), manitol o glucosa (10) i 1.25mL·L<sup>-1</sup> solució d'elements minoritaris. Aquesta

solució d'elements minoritaris concentrada està formada per:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1) i  $\text{CaCl}_2$  anhidrid (1).

En els creixements per a la producció de lacasa aquest medi també va ser suplementat amb els aminoàcids triptòfan i glicina a una concentració final de 5mM i amb  $\text{CuSO}_4$  a una concentració de 5 $\mu\text{M}$ .

### 3.2.3. Solucions de biologia molecular per *Streptomyces*

**Tampó P** en  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ : sacarosa (103),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0.25),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2.02), elements traça (2mL) enrasats a 800mL d'aigua destil·lada. Posteriorment a l'autoclau, s'addicionaran 10mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.5% w/v), 100mL  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (3.68% w/v) i 100mL TES buffer (5.73% w/v, pH 7.2).

## 3.3. Obtenció de soques recombinants

### 3.3.1. Vectors plasmídics

Els vectors utilitzats en aquest treball es presenten en la següent taula:

**Taula 6.** Enumeració, descripció i origen dels vectors utilitzats en aquest treball.

Vector	Característiques	Referència
pIJ487	Plasmidi de <i>Streptomyces</i> d'alt número de còpies. Conté el gen de <i>tsr</i> i <i>neo</i> (sense promotor)	(Ward et al. 1986)
pAGAs5	Plasmidi derivat de pIJ487 que conté un fragment de 5kb que inclou el gen <i>dagA</i> amb el seu propi promotor.	(Palacín et al. 2002)
pFD666	Còsmid bifuncional <i>E. coli</i> – <i>Streptomyces</i> d'alt número de còpies. Conté el gen de resistència a <i>neo</i> , pJV1 <i>ori</i>	(Denis & Brzezinski 1992)
pFD-lac	Plasmidi derivat de pFD666 amb el gen SLI6712 amb el seu propi promotor	Present treball
pFD-DagAp-lac	Plasmidi derivat de pFD666 amb la regió promotora del gen <i>dagA</i> i el gen SLI6712 sense la seva regió promotora	Present treball
pIJ86	Còsmid bifuncional <i>E. coli</i> – <i>Streptomyces</i> d'alt número de còpies. Conté el gen de resistència <i>aac(3)IV</i> , pUC18 <i>ori</i>	Dr. Mervyn Bibb, JIC
pIJ86-lac	Plasmidi derivat de pIJ86 amb el gen SLI6712 sense la seva regió promotora	Present treball

#### 3.3.2. Manipulació d'àcids nucleics

##### 3.3.2.1. Aïllament de DNA plasmídic d'*E. coli*

L'obtenció de DNA plasmídic d'*E. coli* es va dur a terme utilitzant el kit comercial de minipreps de Promega: PureYield™ Plasmid Miniprep System i seguint les indicacions especificades per la casa comercial.

##### 3.3.2.2. Aïllament de DNA plasmídic de *Streptomyces*

L'aïllament del DNA plasmídic de *Streptomyces* es va dur a terme mitjançant el mètode descrit per (Keiser et al. 2000).

El miceli se centrifuga i es renta dues vegades amb un volum equivalent a la quantitat de cultiu inicialment centrifugada d'una solució de sacarosa  $100\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Es resuspen en  $400\mu\text{L}$  d'una solució que conté  $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  lisozim (Sigma),  $100\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  sacarosa,  $25\text{mM}$  EDTA i  $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  RNasa i  $25\text{mM}$  Tris-HCl (pH 8) i s'incuba a  $37^\circ\text{C}$  durant 30 minuts. Posteriorment s'afegeixen  $250\mu\text{L}$  d'una solució de  $0.3\text{M}$  NaOH i 2% de SDS i s'incuba a  $70^\circ\text{C}$  durant 15 minuts. Passats aquests minuts es realitzen dues extraccions consecutives amb fenol/cloroform/isoamílic en les proporcions 25:24:1. Seguidament es precipita l'ADN amb un volum de isopropanol i 0.1 volum de AcNa 3M a pH 4.8 durant tota la nit a  $-20^\circ\text{C}$ . L'endemà se centrifuga la mostra i el precipitat es dissol en  $150\mu\text{L}$  d'aigua i  $150\mu\text{L}$  de AcNH<sub>4</sub> a  $4.5\text{M}$ . Es repeteix la centrifugació de la mostra i es renta amb etanol pur. Per últim es fa un rentat amb etanol al 80% (v/v) i es dissol el DNA plasmídic resultant amb aigua lliure de nucleases.

##### 3.3.2.3. Obtenció de DNA cromosòmic de *Streptomyces*

L'obtenció de DNA cromosòmic de *Streptomyces* es va dur a terme utilitzant el kit comercial "GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit" de Sigma-Aldrich, basat en la lisi cel·lular i la posterior unió del DNA en membranes de sílice.

##### 3.3.2.4. Quantificació dels àcids nucleics

La quantificació dels àcids nucleics es va realitzar mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDrop 1000 (ThermoScientific), el qual proporciona la concentració de l'àcid nucleic i els coeficients de puresa de la mostra.

#### 3.3.3. Manipulació enzimàtica del DNA

##### 3.3.3.1. Digestió enzimàtica

Les digestions enzimàtiques s'han dut a terme amb enzims del tipus FastDigest de la casa comercial ThermoFisher Scientific. Les digestions dobles es van fer per separat i incrementant els temps que indica el fabricant fins a 1-4 hores.

Les digestions enzimàtiques dutes a terme durant l'estada al laboratori del Dr. Rafael Pérez-Mellado (CNB-CSIC) van ser els recomanats per la casa comercial que subministra els enzims: New England Biolabs i seguin els procediments descrits a la bibliografia (Sambrook et al. 1989).

##### 3.3.3.2. Lligació del DNA

Per a la lligació de fragments de DNA es va utilitzar la lligasa del fag T4 subministrada per Roche. La reacció es realitzava amb una ratio de plasmidi:insert de 1:3 i de 1:4 i s'incubaven les mostres a  $16^\circ\text{C}$  durant tota la nit.

En els experiments duts a terme durant l'estada al CNB-CSIC la lligasa era també del fag T4 però de la casa comercial Invitrogen.

### 3.3.4. Amplificació del DNA per PCR

L'amplificació de DNA mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa es va realitzar amb la polimerasa Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase de la casa comercial ThermoScientific, mentre que les reaccions de PCR de comprovació es van dur a terme amb el kit de Promega GoTaq® DNA Polymerase. Les condicions d'operació eren les següents:

Taula 7. Programes utilitzats en les reaccions de PCR.

Pas	Phusion DNA polimerasa		GoTaq MasterMix		
	T (°C)	Temps	T (°C)	Temps	
Hot Start	98	30s	95	5min	} 30 cicles
Desnaturalització	95	10s	95	1min	
Hibridació	T variable	30s	T variable	45s	
Elongació	72	1min/kb	72	2	
Elongació final	72	10min	72	5	

La temperatura de hibridació es va calcular a partir de l'eina online *Tm calculator* de ThermoFisher Scientific que es basa en el mètode de (Breslauer et al. 1986) per a la polimerasa *Phusion*.

Els oligonucleòtids que serviran com a encebadors de la tècnica PCR es presenten a la taula

Taula 8. Oligonucleòtids utilitzats com a encebadors per a les reaccions de PCR. Els fragments destacats en negreta corresponen a les dianes de restricció.

Nom del primer	Seqüència nucleotídica	Enzim de restricció	T hibridació (Phusion)
LacM_Fw	GTACGT <b>GGATCC</b> ATGGACAGGCGAGGCTTTAAC	BamHI	67°C
LacM_Rv	CTTGACA <b>AAGCTT</b> TCAGTGCTCGTGTTCGTGTG	HindIII	67°C
LacR_Fw	GTT <b>GGATCC</b> TTTTCTTCTCGCGCTCAAC	BamHI	64°C
LacR_Rv	GGCA <b>AAGCTT</b> GACTGCGGCTCAGGATAGC	HindIII	65°C
DagAp_Fw	GCA <b>CTGCAG</b> GGCTTGATGAATCGTGACCGGCG	PstI	77°C
DagAp_Rv	CGC <b>GGATCC</b> CACTTGATGAGATCACGTCCGGTT	BamHI	70°C
ErmP_Fw	GGACAT <b>CTGCAG</b> TACCAGCCGACCCGAGCAC	PstI	74°C
ErmP_Rv	CTTGA <b>AGGATC</b> CTACCAACCGGCACGATTGGG	BamHI	72°C

### 3.3.5. Electroforesi d'agarosa

La separació dels fragments de ADN segons la seva mida es va dur a terme per electroforesi en gels d'agarosa. La concentració d'agarosa utilitzada era d'entre 0.7-1.0% (w/v) amb una quantitat de SyberGreen de 0.1µL/mL gel. L'electroforesi es realitzava a voltatge constant (90V) i tampó TAE (Tris-Acetate 40mM, EDTA 2mM) (Sambrook et al. 1989). La visualització dels gels es duia a terme amb un Gel Doc™ EZ Imager amb l'exposició del gel a llum UV.

#### 3.3.6. Introducció del DNA en microorganismes

##### 3.3.6.1. Preparació de cèl·lules competents d'*E.coli* i transformació

La transformació de les cèl·lules d'*E.coli* es va dur a terme per electroporació. Les cèl·lules electrocompetents de la soca *E.coli* DH5 $\alpha$  van ser preparades a partir d'un cultiu de 100mL de medi LB amb una densitat òptica a 600nm de aproximadament 0.8.

El cultiu es va aturar refredant-lo fins a 4°C durant 20 minuts. Posteriorment les cèl·lules es van sotmetre a cicles de centrifugacions de 10 minuts a 4000g a 4°C. El pèl·let es va resuspendre consecutivament en 100mL, 50mL, 10mL i 5mL de glicerol (100g·L<sup>-1</sup>) a 4°C. En l'última centrifugació el pèl·let es va resuspendre en 500 $\mu$ L de la mateixa solució de glicerol i es va dividir en alíquotes de 50 $\mu$ L i es van guardar a -80°C fins a la seva utilització.

Per a la transformació d'aquestes cèl·lules competents s'afegien 2 $\mu$ L del producte de la lligació a les alíquotes de 50 $\mu$ L i es col·locaven a un cubeta d'electroporació (BioRad) evitant la formació de bombolles. El xoc elèctric es va donar amb l'electroporador Gene Pulser<sup>R</sup> II (BioRad) amb les següents condicions:

$$V = 2.5kV$$

$$C = 25\mu F$$

$$R = 200\Omega$$

Immediatament després del xoc es va afegir 1mL de medi LB refredat a 4°C i es va col·locar durant 1 hora a 37°C. Passada aquesta hora, se sembren 50-100 $\mu$ L del resultat en plaques de LB-agar amb l'antibiòtic de selecció. Es deixen créixer a 37°C durant 16-20 hores.

##### 3.3.6.2. Obtenció de protoplasts de *Streptomyces* i transformació

L'obtenció de protoplasts de la soca *S. lividans*  $\Delta sipY$  es va dur a terme tal com està descrit en Keiser et al. (2000). Es va partir d'un cultiu de 25mL de medi YEME suplementat i amb antibiòtic thiostrepton i es va incubar durant 36h a 30°C i 150rpm d'agitació orbital. A les 36h se centrifuga el cultiu durant 10 minuts a 4500g i es realitzen dos rentats amb 15mL d'una solució de sacarosa concentrada (103g·L<sup>-1</sup>). Es resuspèn en 4mL de buffer P suplementada amb lisozim per aconseguir una concentració final d'aquest enzim de 1mg·mL<sup>-1</sup>. Es deixa durant 30-60 minuts a 30°C i 150rpm. Passat aquest interval de temps es filtra utilitzant un filtre P (xeringa esterilitzada amb cotó a l'extrem) i se centrifuga durant 10 minuts a 4500g, a 4°C. Fer un nou rentat amb 2.5mL de buffer P i finalment resuspendre el pèl·let en 1.5-2mL del mateix buffer P. Repartir en alíquotes de 200 $\mu$ L i guardar-les a -80°C fins a la seva utilització.

La transformació es dona mesclant una alíquota de protoplasts amb 100-150ng de DNA i 500 $\mu$ L de solució PEG al 25% (w/v). La mescla es deixa reposar 1-3 minuts i se sembla en plaques de medi ric R5 amb thiostrepton (antibiòtic que selecciona la soca  $\Delta sipY$ ). Es deixa 16-20 hores a l'estufa a 30°C i passat aquest temps es recobreixen amb 2.5mL de medi semisòlid SNA suplementat amb l'antibiòtic corresponent per a la selecció del producte de lligació transformat.

### 3.4. *Cultius de Streptomyces*

#### 3.4.1. *Cultius en Erlenmeyer*

##### 3.4.1.1. *Pre-inòcul*

El pre-inòcul de les soques de *Streptomyces* es va fer créixer a partir de miceli congelat en una solució de glicerol 50% (w/v) en tubs Falcon amb 3 o 5mL de medi R5 i els antibiòtics corresponents (thiostrepton, kanamicina, apramicina). Els cultius es van incubar durant 36-48h a una temperatura de 30°C i una agitació orbital de 150 rpm.

##### 3.4.1.2. *Inòcul*

L'inòcul per als creixements en Erlenmeyer es duia a terme en Erlenmeyers de 500mL de capacitat en els quals s'afegien 50mL del medi corresponent als creixements posteriors en Erlenmeyer (R5, YEME o NMMP) suplementat amb els antibiòtics corresponents i 2.5mL del pre-inòcul. Es van inocular durant 24-30h a 30°C i a 150rpm d'agitació orbital.

##### 3.4.1.3. *Cultius en Erlenmeyer*

Els creixements en Erlenmeyer es duien a terme en recipients de 1L de capacitat i 200mL de volum de medi. El volum de inòcul introduït en els cultius era el necessari per tal de fixar una quantitat de biomassa equivalent a  $0.1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de pes humit. Aquesta quantitat es centrifugava i els resuspensia en el mínim volum per tal de no interferir en la concentració final dels components del medi. Normalment era de 2-5mL.

El creixement era també a 30°C i 150rpm d'agitació. Es treien mostres periòdicament durant 60-80 hores.

#### 3.4.2. *Cultius en bioreactor*

##### 3.4.2.1. *Pre-inòcul*

El pre-inòcul es duia a terme igual que en el cas dels cultius en Erlenmeyer.

##### 3.4.2.2. *Inòcul*

L'inòcul per als creixements en bioreactor es va dur a terme en Erlenmeyers de 500mL de capacitat en els quals s'afegien 50mL del medi NMMP suplementat amb els antibiòtics corresponents i 2.5mL del pre-inòcul.

Com s'ha especificat anteriorment, en el cas dels creixements de les soques productores de lacasa, el medi de cultiu va ser suplementat també amb triptòfan i glicina a una concentració final de 5mM i amb  $\text{CuSO}_4$  a una concentració final de  $5\mu\text{M}$

##### 3.4.2.3. *Bioreactor en discontinu*

Els cultius en bioreactor operant en discontinu en medi NMMP es van dur a terme en un bioreactor d'Applikon® Biotechnology (ez-Control) en un recipient de 3-L de capacitat total. Les condicions d'operació van ser controlades i monitoritzades als punts consigna: 30°C; pH  $7.0\pm 0.05$  amb addició de NaOH (2M) i HCl (2M);  $\text{pO}_2$  al 50% de saturació controlat per l'agitació entre 200-800rpm i utilitzant una aeració de 1.5vvm amb aire enriquit amb  $\text{O}_2$  quan va ser necessari.

El volum utilitzat en aquest cultiu va ser de 1.5L. Els creixements van ser de 60h aproximadament entre les quals es prenia mostra periòdicament per al seu anàlisi posterior.

#### 3.4.2.4. *Bioreactor en discontinu alimentat*

Els cultius en discontinu alimentat es van dur a terme en el mateix bioreactor emprant un recipient de 7L amb un volum inicial de 3.5L. En els moments indicats a Resultats, s'introdueix un pols del substrat indicat (font de carboni o casaminoàcids) tot restablint la concentració inicial d'aquest. Les condicions d'operació són les mateixes descrites a l'anterior apartat.

#### 3.4.2.5. *Bioreactor en continu*

Els cultius en continu es realitzaven amb el recipient de 3L amb un volum inicial de 1L de medi. El medi NMMP va ser utilitzat per al batch inicial abans de començar a operar en continu. Quan el mannitol afegit inicialment es va consumir totalment, es va començar a afegir el medi iniciant el procés en continu. Per tal de fer-ho possible es va utilitzar una bomba peristàtica de precisió (IPC High Precision Multichannel Dispenser, ISMATEC) a una velocitat de dilució de  $0.08\text{h}^{-1}$ . Després d'arribar a les condicions d'estat estacionari (mínim de 5 temps de residència) el medi d'alimentació es va canviar cap a les condicions següents. Es van establir tres condicions diferents en les quals es variava la quantitat de fosfat present en el medi d'alimentació.

Les condicions de control i monitorització van ser les mateixes que les descrites anteriorment.

### 3.5. Anàlisi de les mostres

#### 3.5.1. *Concentració de biomassa*

La concentració de biomassa va ser determinada mitjançant mesures de pes sec prenent mostres de 3mL per triplicat en cada temps. Les mostres eren extretes del flascons o del bioreactor i centrifugades durant 15 minuts a 5000rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrífuga Centrifuge 5804R (Eppendorf). La biomassa centrifugada es re-suspèn en 3mL d'aigua destil·lada i es filtra a través de filtres Whatman GF/F pre-assecats i pre-pesats. Els filtres es renten amb dos volums d'aigua destil·lada i es tornen a assecar a l'estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  durant 24h i es deixen al dessecador entre 8-12h fins a pes constant. La diferència entre les pesades inicial i final serveix per avaluar la concentració de biomassa.

El sobrenedant dels cultius es filtra a  $0.45\mu\text{m}$  (Millex<sup>®</sup>GS, Millipore) i es guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$  per a posteriors anàlisis.

#### 3.5.2. *Concentració de mannitol i de glucosa*

La concentració de mannitol i glucosa es van analitzar per cromatografia líquida d'alta resolució HPLC (Ultimate 3000), amb una columna ICE-COREGEL 87-H3 de bescanvi iònic a  $25^{\circ}\text{C}$  i un detector d'índex de refracció, utilitzant una fase mòbil d'àcid sulfúric 6mM en aigua MiliQ amb un cabal de  $0.5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . S'injecten a la columna  $10\mu\text{L}$  de mostra, prèviament filtrada a  $0.45\mu\text{m}$ .

El mannitol té un temps de retenció de 12.07 minuts en aquesta columna i en aquestes condicions mentre que la glucosa té un temps de retenció de 10.45 minuts.



### 3.5.3. Precipitació de proteïnes

#### 3.5.3.1. Precipitació amb sulfat amònic (“salting-out”)

El sobrenedant de la mostra del cultiu és separat de la part sòlida del cultiu per centrifugació durant 10 minuts a 5000rpm (Centrifuge 5810R, Eppendorf). La proteïna dels sobrenedants es concentra per precipitació afegint sulfat amònic  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  per arribar a una saturació del 75%. Es deixa durant almenys 1h en agitació a 4°C per a què precipiti el màxim de proteïna. Per a recuperar-la se centrifuga durant 40 minuts a 4°C i 10000rpm. Es descarta el sobrenedant i es renta el precipitat amb 1mL o més de solució de sulfat amònic al 50% i es torna a centrifugar en les mateixes condicions. Finalment, el precipitat es dissol en un volum determinat d'una solució d'imidazol-HCl (50mM, pH 6.5). Les mostres es mantenen a -20°C fins al moment de la seva anàlisi.

#### 3.5.3.2. Precipitació amb TCA

El procés de precipitació amb TCA és semblant al descrit en l'anterior apartat però en lloc d'addicionar sulfat amònic, s'afegeix TCA (100%) fins a una concentració final del 20%.

Posteriorment es realitzen 3 rentats amb un volum d'acetona equivalent al volum total de precipitació centrifugant durant 40 minuts a 4°C i 10000rpm. Finalment es dissol el precipitat amb una solució de Tris-HCl (50mM, pH 8.0). Aquest precipitat es conserva també a -20°C fins al moment de la seva anàlisi.

### 3.5.4. Concentració de proteïna

La mesura de la concentració proteïna total extracel·lular es realitza utilitzant el reactiu Coomassie (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) (Bradford 1976) en microplaques utilitzant el lector MultiSkán™FC microplate reader (Fisher Scientific™). El volum de reactiu és de 200µL i s'afegeixen 7µL de mostra en cada pou de la microplaca. La proteïna BSA (albúmina de sèrum boví) es va utilitzar per a fer els estàndards.

### 3.5.5. Electroforesi de proteïnes i Western Blot

#### 3.5.5.1. SDS-PAGE

La separació de les proteïnes en funció del seu massa molecular es va dur a terme mitjançant l'electroforesi en gels de poliacrilamida desnaturalitzants NuPAGE® 12% Bis-Tris utilitzant com a running buffer el MES-SDS. La preparació de les mostres i les condicions d'operació que es van seguir són les descrites pel fabricant (Invitrogen, US) i la quantificació de les bandes es va dur a terme amb el programa Image Lab™ 4.0 (Bio-Rad).

#### 3.5.5.2. Western Blot

Per a les anàlisis per Western Blot realitzades per a la detecció de l'agarasa es van realitzar electroforesi en gels de poliacrilamida desnaturalitzants preparats in situ. El percentatge d'acrilamida del gel separador era del 12% mentre que el gel d'empaquetament era del 4%. A les mostres se li afegia el tampó de càrrega 4X (Tris-HCl 0.25M pH 6.8, SDS 8%w/v, blau de bromofenol 0.05%w/v, glicerol 40%v/v i DTT 0.05M). El running buffer contenia Tris-HCl 0.025M, glicina 0.192M i SDS 0.001%.

Posteriorment les proteïnes eren transferides a una membrada de PVDF, Immobilon-P Transfer Membranes (Millipore) utilitzant el sistema Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell de BioRad. Es transfereix a un voltatge constant de 15V durant 75 minuts. La

membrana transferida es bloquejava durant almenys 45 minuts en una solució de bloqueig que contenia també PBS ( $\text{NaCl } 8\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{KCl } 0.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O } 1.78\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.27\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) i un 5% de llet descremada en pols. A continuació la membrana s'incubava durant 16 hores amb solució de bloqueig suplementada amb anticossos monoclonals de conill (cortesia de V Parro) contra la proteïna agarasa de *S. colelicolor* a 4°C. Passat aquest temps, es realitzaven tres rentats consecutius de 15 minuts amb la solució de rentat (Tween 0.5%v/v i 1%w/v de llet descremada en pols dissolt en PBS). L'objectiu d'aquests rentats era eliminar les restes d'anticòs primari no unit. Posteriorment s'incubava la membrana amb l'anticòs secundari (HRP-conjugated protein A, Invitrogen Laboratories) diluït 1:10000 en solució de bloqueig. A continuació es tornen a realitzar 3 rentats seguint la mateixa metodologia que anteriorment i finalment es procedia al revelat. Els pèptids que reaccionen amb els anticossos eren detectats utilitzant el sistema ECL enhanced chemiluminescence System (Amersham) després d'un minut d'incubació i vàries exposicions a pel·lícules de rajos X d'entre 5 segons i 2 minuts.

#### 3.5.6. Assaigs d'activitat

##### 3.5.6.1. Assaig d'activitat agarasa

- Assaig d'activitat inicial:

L'activitat agarasa és mesurada directament del brou de cultiu o bé amb els precipitats per sulfat amònic. La biomassa és eliminada per centrifugació (Centrifuge 5810R, Eppendorf) i filtració a 0.45µm com s'ha explicat a l'apartat 5.1. Per quantificar l'activitat agarasa es detecta la concentració de sucres reductors alliberats per l'acció de l'enzim sobre el substrat agarosa (Dygert et al. 1965). El volum d'assaig és de 1mL: 900µL d'agarosa (0.1% w/v concentració final dissolta en una solució de imidazol-HCl (500mM, pH 6.5)), 100µL de mostra i aigua miliQ fins a 1mL. Una unitat enzimàtica és definida com la quantitat d'enzim necessària per a produir un augment de 0.001 unitats d'absorbància a 450nm per minut a 37°C (Parro & Mellado 1994). El temps d'incubació és de 15 minuts i la detecció de sucres és lineal entre 0.1-0.6 unitats d'absorbància.

- Assaig d'activitat modificat:

L'activitat agarasa és mesurada directament del brou cultiu. L'assaig enzimàtic es basa en el mateix principi i les bases de la detecció són les mateixes, però les condicions van ser modificades per l'estudi descrit a l'apartat 4.5.1. de Resultats I.

El volum d'assaig és de 1mL: 850µL d'agarosa (0.1% w/v concentració final), 100µL de tampó imidazol-HCl (500mM, pH 6.5), 10-50µL de mostra i aigua miliQ fins a 1mL. Una unitat enzimàtica és definida com la quantitat d'enzim necessària per a produir un augment de 0.001 unitats d'absorbància a 450nm per minut a 37°C (Parro & Mellado 1994). El temps d'incubació és de 5 minuts i l'assaig és igualment lineal entre 0.1-0.6 unitats d'absorbància. Per a cada assaig es realitza un blanc en el qual se substitueix l'addició de substrat per 850µL per aigua miliQ.

##### 3.5.6.2. Assaig d'activitat lacasa

La activitat lacasa va ser mesurada utilitzant la reacció de degradació del compost 2,6-dimetoxifenol (DMP) i mesurant l'increment d'absorbància a 468nm en un espectrofotòmetre UV-VIS Cari (Varian). La biomassa, igual que en el cas de l'assaig agarasa, era eliminada per centrifugació i filtració a 0.45µm tal com s'especifica a l'apartat 5.1. La quantificació de la degradació del compost DMP se seguia en una cubeta de quars en un volum d'assaig total de

1mL: 750µL de Tris-HCl 100mM pH 8.0, 200µL de mostra i 50µL de DMP 40mM. Una unitat enzimàtica és definida com quantitat d'enzim necessari per degradar un micromol de DMP per litre i per minut.

#### 3.5.6.3. Assaig d'activitat proteasa

L'activitat proteolítica en els cultius va ser mesurada utilitzant el kit QuantiCleave protease assay kit (Pierce). Aquest assaig està fonamentat en l'ús de caseïna succinilada conjuntament amb l'àcid trinitrobenzenosulfònic (TNBSA) (Bubnis & Ofner, III 1992; Hatakeyama et al. 1992). Les proteases de la mostra hidrolitzaran els enllaços peptídics de la caseïna succinilada de manera que les seves amines primàries quedaran exposades amb les quals el TNBSA reaccionarà generant un color groc-taronja. El canvi de color serà quantificat mitjançant un lector de microplaques a 450nm. L'assaig es du a terme a 25°C durant 20 minuts a pH 8.5 (tampó borat, 50mM). Els resultats de l'activitat proteolítica seran presentats com increment d'absorbància.

#### 3.5.7. Anàlisi de la composició elemental

L'anàlisi del contingut de C, H, N, P i Mg en la soca salvatge de *S. lividans* va ser analitzat pel Servei d'Anàlisi Química de la UAB.

Els gasos produïts del tractament de les mostres amb oxigen a altes temperatures s'analitzen amb un espectrofotòmetre Flash EA 2000 CHNS (ThermoFisher Scientific). Aquest anàlisi dona el contingut en C, H, N. I el contingut de P i Mg va ser determinat per espectrometria ICP-OES.



## 4. Resultats I: Estudis preliminars de producció de proteïnes amb *Streptomyces*

La producció de proteïnes recombinants en diferents sistemes d'expressió, tant procariotes com eucariotes, ha crescut molt des de l'any 1982 quan va sortir al mercat el primer producte biofarmacèutic recombinant, la insulina. A partir d'aquest moment, s'han destinat gran nombre de recursos econòmics i humans per al desenvolupament de nous productes biofarmacèutics (Walsh 2010). Tal com s'ha explicat a la introducció, la implementació de sistemes d'expressió variats per a la producció de proteïnes recombinants ha tingut també gran importància. Tots els sistemes d'expressió tenen els seus avantatges i els seus inconvenients (Ferrer-Miralles et al. 2009) però establir unes bones condicions de producció en cada un d'ells és crucial per tal de poder disposar d'un ampli rang d'alternatives i poder escollir el millor sistema segons les necessitats de producció i purificació, així com el destí final del producte en el mercat.

Aquest treball se centra en el sistema d'expressió del bacteri grampositiu *Streptomyces lividans*, bacteri que té una enorme capacitat secretora de proteïnes recombinants (Gilbert et al. 1995). L'estudi de les rutes de secreció i dels gens que estan implicats en cada una d'elles va suposar un avanç molt important per tal de poder avaluar alternatives de possibles soques deficientes d'algun gen que donessin lloc a una millora en el procés global.

L'objectiu d'aquest primer capítol va ser familiaritzar-se amb el protocols de treball del microorganisme així com realitzar un estudi preliminar amb les soques que s'utilitzaran al llarg d'aquest treball. Cal esmentar el paper que van jugar els membres del grup del Dr. Rafael Pérez Mellado (CNB-CSIC, Madrid) que van col·laborar en tot moment per intentar ajudar a guiar els primers passos d'aquesta tesi doctoral.

### 4.1. Obtenció de les soques sobreproductores d'agarasa de *Streptomyces lividans*

El gen de l'agarasa (*dagA*) de *S. coelicolor* va ser clonat en un plasmidi multicòpia en *S. lividans* TK21 (Parro & Mellado 1993), un microorganisme que no produeix de forma natural aquest enzim.

Les soques amb les quals s'ha treballat en aquesta primera part de la tesi doctoral van ser cedides pel grup del Dr. Rafael Pérez Mellado. Aquestes soques es troben especificades a l'apartat 1.2 de Materials i Mètodes i són: *S. lividans* TK21pIJ487, *S. lividans* TK21pAGAs5 (Palacín et al. 2002), *S. lividans*  $\Delta sipY$ pIJ487 i *S. lividans*  $\Delta sipY$ pAGAs5 (Palacín et al. 2002). El plasmidi pAGAs5 és un vector derivat de pAGAs1 (Parro & Mellado 1993) en el qual el gen *tsr* (que confereix resistència a thioestrepton) va ser inactivat mitjançant un canvi en el marc de lectura per tal que fos possible propagar aquest constructe en la soca  $\Delta sipY$  la qual, com està especificat a Materials i Mètodes, és resistent a thioestrepton.

En aquest capítol es du a terme una comparació entre el creixement d'una soca no productora i el creixement d'una soca que produeix la proteïna agarasa quan les vies de secreció d'ambdues soques es troben intactes. A la vegada es farà mateixa comparació entre la soca no productora i la soca productora de la mateixa agarasa quan en el genoma d'aquestes dues

soques es troba deletat el gen de la proteïna SipY, peptidasa senyal majoritària en la secreció de *Streptomyces lividans*.

#### 4.2. Efecte que té la sobreproducció de proteïnes en el creixement de *Streptomyces*

La primera observació que es volia veure era com afectava la sobreproducció de la proteïna en el creixement de la soca. Per això es va comparar el creixement de la soca en el medi NMMP amb mannitol com a font de carboni de les dues soques: *S. lividans* TK21pIJ487 i *S. lividans* TK21pAGAs5.

La utilització d'aquest medi i d'aquesta font de carboni en particular va venir justificada per la bibliografia. En la bibliografia s'assegurava que els cultius de *S. lividans* TK21pAGAs1 (Parro & Mellado 1994) en presència de mannitol donaven lloc a una acumulació intracel·lular del precursor de la proteïna agarasa (pre-DagA) fins que aquest precursor era translocat a l'exterior cel·lular i que el retard en la secreció venia donat pel col·lapse del sistema de translocació degut a la sobreproducció de la proteïna. La quantitat de proteïna d'interès que s'obtenia era considerable tot i que resulta complicat comparar-ho amb els resultats que s'obtidran en aquest treball ja que tal com es veurà més endavant es va modificar l'assaig d'activitat. Per altra banda, quan s'utilitzava la glucosa es detectava certa quantitat de pre-DagA a nivell intracel·lular però aquest no s'acumulava com en el cas del mannitol degut probablement a un retard en la secreció i a la seva major degradació intracel·lular. A més a més, tot i que en presència de glucosa el gen *dagA* es transcrivía durant tot el creixement, pràcticament no es detectava agarasa a l'exterior cel·lular. Es va pensar que possiblement era degut a la ràpida degradació per part de proteases extracel·lulars, la síntesi de les quals era possiblement induïda per la presència de glucosa. No obstant, l'activitat de proteases extracel·lulars mesurada en el cultius en glucosa no era significativa, i és per això que es va creure que la utilització de glucosa podria modular negativament alguna part de la maquinària de secreció (Parro & Mellado 1994).

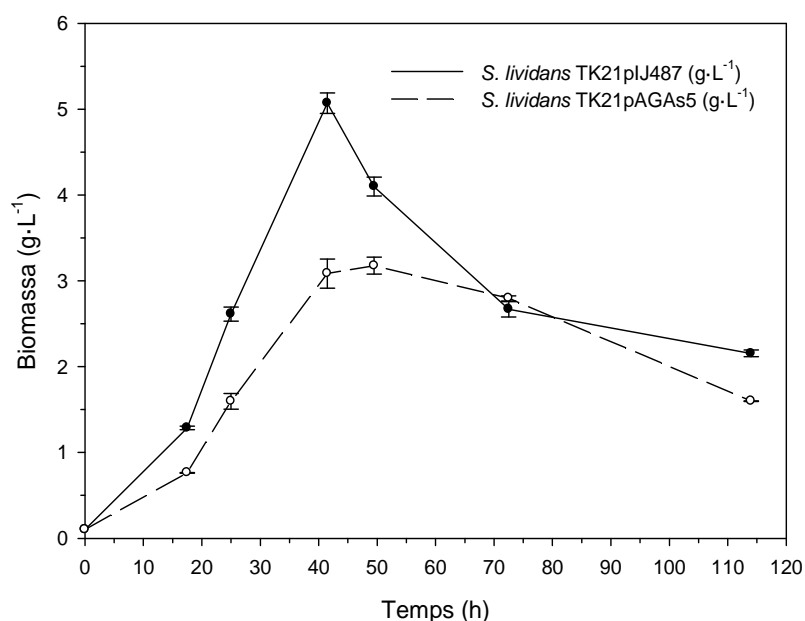


Figura 9. Corbes de creixement de les soques *S. lividans* TK21pIJ487 i *S. lividans* TK21pAGAs5.

En aquesta primera part del treball, es va voler avaluar com afectava la producció de la proteïna agarasa sobre el creixement del microorganisme. Per això es van comparar les corbes de creixement de la soca *S. lividans* TK21pIJ487 i la soca *S. lividans* TK21pAGAs5. El resultat es mostra a la Figura 9 en el qual es pot veure que la soca *S. lividans* TK21pIJ487 va créixer més ràpidament amb una velocitat específica de creixement de  $0.13\text{h}^{-1}$  mentre que la velocitat específica de creixement de la soca *S. lividans* TK21pAGAs5 és de  $0.11\text{h}^{-1}$ . A més a més, la concentració que es va assolir també va ser major en el cas de la soca no productora, la qual va assolir un valor igual a  $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a les 42h mentre que el màxim de concentració de biomassa per a la soca productora d'agarasa va ser de  $3.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a les 50h. En els dos creixements es va observar lisi cel·lular que en ambdós casos s'inicia quan hi ha alguna limitació per al cultiu que en aquest cas se sospita que es deu a limitacions d'oxigen donat que es tracta de cultius agitats orbitalment. Per aquest motiu, d'ara en endavant es realitzaran els cultius en bioreactor.

#### 4.3. Estudis inicials de medis de cultiu per a *Streptomyces lividans* TK21

##### 4.3.1. Efecte de la font de carboni i la producció de proteïna en la soca solvatge: *Streptomyces lividans* TK21pAGAs5

L'estudi del creixement, la producció i de com es consumien la font de carboni i la font de nitrogen era una de les peculiaritats inicials que s'havien d'aclarir per tal d'entendre millor en quin ordre consumia els substrats del medi per tal de poder, posteriorment, dissenyar una bona estratègia per a poder incrementar el creixement i la producció. Aquest procés es va dur a terme en un bioreactor de Applikon® Biotechnology en un recipient de 7L de capacitat total i 3.5L de volum de cultiu. Les condicions d'operació van ser controlades als següents punts consigna:  $30^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH } 7.00\pm 0.05$  amb addició de NaOH (2M) o HCl (2M);  $\text{pO}_2$  al 50% de saturació controlat per l'agitació entre 200-800rpm i utilitzant una aeració de 1.5vvm.

La composició del medi NMMP (Keiser et al. 2000) s'ha detallat prèviament en l'apartat de Materials i Mètodes però es torna a especificar a la Taula 9. El microorganisme disposa de la font de carboni escollida (mannitol o glucosa) en una concentració de  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  i de font de nitrogen orgànica (casaminoàcids)  $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Taula 9. Composició del medi NMMP (Keiser et al. 2000).

Component del medi	Concentració ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2.6
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1.8
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
Casaminoàcids	5
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.6
Mannitol o glucosa	10
Solució elements traça	$1.25\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ medi

Es van plantejar tres creixements amb la soca *S. lividans* TK21pAGAs5: el primer utilitzant medi NMMP amb mannitol com a font de carboni, el segon utilitzant medi NMMP amb glucosa com a font de carboni i el tercer utilitzant medi NMMP sense font de carboni i realitzant addicions puntuals de casaminoàcids.

El primer creixement de *S. lividans* TK21pAGAs5 en medi NMMP amb mannitol es presenta en la Figura 10. La primera cosa que va ser destacable en aquest creixement és que la font de carboni, que en aquest cas és el mannitol, no va ser consumida des d'un inici. Les primeres hores del cultiu el microorganisme creix i no va ser fins a les 24h que la quantitat de mannitol en el medi començava a disminuir. Fins a aquest moment, el microorganisme s'havia reproduït utilitzant els casaminoàcids com a font de carboni fins a assolir una concentració de biomassa igual  $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Així doncs, quan es va utilitzar el mannitol com a font de carboni pel cultiu es va donar un creixement diàuxic en el qual en les primeres hores es consumien els casaminoàcids i posteriorment s'iniciava el consum del mannitol. Aquesta hipòtesi també es va veure reforçada pels canvis de pH observats en el medi de cultiu. En les primeres 24 hores el cultiu basificava degut al consum dels casaminoàcids i s'havia d'addicionar àcid clorhídric (2M) per tal de poder mantenir el pH a  $7\pm 0.05$ . Mentre que a partir de les 24 hores i coincidint amb el moment que es començava a consumir mannitol el medi de cultiu va començar a acidificar i s'havia d'addicionar hidròxid de sodi (2M). En la fase exponencial del cultiu, la velocitat específica de creixement era de  $0.09\text{h}^{-1}$ . Però si es tenia en compte només l'interval en el qual consumia el mannitol, la velocitat específica aparent era de  $0.05\text{h}^{-1}$ . La comparació amb el creixement previ en Erlenmeyer resultava difícil de fer degut a la retenció de biomassa en les parets del bioreactor que conduïen a unes mesures de biomassa dubtoses. La biomassa final que s'assolia sí era molt més alta que en el cas del cultiu en Erlenmeyer ja que en bioreactor els paràmetres del pH, aeració, agitació es trobaven controlats i fixats en un valor consigna que afavorien el creixement.

Respecte a la quantitat de proteïna, és possible a partir de les 24h ja es comencés a secretar proteïna però no es va detectar fins a la següent mostra a les 38h. La secreció de proteïnes va ser simultani amb l'aparició de l'activitat agarasa ja que la primera mostra en la qual es detecta activitat és també a les 38h.

Cal destacar també que a les 48h el cultiu presentava una coloració fúcsia provocada per la producció de prodigiosina. Aquest antibiòtic és signe d'estrès per al microorganisme i per això es va procedir a fer una addició de casaminoàcids per tal d'intentar seguir incrementant la biomassa i la producció d'agarasa. La quantitat de biomassa va augmentar des de  $7\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  fins a  $9\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  i la producció de agarasa va incrementar lleugerament des de  $140\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$  fins a  $176\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$ .

El segon cultiu que es va realitzar va ser de la mateixa soca *S. lividans* TK21pAGAs5 en medi NMMP amb glucosa com a font de carboni. El resultat del seguiment d'aquest cultiu es presenta en la Figura 11. En aquest cultiu es pot observar que la font de carboni (glucosa) es consumeix des d'un inici sense un consum previ o simultàniament amb el consum de casaminoàcids. Això fa que des d'un inici el microorganisme formi espècies acidificants i que s'hagi d'addicionar base al medi per tal de neutralitzar-lo. La velocitat específica de creixement és més elevada que en el cas de la utilització de mannitol i en la fase exponencial és de  $0.13\text{h}^{-1}$ . La quantitat total de biomassa obtinguda en aquest cas és inferior al cas del cultiu amb mannitol i arriba fins a  $8.4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a les 50h.



#### 4. Resultats I: Estudis preliminars de producció de proteïnes amb *Streptomyces*

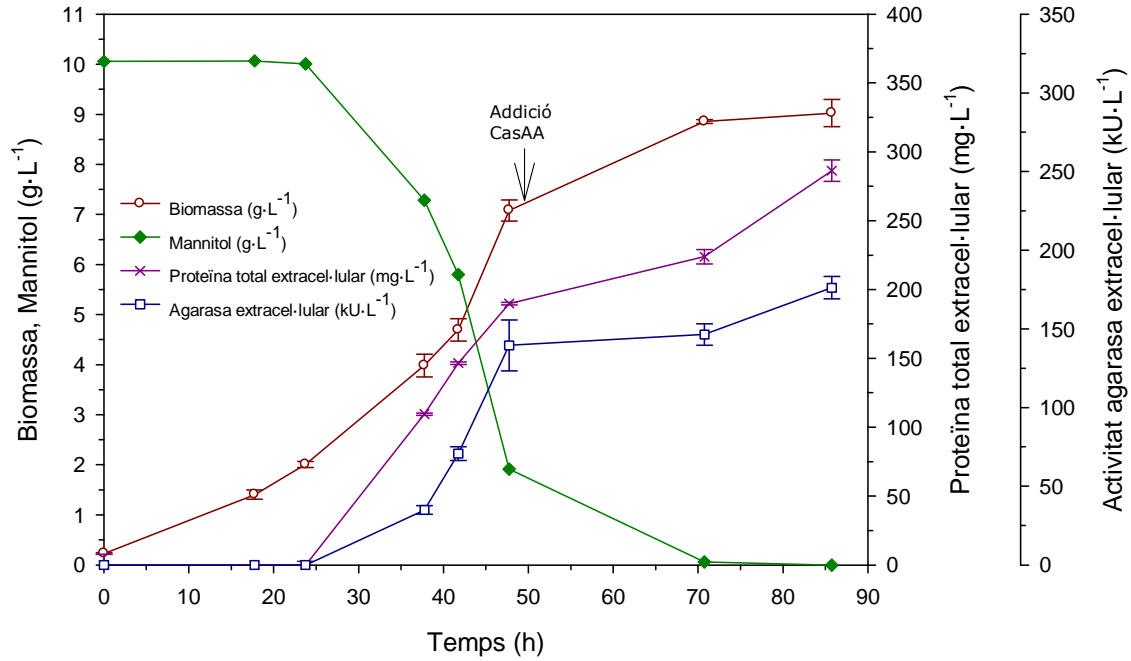


Figura 10. Creixement de la soca *S. lividans* TK21pAGAs5 en medi NMMP amb mannitol com a font de carboni.

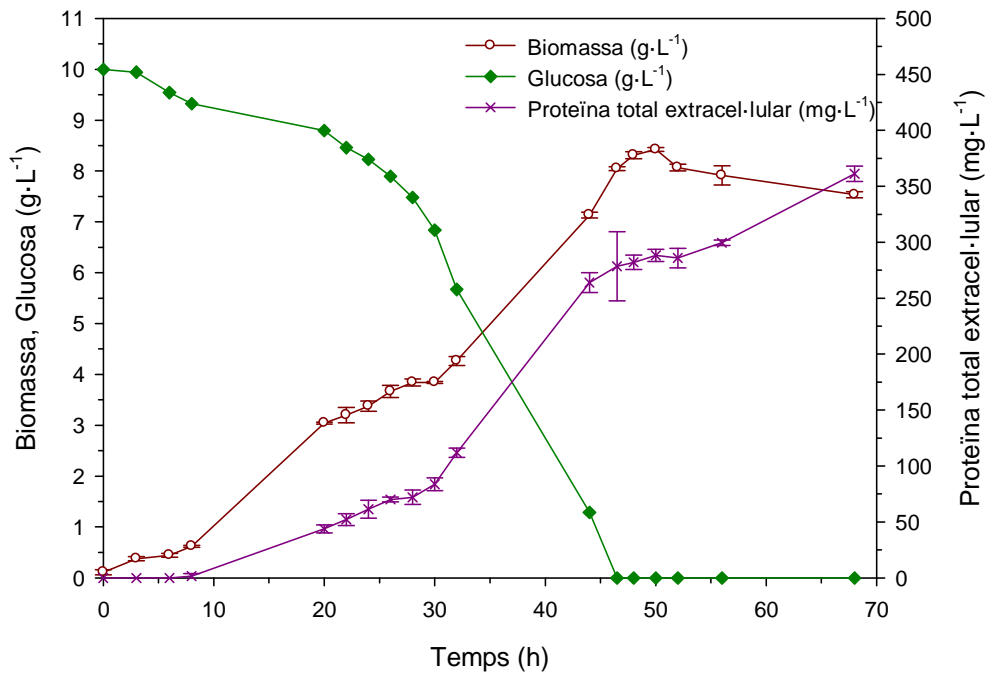


Figura 11. Creixement de la soca *S. lividans* TK21pAGAs5 amb glucosa com a font de carboni.

Pel què fa a la proteïna detectada en el medi extracel·lular la quantitat era major. Es va començar a detectar proteïna a partir de les 20h moment a partir del qual ja no deixava d'incrementar. El fet que la quantitat de biomassa fos menor a l'obtinguda en el cas del cultiu amb mannitol i que la quantitat de proteïna extracel·lular fos major, feia pensar que els fenòmens de lisi cel·lular es donaven amb més freqüència quan el cultiu es realitzava amb glucosa.

L'activitat d'agarasa no va poder ser mesurada en aquest cas perquè la presència de glucosa en el medi emmascarava el resultat i feia que no fos possible mesurar-ho.

El tercer cultiu que es va plantejar amb aquesta soca *S. lividans* TK21pAGAs5 va ser el que no s'afegia cap font de carboni al medi i es presenta en la Figura 12. El microorganisme només podia utilitzar els casaminoàcids per tal de poder reproduir-se i ho va fer amb una velocitat específica de creixement de  $0.06\text{h}^{-1}$  que és un valor inferior a l'obtingut en els altres creixements. La concentració de biomassa assolida en la primera fase de creixement en manitol va ser de  $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  i en aquest cas, abans de la primera addició de casaminoàcids, la concentració de biomassa assolida era de  $1.3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  que són valors semblants.

El perfil de secreció al medi extracel·lular és semblant als casos anteriors i es va iniciar a les 22h i no va parar d'augmentar probablement per la secreció de la proteïna però també degut a la lisi cel·lular. De fet a partir de les 38h ja s'observa una disminució de la concentració de biomassa que torna a augmentar lleugerament a partir de les 48h degut a la segona addició de casaminoàcids.

El fet que la quantitat de biomassa assolida fos similar entre la primera fase del cultiu en manitol i d'aquest últim amb només casaminoàcids, feia pensar que realment durant les primeres hores del cultiu amb manitol s'utilitza aquesta mescla d'aminoàcids com a font de carboni principal.

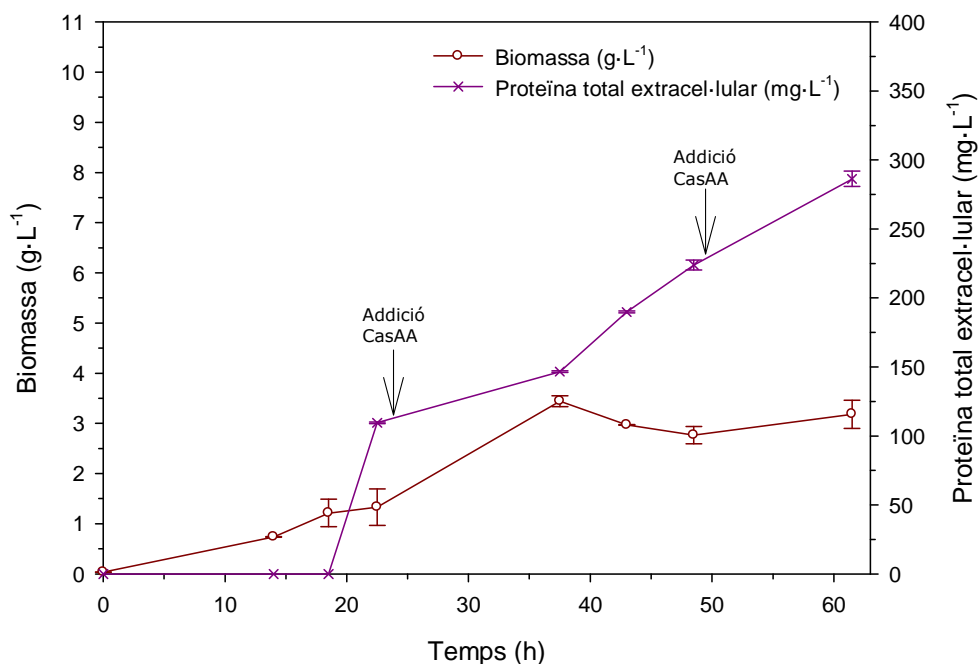


Figura 12. Creixement de la soca *S. lividans* TK21pAGAs5 en medi NMMP sense font de carboni.

Pel que fa a les activitats agarasa, en els cultius de *S. lividans* TK21pAGAs5 en glucosa i sense font de carboni no es va detectar activitat en els sobrenedants i és per aquest motiu que es va procedir a precipitar les proteïnes amb sulfat amònic. La precipitació va resultar ser un procés molt heterogeni en el qual es perdia gran part de la proteïna en la fase de precipitació i en les posteriors fases de rentat. Per aquest motiu que les activitats que es van mesurar no seguien

un patró lògic i inclús quan es repetia l'assaig amb una mateixa mostra els resultats eren diferents. Aquest va ser el primer indicatiu que l'assaig d'activitat havia de ser redissenyat.

#### **4.4. Efecte de la font de carboni i la producció de proteïna en la soca deficient en *SipY*: *Streptomyces lividans* $\Delta sipY$**

Un cop analitzat i estudiat el creixement i la producció de la soca *S. lividans* TK21 es va procedir a realitzar un estudi equivalent amb la soca de *S. lividans* que tenia el gen de la peptidasa senyal *sipY* delacionat. Com ja s'ha explicat anteriorment, la disrupció del gen *sipY* dóna lloc a l'acumulació intracel·lular de proteïnes que provoca la saturació temporal del sistema translocasa i, per tant, una reducció dràstica de la quantitat de proteïna secretada a l'exterior cel·lular (Palacín et al. 2002).

L'objectiu era veure quines diferències en quant a producció total però sobretot en quant a producció específica per unitat de massa proteica per tal de poder veure quina era la millor estratègia a seguir. Inicialment es va plantejar realitzar les creixements en el medi definit CHMM que s'havia utilitzat anteriorment (Parro et al. 1998) però no es va aconseguir creixement ni activitat en cap dels casos. Posteriorment es va saber que possiblement hi havia un error en la formulació del medi descrit i que contenia també font de nitrogen orgànica (Mellado, R. P., comunicació personal). És per aquest motiu que es va decidir realitzar els creixements en el medi NMMP i utilitzant mannitol o bé glucosa com a font de carboni. Els resultats dels dos cultius es mostren en la Figura 13.

Els assajos d'activitat es van realitzar directament del brou de cultiu evitant d'aquesta manera el pas de precipitació de proteïnes. El motiu d'aquesta modificació en l'assaig d'activitat està justificada més endavant (apartat 4.5 de Resultats I) conjuntament amb l'estudi de l'assaig enzimàtic. No obstant, l'anàlisi de les mostres dels cultius presentats a continuació (Figura 13) encara van ser realitzats segons el protocol de l'assaig enzimàtic inicial descrit en l'apartat 3.5.6.1. de Materials i Mètodes.

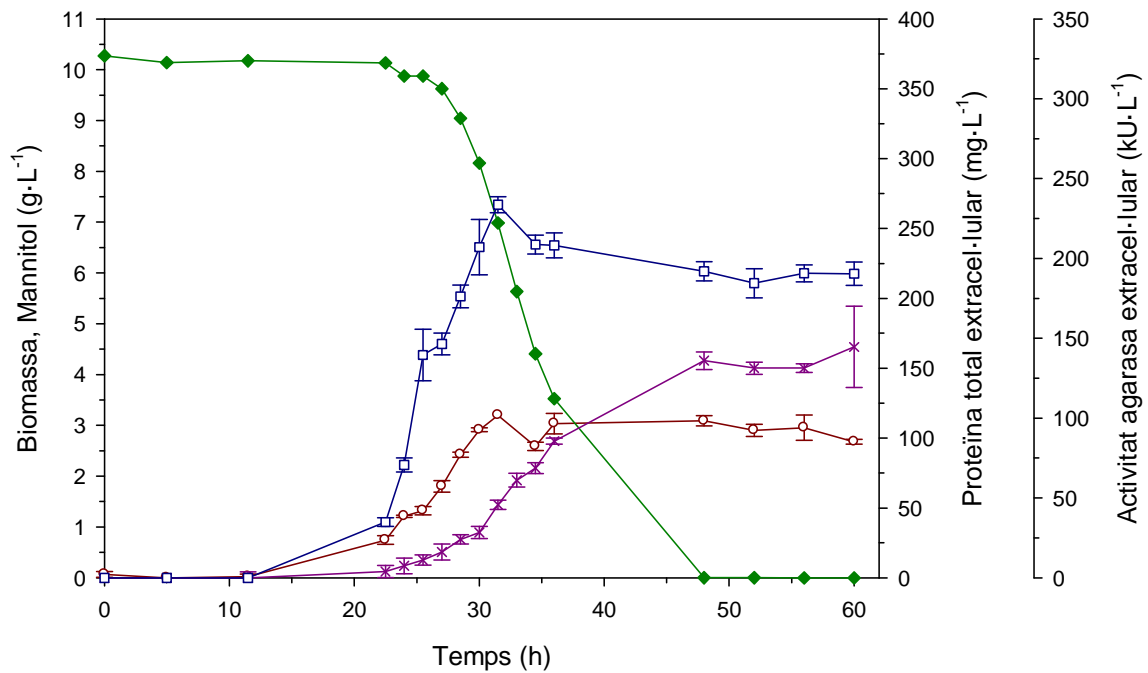
El primer creixement realitzat amb *S. lividans*  $\Delta sipY$ pAGAs5 en medi NMMP amb mannitol com a font de carboni es presenta en la Figura 13A. Es va poder observar, tal i com també s'havia observat en el creixement amb la soca salvatge (*S. lividans* TK21pAGAs5) que quan la font de carboni era el mannitol es donava un creixement diàuxic en el qual primer es consumien els casaminoàcids i posteriorment el mannitol. Així, fins a les 24h (tal i com s'havia donat anteriorment) no s'havia consumit pràcticament mannitol i la concentració de biomassa al medi era de  $1.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  que és lleugerament inferior a la que s'havia assolit en el cas de la soca salvatge. Durant la primera fase del cultiu es va obtenir una velocitat específica de creixement de  $0.12\text{h}^{-1}$  mentre que a partir de les 24h quan es va iniciar el consum de mannitol la velocitat específica de creixement va augmentar a  $0.14\text{h}^{-1}$ . Aquest comportament era contrari a la soca salvatge que passava a la inversa.

La proteïna va començar a ser secretada a partir de les 24h però d'una forma més lenta que en el cas de la soca salvatge i va arribar a un màxim de  $165\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  al final del cultiu a les 60h.

#### 4. Resultats I: Estudis preliminars de producció de proteïnes amb *Streptomyces*

Aquesta quantitat va ser inferior a la proteïna obtinguda en la soca salvatge ( $286\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) degut a la reducció de la quantitat de proteïna secretada com a conseqüència de la delecció del gen *sipY*.

A)



B)

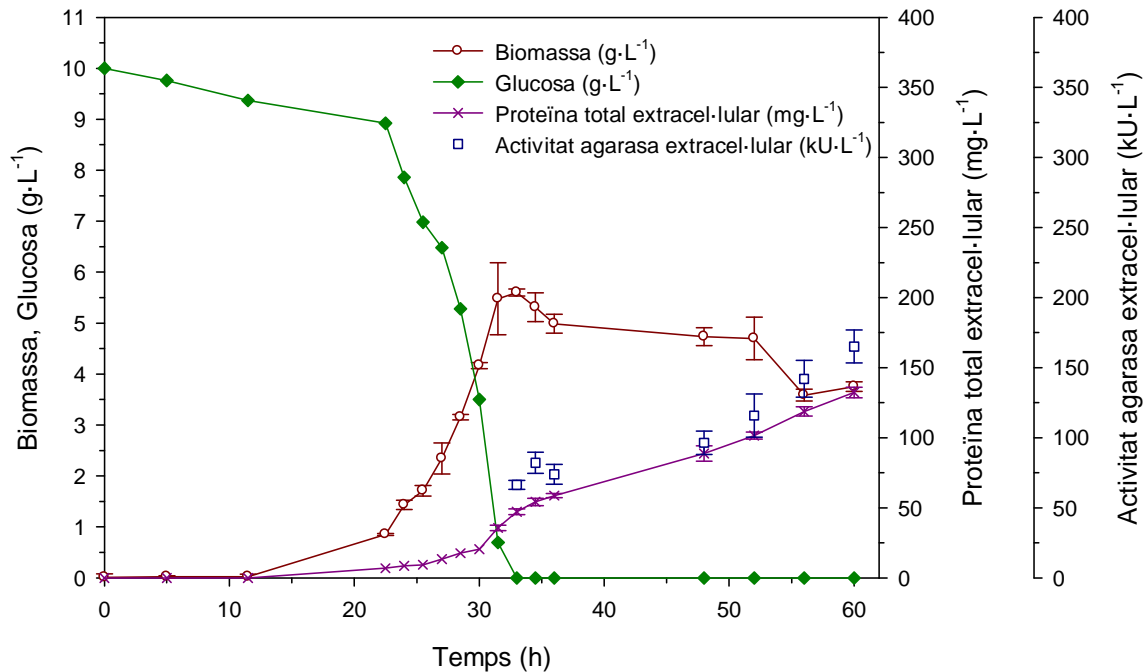


Figura 13. Cultius en discontinu en bioreactor de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ . A: Creixement de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  en mannitol. B: Creixement de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  en glucosa.

L'activitat agarasa va aparèixer de forma simultània amb la proteïna secretada. En aquest cultiu es va observar un comportament no esperat i va ser que l'agarasa va sortir en una etapa molt primerenca del procés. Tenint en compte que el pèptid líder de la proteïna agarasa la condueix cap a la secreció per a la via Tat, la detecció al medi extracel·lular o el major increment s'hauria de donar en etapes avançades del cultiu. En canvi, aquesta detecció es va donar gairebé des del principi del creixement.

Cal destacar per sobre de tot dues característiques molt importants d'aquesta soca i que li donen un clar avantatge respecte la salvatge. La primera és que en tots els processos que s'han dut a terme amb la soca deficient en SipY no hi ha hagut producció de prodigiosina, l'antibiòtic anteriorment anomenat i que està associat amb el metabolisme secundari i l'estrès del microorganisme. La segona és que cal destacar que aquesta soca creixia en pèl·lets més petits i per tant, la morfologia era molt més dispersa. Això implica que no hi hagi tants problemes de difusió dels nutrients cap a les cèl·lules de l'interior dels pèl·lets com del producte cap al medi extracel·lular. Aquesta morfologia també va fer que la reproductibilitat dels processos fos més elevada.

En el segon cultiu que es va dur a terme es va utilitzar glucosa com a font de carboni i es presenta en la Figura 13B. Es va poder veure com des d'un inici es va començar a consumir la glucosa i per tant, aquesta era metabolitzada des d'un inici i s'utilitzava per a produir biomassa. La velocitat específica de creixement era més alta que en cas de la utilització de mannitol:  $0.18\text{h}^{-1}$  amb un rendiment biomassa/substrat de  $0.58\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . La quantitat de biomassa assolida també va ser major que en cas del cultiu en mannitol. Quan es va utilitzar glucosa s'obtingueren els  $5.6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a les 33h moment en el qual es va esgotar la glucosa i a partir d'aquí es va donar el fenomen de lisi cel·lular.

La quantitat de proteïna secretada i l'activitat detectada va ser menor que en el cas del cultiu en mannitol,  $132\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . L'activitat agarasa presentada en la Figura 13B es va mesurar en les mostres en les quals la quantitat de glucosa era pròxima a  $0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  i, tot i que encara hi podia haver interferències en l'assaig, l'objectiu era minimitzar aquestes interferències i poder obtenir un valor d'activitat ajustat a la realitat. Tenint en compte això, es desconeix si abans es podria haver detectat activitat de l'enzim perquè no es va poder mesurar degut a la presència de glucosa.

Es va realitzar també una anàlisi d'electroforesi desnaturalitzant (SDS-PAGE) en les mostres finals dels cultius on la quantitat de proteïna que es podia carregar al gel ja podia ser visualitzada. El resultat no es mostren ja que els carrils van presentar bandes molt poc definides i no va ser possible visualitzar la banda que corresponia a l'agarasa (32kDa). Per això més endavant es va requerir utilitzar la tècnica del western blot per tal de poder visualitzar l'agarasa.

En la Taula 10 es pot veure la comparació dels dos processos realitzats amb la soca *S. lividans*  $\Delta\text{sipYpAGAs5}$ . Es pot veure com la velocitat específica de creixement és major quan s'utilitza glucosa ja que és un sacàrid més fàcilment metabolitzable per al microorganisme i això fa que sigui capaç de créixer més ràpidament. No obstant, la resta de paràmetres són més favorables al procés en mannitol que en glucosa. El punt màxim d'activitat agarasa s'obté a les 33h en el cas del procés amb mannitol i a les 60h en el cas del procés amb glucosa. La proteïna extracel·lular en el moment de màxima activitat era molt més elevada en el cas de la glucosa cosa que fa que l'activitat específica per unitat de proteïna sigui molt major en el cas del procés

#### 4. Resultats I: Estudis preliminars de producció de proteïnes amb *Streptomyces*

de mannitol que en el de glucosa, concretament és 3.75 vegades major. La quantitat de biomassa és major també en el procés en mannitol i això també provoca que l'activitat específica per unitat de biomassa sigui 1.65 vegades major en el cas d'utilitzar mannitol.

**Taula 10. Comparativa dels punts màxims d'activitat agarasa dels processos en mannitol i en glucosa amb la soca *S. lividans ΔsipYpAGAs5*.** \*Aquesta activitat va ser mesurada quan no quedava glucosa en el medi

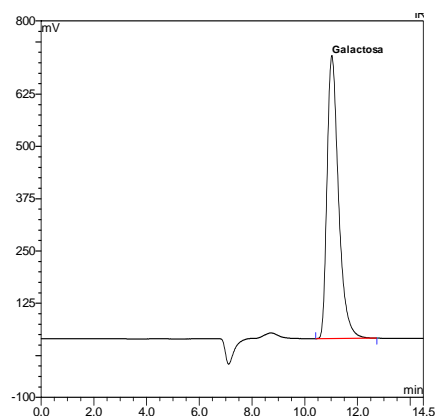
	Velocitat específica de creixement (h <sup>-1</sup> )	Activitat agarasa (kU·L <sup>-1</sup> )	Proteïna total extracel·lular (mg·L <sup>-1</sup> )	Activitat específica per unitat de proteïna (kU·mg <sup>-1</sup> )	Activitat específica per unitat de biomassa (kU·g <sup>-1</sup> DCW)
Mannitol	0.14	233.5±5.0	52.2±3.3	4.5±0.3	73.0±1.6
Glucosa	0.18	165.1±11.7	132.4±3.7 *	1.2±0.1	44.0±3.3

#### 4.5. Estudi i avaluació alternatives de l'assaig d'activitat agarasa

Els resultats de l'assaig d'activitat en els cultius eren poc reproduïbles entre mostra i mostra i en una mateixa mostra. Es desconeixia si era problema de l'assaig o del procés de precipitació de les proteïnes que era un punt en el qual s'incrementava considerablement l'error. Però en qualsevol cas, en un primer moment es va intentar desenvolupar un nou assaig d'activitat.

El primer assaig d'activitat proposat consistia en la quantificació d'oligosacàrids (neoagarabiosa) o de D-galactosa derivats de l'acció de l'enzim mitjançant l'anàlisi per HPLC.

El primer pas va ser determinar que es podia detectar la D-galactosa per HPLC utilitzant el detector IR (Figura 14). El temps de retenció és de 11 minuts i el pic és visible a partir de concentracions de 0.1g·L<sup>-1</sup>.

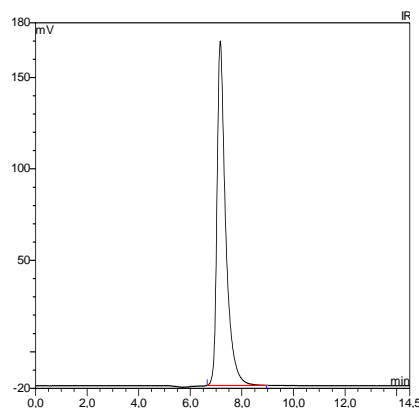


**Figura 14. Cromatograma d'un patró de D-galactosa.**

A partir d'aquí es va plantejar seguir una cinètica de reacció durant 30 minuts analitzant per HPLC mostra cada 5 minuts. El cromatograma obtingut en tots els casos es mostra a la Figura 15. El pic obtingut es va comprovar que provenia del imidazol que és present en la reacció com a solució tampó.

Per tal de descartar que fos qüestió de temps, es va deixar la reacció 2.5h, 3.5h i 4h, obtenint els mateixos resultats. Així doncs, es va concloure que les quantitats d'oligosacàrids i D-galactosa

produïdes eren massa petites com per poder-les detectar mitjançant una anàlisi per HPLC amb un detector IR. Una alternativa podria haver sigut una anàlisi amb la tècnica HPLC-MS però resulta ser una tècnica massa complicada per a un assaig d'activitat rutinari. Així doncs, la limitació temporal i de complicació va fer que es descartés aquesta metodologia com a una alternativa d'assaig d'activitat agarasa en presència de glucosa.



**Figura 15. Cromatograma equivalent per a totes les mostres analitzades en la cinètica de la reacció de l'agarasa. El pic als 7 minuts correspon al tampó imidazol.**

##### 4.5.1. Estudi i optimització de l'assaig d'activitat agarasa

Els resultats poc reproduïbles en la determinació de l'activitat agarasa van fer que es realitzés un estudi de la metodologia que s'estava utilitzant fins aleshores per a poder determinar si s'havia de realitzar alguna modificació que ajudés a obtenir uns resultats més acurats i reproduïbles.

El mètode de detecció de sucres reductors utilitzat per a l'assaig va ser dissenyat per Dygert et al. (1965) i es troba detallat a Materials i Mètodes. Aquest mètode és una modificació d'un test previ en el qual s'utilitzava el tartrat com a agent quelant. Amb el mètode modificat es va substituir el tartrat per la glicina. La utilització de la glicina reduïa considerablement el valor dels blancs i l'error relatiu estàndard quan la detecció de sucres reductors era a molt baixes concentracions. Tot i que es van provar altres mètodes de detecció de sucres reductors (com la utilització de l'àcid dinitrosalicílic, DNS), la sensibilitat del mètode de Dygert et al. (1965) s'adequava més a les necessitats de l'assaig enzimàtic.

El primer pas va ser evitar l'etapa de precipitació de les proteïnes amb sulfat amònic. Per una banda perquè l'alta concentració d'aquesta sal pot afectar a l'activitat de l'enzim i a la disponibilitat del substrat, i per altra banda perquè en el procés de precipitació sempre es perdia proteïna i en cap ocasió es va aconseguir que el balanç màssic coincidís. En segon lloc es van analitzar els components del medi per separat per tal de comprovar que no afectaven en el mètode de detecció. També es va analitzar el volum de mostra que s'afegia a l'assaig i el temps d'aquest assaig.

Amb aquest estudi es va poder dissenyar un nou assaig que va resultar més reproduïble.

##### 4.5.1.1. Estudi de la precipitació de les proteïnes

En els primers assajos d'activitat, el protocol es va extreure de Parro et al. (1997), el qual està detallat en Materials i Mètodes. Durant el procés de familiarització amb el microorganisme i els seus protocols, les proteïnes obtingudes del medi extracel·lular se sotmetien a un procés de precipitació amb sulfat amònic abans d'analitzar la seva activitat agarasa. El procés de precipitació, com ja s'ha dit anteriorment, era poc reproduïble: rèpliques d'una mateixa mostra donaven valors d'activitat amb desviacions típiques considerables. A més a més, si la quantitat de proteïna al medi era baixa (inferior a  $0.1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) es necessitava molt volum per tal d'obtenir una quantitat de precipitat suficient perquè sedimentés durant la centrifugació i no es perdés gran quantitat durant els cicles de rentat. Evitar el procés de precipitació per a la mesura de l'activitat va ser un dels primers objectius per a millorar el test.

En el cultiu que es presenta en la Figura 10 es pot veure l'evolució de l'activitat detectada en el medi extracel·lular. A partir de les 38h ja es va detectar activitat i aquesta va anar incrementant fins al final del cultiu. En canvi, quan es mesuren les activitats dels precipitats la tendència és a la inversa. Els valors es poden observar en la Taula 11.

El fet que les tendències no coincideixin va fer que es plantegés buscar un assaig enzimàtic alternatiu o bé millorar la tècnica utilitzada fins llavors. La primera decisió que es va prendre va ser eliminar el pas previ de la precipitació, és a dir, a partir d'aquell moment es va mesurar l'activitat de la fracció extracel·lular del cultiu. Amb aquesta modificació hi havia millores en quant a reproductibilitat i en quant a la coherència de les tendències dels resultats. No obstant, el fet de no precipitar també comportava problemes de interferència quan la font de carboni era la glucosa. Però es va creure que els avantatges eren més grans que els inconvenients.

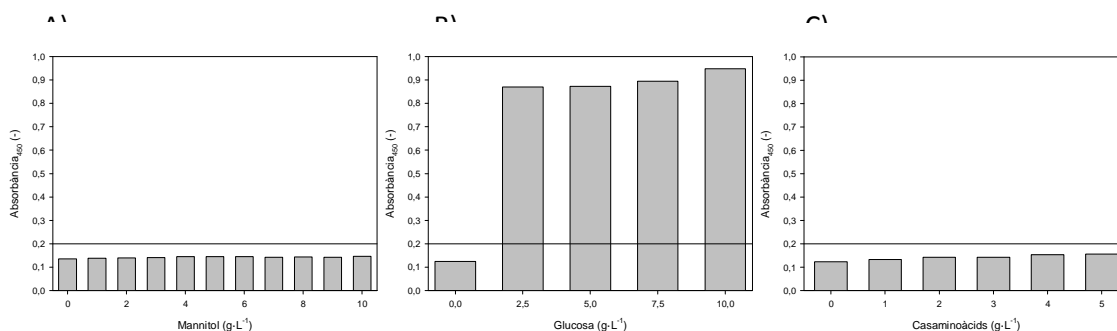
**Taula 11. Comparació dels valors de les activitats.** Els valors expressats a la taula són de les mateixes mostres mesurades directament del medi extracel·lular o amb un pas previ de precipitació. Els valors que es presenten estan en base la unitat de volum de medi del reactor.

Temps (h)	Activitats sobrenedants (kU/L medi)	Activitat precipitats (kU/L medi)
0	0.0	No precipitat
18	0.0	No precipitat
24	0.0	No precipitat
38	34.9±2.8	No precipitat
42	70.7±4.4	118.6±1.8
48	139.6±16.2	No detectada
71	146.4±6.8	290.5±2.3
86	176.2±7.1	134.3±2.4

##### 4.5.1.2. Estudi dels components del medi de cultiu

En aquesta part de l'estudi es va voler comprovar que els components del medi de cultiu no influenciarien en l'assaig enzimàtic si es realitzés sense precipitar la proteïna. Els components majoritaris del medi que s'utilitzaria al llarg d'aquesta tesi doctoral eren el mannitol, la glucosa i els casaminoàcids. Se sabia que la glucosa era un sucre reductor però el mannitol i els casaminoàcids no havien d'influenciar en l'assaig. Per tant, s'esperava que l'absorbància incrementés amb la concentració de glucosa però que no augmentés amb la concentració de mannitol ni de casaminoàcids. Es fixa 0.2 com valor d'absorbància mínima a partir de la qual ja es considera que hi ha interferència. Aquest valor és el més alt obtingut quan s'utilitzava medi NMMP com a mostra.



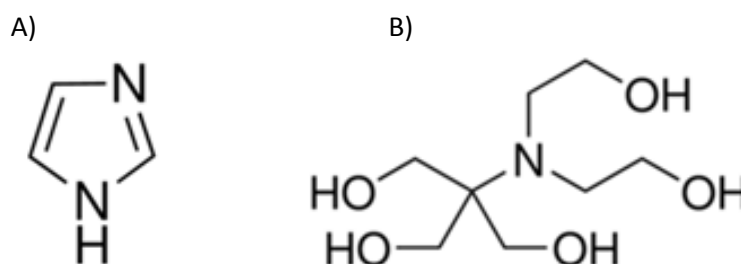


**Figura 16. Estudi de la interferència dels components del medi NMMP en l'assaig enzimàtic. A:** Interferència del mannitol (0-10g·L<sup>-1</sup>); **B:** Interferència de la glucosa (0-10g·L<sup>-1</sup>); **C:** Interferència dels casaminoàcids (0-5g·L<sup>-1</sup>).

Els resultats mostrats en la Figura 16 confirmaven la hipòtesi inicial: el mannitol no influïa en l'assaig enzimàtic així com tampoc ho feien els casaminoàcids però sí que ho feia la glucosa.

#### 4.5.1.3. Estudi de les solucions amortidores

L'assaig enzimàtic es realitzava a un pH de 6.5 en tampó imidazol (Figura 17A). Una de les altres hipòtesis era que el tampó influïés en l'assaig i és per això es va fer un estudi d'aquesta interferència i incloent un tampó alternatiu amb el que es podés treballar si es demostrés que el tampó imidazol causés interferències. Aquesta solució tampó alternativa havia de tenir un rang de pH de treball que inclogués el pH de l'assaig. La solució tampó seleccionada va ser el Bis-Tris (Figura 17B) que té un rang de pH de treball de 5.8-7.2.



**Figura 17. Estructura de les molècules de les solucions tampó. A:** Imidazol. **B:** Bis-Tris.

A la Taula 12 es presenten els resultats que es van obtenir de les 8 combinacions possibles. La diferència entre els valors de les absorbàncies detectades en imidazol o en Bis-Tris quan la resta d'assaig era aigua van ser semblants (mostres 1 i 2). El mateix passa quan les combinacions són o bé amb la presència de mostra amb enzim (mostres 3 i 4) o amb la presència de substrat (mostres 7 i 8). Els valors en les dues solucions tampó són semblants. No obstant, en les mostres 5 i 6 que són aquelles en les quals s'afegeix substrat (agarosa) i mostra amb enzim es pot observar com els valors difereixen considerablement. La diferència entre la utilització de Bis-Tris respecte a la utilització de imidazole és d'un 32% superior en el cas del tampó imidazol. Analitzant l'estructura d'ambdós compostos (Figura 17) no sembla que hi hagués d'haver cap interferència en l'anàlisi de sucres reductors. No obstant, és possible que l'activitat de l'enzim es veiés afectada per la presència del tampó Bis-Tris i que per aquest motiu l'absorbància detectada fos inferior. En qualsevol cas i tenint en compte que les absorbàncies eren semblants en els 6 casos, es va concloure que el tampó imidazol no provocava cap interferència en l'assaig i per tant, es va seguir utilitzant.

Taula 12. Estudi qualitatiu de la influència del tampó en l'activitat enzimàtica.

	Substrat o H <sub>2</sub> O	Solució tampó	Mostra o H <sub>2</sub> O	Absorbància detectada
1	H <sub>2</sub> O	Imidazol	H <sub>2</sub> O	0.192±0.010
2	H <sub>2</sub> O	Bis-Tris	H <sub>2</sub> O	0.212±0.008
3	H <sub>2</sub> O	Imidazol	Mostra	0.197±0.005
4	H <sub>2</sub> O	Bis-Tris	Mostra	0.206±0.006
5	Agarosa	Imidazol	Mostra	0.437±0.012
6	Agarosa	Bis-Tris	Mostra	0.298±0.016
7	Agarosa	Imidazol	H <sub>2</sub> O	0.203±0.003
8	Agarosa	Bis-Tris	H <sub>2</sub> O	0.201±0.002

#### 4.5.1.4. Estudi del volum de mostra de l'assaig

L'assaig enzimàtic tal com estava definit en Parro et al. (1994) es realitzava en un volum final de 1mL. Aquest mil·lilitre era una mescla de: 800µL de substrat (agarosa) a una concentració final de 0.1%p/v, 100µL de solució tampó imidazol a una concentració final de 50mM i 100µL de mostra. Per tant, la quantitat de mostra en l'assaig és un 10% respecte al total de l'assaig que és un percentatge prou elevat com per interferir en el resultat d'aquest assaig. És per això que s'analitzen 7 mostres d'un cultiu a diferents temps per tal de veure si es pot reduir el volum de mostra. Els resultats es mostren a la Taula 13 en la qual es pot veure que l'error en la majoria de les mostres és inferior al 10%. Per tant, treballant amb una desena part del volum s'obtenien absorbàncies semblants. Això va fer que se n'extraguessin dues conclusions: la primera és que era definitivament factible treballar amb un volum de mostra en l'assaig de 10µL. I la segona era que veient els resultats era molt probable que el temps de l'assaig no fos correcte i no estigués dins la zona lineal. Aquest paràmetre seria el següent a estudiar.

Taula 13. Influència del volum de mostra en l'assaig d'activitat.

	Absorbància 100µL	Absorbància 10µL	Error (%)
1	0.386±0.011	0.403±0.008	4.7
2	0.381±0.013	0.397±0.011	4.3
3	0.359±0.012	0.377±0.009	5.1
4	0.355±0.007	0.401±0.012	12.8
5	0.324±0.009	0.358±0.009	10.5
6	0.223±0.006	0.240±0.009	7.6
7	0.303±0.005	0.355±0.003	17.1

#### 4.5.1.5. Estudi del temps de l'assaig i la cinètica de la reacció

L'últim paràmetre que podia influenciar en l'assaig enzimàtic era el temps d'aquest assaig que en un principi estava fixat a 15 minuts (Parro et al. 1994). Per tal de veure si aquest temps era aquell que permetia veure la velocitat inicial de reacció i que per tant es trobava dins la zona lineal de l'assaig enzimàtic es va realitzar la cinètica de reacció enzimàtica amb la mostra a les 36h del cultiu representat a la Figura 13A.

En la Figura 18 es presenta la cinètica de la reacció la qual es va basar en l'anàlisi de sucres reductors aturant la reacció cada 5 minuts des del moment de l'inici fins als 35 minuts. Veient els resultats es podia considerar que els 15 minuts utilitzats fins a aquell moment no es trobaven en la zona lineal i era possible que aquell temps dugués a resultats erronis. És per això que es va reduir el temps d'assaig a 5 minuts.

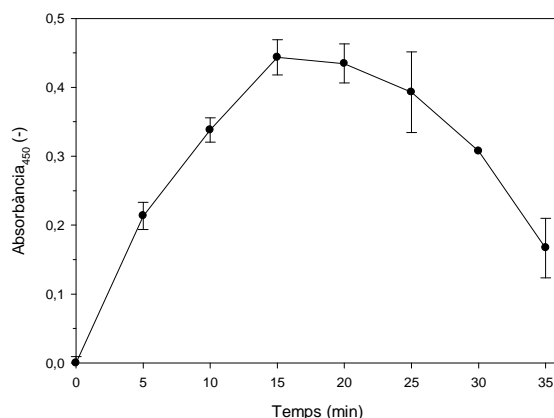


Figura 18. Cinètica de la reacció de l'assaig agarasa.

#### 4.5.1.6. Disseny de l'assaig final d'activitat agarasa

L'assaig d'activitat que es va dissenyar finalment es basava en la metodologia de detecció de sucres reductors de Dygert et al. (1965). El volum de reacció era de 1mL el qual estava format per: 890µL agarosa (0.1%p/v final), 100µL imidazol-HCl (pH 6.5, 50mM concentració final) i 10µL mostra. La mostra s'incubava a 37°C durant 5 minuts i un cop passat aquest temps es parava la reacció portant la mescla a ebullició a 100°C moment en el qual s'afegia 1mL de cada solució de l'assaig de detecció (composicions detallades a Materials i Mètodes). Passats 10 minuts en ebullició s'afegien 7mL d'aigua destil·lada i es mesurava l'absorbància a 450nm.

#### 4.6. Comparació entre la soca *S. lividans* TK21pAGAs5 i la soca *S. lividans* ΔsipYpAGAs5 en medi NMMP amb manitol tenint en compte el canvi en l'assaig enzimàtic

El fet que l'assaig enzimàtic fos modificat, va comportar que la comparació de dades no fos possible. És per això que es van convertir els vells valors obtinguts en la soca salvatge al nou assaig d'activitat i es van comparar amb els nous valors de la soca deficient en SipY. Per tant, els valors d'activitat que es presenten en la Taula 14 no coincideixen amb els que es poden llegir en les Figura 10 i Figura 13A però serien els equivalents amb el nou assaig. A més a més, en el cas de la soca *S. lividans* ΔsipYpAGAs5 es va fer la mitjana dels valors obtinguts al final de la fase discontinua de diferents creixements (efectuats en les mateixes condicions) que seran presentats al llarg d'aquesta tesi doctoral.

En la Taula 14 es pot veure la comparativa de les dues soques i dels valors dels diferents paràmetres es pot extreure que la soca deficient en SipY pot esdevenir un bon hoste per a la producció de proteïnes recombinants.

La producció d'agarasa en ambdues soques va ser molt similar però en canvi, la biomassa de la soca deficient en SipY és menor i, tal com era d'esperar, la quantitat de proteïna extracel·lular va ser molt menor. El fet que la capacitat de secreció de proteïnes estigui molt afectada en aquesta soca provoca una saturació del sistema de secreció i la sobreexpressió de l'agarasa li dóna un paper preferencial a l'hora de ser secretada. D'aquesta manera, gran part de la proteïna total extracel·lular ( $172 \pm 15 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) era probablement agarasa, tot i que en l'anàlisi d'electroforesi no va poder ser demostrat. Així doncs, l'activitat agarasa era similar però

#### 4. Resultats I: Estudis preliminars de producció de proteïnes amb *Streptomyces*

l'activitat específica per unitat de massa de proteïna era el doble en el cas de soca mutada en comparació amb la soca salvatge. També es va poder observar un gran increment en l'activitat específica per unitat de biomassa que en el cas de la soca deficient en SipY era més de 3 vegades major.

Taula 14. Comparació de les soques *S. lividans* TK21pAGAs5 i *S. lividans*  $\Delta$ sipYpAGAs5 tenint en compte la nova anàlisi d'activitat.

Soca	Biomassa (g·L <sup>-1</sup> )	Proteïna total extracel·lular (mg·L <sup>-1</sup> )	Activitat agarasa extracel·lular (kU·L <sup>-1</sup> )	Activitat específica biomassa (kU·g <sup>-1</sup> DCW)	Activitat específica proteïna (kU·mg <sup>-1</sup> proteïna)
<i>S. lividans</i> TK21pAGAs5	9.0±0.3	286±8	1134±46	126±6.4	3.96±0.19
<i>S. lividans</i> $\Delta$ sipYpAGAs5	3.5±0.55	172±15	1396±241	411±106	8.1±1.1

Per tant, tenint en compte aquesta anàlisi dels resultats, es pot concloure que la soca deficient en SipY resulta interessant per a la producció de proteïnes recombinants, especialment aquelles que se secretin per la via Tat com l'agarasa, però també la lacasa de la qual es parlarà més endavant en aquest treball.

#### 4.7. Conclusions finals del capítol I

- S'ha caracteritzat el comportament de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  per a la producció d'agarasa en medi NMMP utilitzant manitol i glucosa com a font de carboni.
- S'ha observat que aquesta soca presenta un creixement diàuxic quan la font de carboni és manitol consumint inicial i preferiblement casaminoàcids.
- S'ha determinat que la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  és adequada per a la producció d'agarasa en bioreactor. Els nivells d'activitat d'agarasa per mil·ligram de proteïna secretada són el doble en aquesta soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  ( $8.1 \pm 1.1$  kU·mg<sup>-1</sup> proteïna) respecte a la soca *S. lividans* TK21pAGAs5 ( $3.96 \pm 0.19$  kU·mg<sup>-1</sup> proteïna).
- El comportament morfològic de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  és més adequat per al cultiu en bioreactor. El creixement es produeix en pèl·lets de mida petita i les propietats reològiques són millors respecte a la soca *S. lividans* TK21pAGAs5.
- S'ha seleccionat el medi de cultiu que s'utilitzarà en els pròxims estudis: medi NMMP utilitzant el manitol com a font de carboni.
- S'ha modificat l'assaig d'activitat agarasa degut als problemes de reproductibilitat:
  - L'activitat es mesura directament del brou de cultiu evitant l'etapa de precipitació de proteïnes.
  - S'ha reduït el temps de l'assaig enzimàtic que ha passat de 15 minuts a 5 minuts de reacció i el volum de mostra en l'assaig.



## 5. Resultats II: Desenvolupament d'una estratègia de producció de proteïnes Tat utilitzant *S. lividans* $\Delta sipYpAGAs5$

### 5.1. Estudi del comportament de la soca *S. lividans* $\Delta sipYpAGAs5$

Els estudis preliminars de les soques *S. lividans* TK21pAGAs5 i *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  van permetre familiaritzar-se amb les tècniques de treball d'aquest microorganisme que són considerablement diferents a les tècniques que s'utilitzen per altres microorganismes. També va servir per observar el comportament de la soca en bioreactor i com utilitzava els nutrients per tal de produir biomassa i el producte d'interès.

A continuació es presenta un nou creixement de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  que va servir per tal de comprovar que la secreció de l'agarasa era tardana degut a què se secreta majoritàriament per la via Tat. En el creixement presentat en la Figura 13A (Resultats I) l'agarasa apareixia en etapes molt inicials del creixement, cosa que no és comú en una proteïna que se secreti per aquesta via. Tal com es pot observar en la Figura 19 l'aparició d'agarasa en aquest cas (i en tots els cultius següents que es durant a terme en aquest treball) es dona tardanament al creixement.

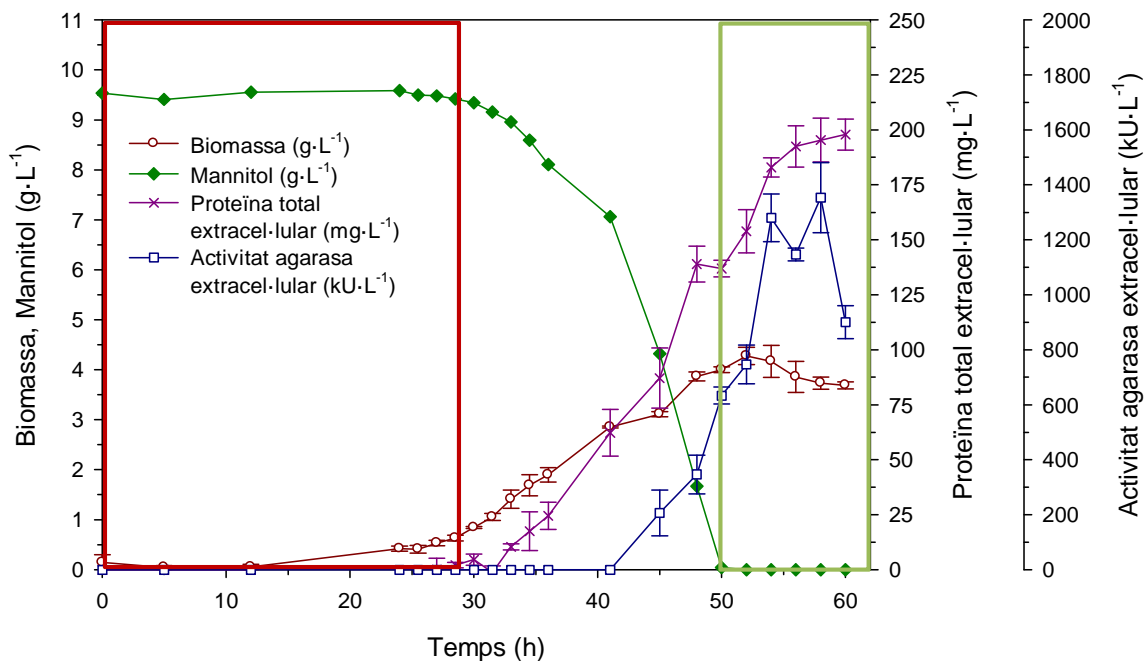


Figura 19. Creixement model de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  que s'utilitza per veure les característiques d'aquesta soca.

També cal esmentar dues característiques dels cultius duts a terme fins al moment. En primer lloc, quan s'utilitza mannitol com a font de carboni el microorganisme presenta un creixement diàuxic. Es pot observar clarament com, en la primera etapa del cultiu (requadre esquerre) hi ha creixement però no hi ha consum de mannitol. Aquest creixement es deu a la utilització dels casaminòdacs com a font de carboni per a la producció de biomassa.

I per altra banda, en l'etapa final del cultiu (requadre dret) es pot observar com a partir del moment que s'acaba el mannitol el cultiu tendeix a lisar i la quantitat de proteïna total a l'exterior cel·lular augmenta degut a l'alliberació de les proteïnes intracel·lulars. Hi ha treballs que proposen que aquesta lisi pot ser deguda a l'estrès per la secreció (Gullón et al. 2012).

L'estudi que es presenta a continuació pretén: augmentar la producció d'agarasa, desenvolupar un procés d'aplicació industrial a través de la modificació del medi de cultiu (modificació de la concentració de fosfats) i del desenvolupament de processos operacionals en discontinu alimentat amb addició de fonts de carboni i nitrogen.

### **5.2. Estudi de la disminució de la quantitat de fosfats en el medi**

El fòsfor inorgànic és probablement el nutrient més limitant en els bacteris del sòl, és per això que aquest grup de bacteris han desenvolupat un gran rang de respostes per tal d'optimitzar la seva utilització. En els estreptomicets, el fòsfor inorgànic (Pi) sovint regula la producció de metabòlits secundaris (Bibb 2005; Martín 2004).

Tal com s'havia detallat a la Introducció, els anteriors treballs realitzats al grup del Dr. Pérez-Mellado (CNB-CSIC) amb la soca salvatge productora d'agarasa *S. lividans* TK21pAGAs1 (pAGAs1 és equivalent a pAGAs5 però el segon té el gen *tsr* del plasmidi inactivat), revelaven que quan els cultius eren sotmesos a condicions de fosfat limitant, la transcripció del gen *dagA* augmentava donant lloc a l'increment de les quantitats de pre-DagA i DagA. Quan s'utilitzava glucosa com a font de carboni, l'augment de la transcripció es donava en totes les etapes del cultiu mentre que, quan s'utilitzava mannitol la transcripció disminuïa en les etapes finals. No obstant, es va veure que la limitació de fosfat tenia un efecte directe en la síntesi d'agarasa ja fos degut a una activació/repressió específica d'aquest gen, o bé com a conseqüència a l'activació d'una via de resposta a un estrès general, com ara el reguló Pho (Parro et al. 1998). Aquests estudis es van completar quan s'utilitzava glucosa com a font de carboni ja que es va poder veure l'expressió en termes d'activitat i mitjançant Western blot. Però no va ser així quan s'utilitzava mannitol ja que el plasmidi pAGAs1 era inestable i es perdia en el transcurs de l'experiment (no es presenten dades d'activitat agarasa).

De qualsevol manera, aquests resultats convidaven a pensar que es podria donar el mateix comportament en el cas d'utilitzar mannitol i amb la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  i, per tant, que hi hagués un increment en la síntesi d'agarasa. A més a més, caldria sumar el fet que la delecció de SipY dóna lloc a un fenotip on l'activitat proteàsica extracel·lular és molt baixa (Palacín et al. 2002). És per això que es va estudiar la disminució de la quantitat de fosfats en el medi en les dues soques (*S. lividans* TK21pAGAs5 i *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ ) quan s'utilitzava mannitol com a font de carboni.

Es va dur a terme l'anàlisi de la composició elemental del microorganisme (Taula 15) per tal de determinar quant s'havia de disminuir la quantitat de fosfat en el medi. L'anàlisi el va realitzar Servei d'Anàlisi Química de la UAB utilitzant les tècniques detallades a Materials i Mètodes.



Taula 15. Composició elemental del microorganisme *S. lividans* TK21pAGAs5

	C	H	N	S	P	Mg
g·g <sup>-1</sup> DCW	0.418±0.004	0.065±0.001	0.102±0.002	0.00	0.033±0.002	0.006±0.001

Es va analitzar només la soca salvatge ja que la composició elemental no ha de variar significativament entre les dues soques amb les quals es treballarà. A partir de la quantitat de fòsfor necessària per cada gram de pes sec es podia calcular la quantitat de fosfat que s'havia d'afegir en el medi de cultiu per tal que aquest fos limitant.

En la bibliografia hi ha varis estudis relacionats amb la limitació de fosfats per a l'estudi de fluxos metabòlics (Avignone Rossa et al. 2002), per a l'obtenció d'antibiòtics en *S. coelicolor* (Borodina et al. 2008) o en *S. tendae* (Hege-Treskatis et al. 1991), però també per a la producció de proteïnes recombinants en *S. lividans* (Parro et al. 1998).

En base a la bibliografia i als càlculs realitzats a partir de l'anàlisi de composició elemental del microorganisme es van proposar tres nivells de fosfats. El primer nivell no presentava cap modificació respecte al medi NMMP descrit en Materials i Mètodes (Keiser et al. 2000). El segon nivell, basat en la bibliografia anteriorment citada, és un ordre de magnitud menor a la concentració anterior. I finalment es va establir un tercer nivell que encara era menor i que va ser calculat com a limitant a partir dels valors de la composició elemental. Els tres nivells de les concentracions dels dos compostos que aporten fosfat al medi de cultiu es detallen a la Taula 16.

Taula 16. Nivells de fosfat establerts per l'estudi l'efecte d'aquest compost en el cultiu de *S. lividans*.

	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g·L <sup>-1</sup> )
Inicial	1.8	2.6
Intermèdia	0.17	0.27
Limitant	0.027	0.045

Posteriorment a l'anàlisi de resultats es podrà veure com en el cas de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ , efectivament, el cultiu no va resultar estar limitat fins al nivell més baix.

### 5.2.1. Estudi en la soca salvatge *S. lividans* TK21pAGAs5

L'estudi de l'efecte de la concentració del fosfat es va dur a terme en les condicions descrites a Materials i Mètodes (3.4.2.5.) emprant els tres nivells de concentració de fosfats al medi de cultiu. També es podrà avaluar si l'operació en continu, tenint en compte que es tracta d'un producte extracel·lular, pot resultar interessant des d'un punt de vista de productivitat.

El primer bloc d'experiments es van realitzar amb la soca salvatge *S. lividans* TK21pAGAs5 utilitzant el mannitol com a font de carboni. L'alimentació s'inicia un cop s'ha esgotat completament el mannitol del medi del cultiu discontinu inicial. El volum de treball de fermentador va ser de 1 litre i la velocitat de dilució escollida per a tots els processos en continu va ser de 0.08h<sup>-1</sup> que és inferior a la velocitat específica màxima de creixement (0.14h<sup>-1</sup>). Passats 5 temps de residència i quan s'observava que el cultiu es trobava estabilitzat es prenen 3-4 mostres. Al llarg del procés en continu hi va haver canvis en la morfologia del microorganisme

## 5. Resultats II: Desenvolupament d'una estratègia de producció de proteïnes Tat *Streptomyces lividans* $\Delta$ sipYpAGAs5

que va passar de ser en pèl·lets a una forma més dispersa i destacadament més viscosa i enganxosa. Aquest canvi de morfologia ja s'havia observat en anteriors estudis (Lohr et al. 1989) però en aquest cas va esdevenir un problema ja que aquesta nova morfologia s'acumulava en grans quantitats a les parets del reactor i això comportava que fos complicat establir el procés no només en termes de biomassa sinó també en quant a quantitat de proteïna total i activitat agarasa detectada al medi de cultiu. És per això que pels tres estats estacionaris que s'havien d'assolir es van realitzar tres processos independents, és a dir, partint d'un cultiu en discontinu nou en cada cas.

Per comprovar que el cultiu no estava contaminat es van observar les mostres microscòpicament i es van sembrar en medi R5 periòdicament, no observant-se contaminació en cap dels casos.

Els resultats obtinguts es resumeixen en la Taula 17. Els tres nivells de fosfat, tal com s'ha explicat anteriorment, corresponen a la concentració inicial que no era limitant pel creixement del microorganisme, una segona concentració que resulta ser més baixa i era la descrita per Parro et al. (1998) però que segons els càlculs realitzats no havia de resultar limitant pel microorganisme i finalment una concentració calculada en aquest treball a partir de la composició elemental.

Cal destacar el comportament de la soca en els tres nivells de fosfat, però sobretot en la concentració intermèdia, en la qual l'activitat agarasa mesurada va resultar ser molt major que en altres dos casos. El primer estat estacionari, en el qual la concentració de fosfat era la inicial i per tant el cultiu no estava limitat, donava lloc a una activitat agarasa de  $20.4\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$  que va resultar ser molt inferior a les  $388\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$  que es van obtenir quan la concentració de fosfats es va reduir un ordre de magnitud. La biomassa obtinguda en el segon estat estacionari era molt inferior però, en canvi, la secreció de proteïna total a l'exterior cel·lular era 2.7 vegades major. Això va tenir com a resultat que les activitats específiques per unitat de biomassa o per unitat de proteïna fossin molt majors quan la concentració de fosfats era intermèdia. De fet, amb la reducció de la quantitat de fosfat al medi es passava d'una activitat específica per unitat de biomassa de  $5.7\text{kU}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$  a  $479\text{kU}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$  i d'una activitat específica per unitat de proteïna de  $0.28\text{kU}\cdot\text{mg}^{-1}$  a  $1.93\text{kU}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteïna. En canvi, quan la quantitat disponible de fosfat en el medi era limitant, no es va detectar activitat agarasa.

**Taula 17. Resum dels processos en continu amb la soca *S. lividans* TK21pAGAs5.** Els valors destacats en cursiva que corresponen a la condició de nivell de fosfat intermedi que és possible que no siguin ajustats a la realitat degut als problemes morfològics destacats anteriorment.

Condicions estat estacionari	Biomassa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Proteïna total extracel·lular ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Activitat agarasa extracel·lular ( $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Agarasa específica per biomassa ( $\text{kU}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$ )	Agarasa específica per proteïna ( $\text{kU}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$ )	Proteases extracel·lulars ( $\Delta\text{Abs}$ )
Inicial	3.56±0.73	73.1±14.1	20.4±2.04	5.7±1.3	0.28±0.06	No detectada
Intermèdia	<i>0.81±0.04</i>	200.7±34.9	388.0±79.4	<i>478.9±100.7</i>	1.93±0.52	0.028±0.003
Limitant	1.74±0.41	40.0±5.4	No detectada	No detectada	No detectada	0.436±0.05

Els resultats del cultiu en el qual la concentració de fosfats era intermèdia no eren prou concloents i fiables com per tenir la certesa que en aquesta concentració intermèdia de fosfats el cultiu es trobava limitat. La morfologia del cultiu en aquestes condicions va resultar ser molt viscosa i gran part de la biomassa quedava retinguda en les parets del bioreactor. Aquest fet provoca que el resultat de la concentració de biomassa en aquestes condicions no s'ajusti a la realitat. Així, amb les dades obtingudes és possible determinar que en les condicions de fosfat limitant el cultiu es troba limitat, però no es pot afirmar que en les condicions de fosfat intermèdies ho estigui.

Aquest increment en la producció de l'enzim quan la concentració de fosfat és baixa està en concordança amb els estudis previs (Parro et al. 1998) tot i tractar-se d'un medi de cultiu diferent. Les quantitats de producte en termes d'activitat no van poder ser comparades ja que el processament de la mostra i l'assaig enzimàtic realitzat en ambdós casos era diferent, però en tot cas la tendència era la mateixa.

L'absència d'agarasa en el medi extracel·lular en l'últim estat estacionari, quan la concentració de fosfat era limitant, podria explicar-se per l'increment de les proteases en el medi extracel·lular (Taula 17). L'anàlisi va revelar que en els dos primers estats estacionaris la quantitat de proteases extracel·lulars eren indetectables o es trobaven en nivells molt baixos. En canvi, quan la quantitat de fòsfor va ser limitant, les proteases actives en l'exterior cel·lular van ser molt més nombroses. Aquests resultats concorden amb els descrits per Parro et al. (1998) quan s'utilitzava glucosa com a font de carboni tot i tractar-se d'un medi de cultiu diferent i d'un assaig de proteases diferent. En canvi, els resultats que va obtenir Parro et al. (1998) quan s'utilitzava mannitol com a font de carboni són contradictoris pel que fa a l'estat estacionari en el qual la concentració de fosfats és intermèdia. En aquestes condicions mesuraven una elevada quantitat de proteases a l'exterior extracel·lular. Aquesta diferència en els resultats pot ser explicada per les diferències en les metodologies de treball seguides: la composició del medi de cultiu era diferent, el processament de la mostra és totalment diferent així com tampoc és igual l'assaig d'activitat proteolítica. Les diferències també podrien ser explicades pel fet que, tal com es declara a aquest estudi realitzat per Parro et al. (1998), la soca no era estable i hi havia pèrdua del plasmidi. En aquest estudi la presència de l'antibiòtic de selecció en el medi d'alimentació del continu garantia la presència del plasmidi en les cèl·lules del cultiu.

#### 5.2.2. Estudi en la soca mutada *S. lividans* $\Delta sipYpAGAs5$

El següent pas en aquest treball va ser realitzar el mateix estudi amb la soca deficient en SipY per tal de veure si s'obtenia la mateixa tendència. A més a més, el fet que la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  és una soca en la qual l'activitat de les proteases extracel·lulars es veu notablement reduïda condueix a pensar que els resultats podrien ser diferents. A partir dels resultats obtinguts es determinarà quina és la concentració de fosfat òptima per a produir proteïnes quan s'utilitza aquesta soca deficient en SipY.

5. Resultats II: Desenvolupament d'una estratègia de producció de proteïnes Tat *Streptomyces lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$

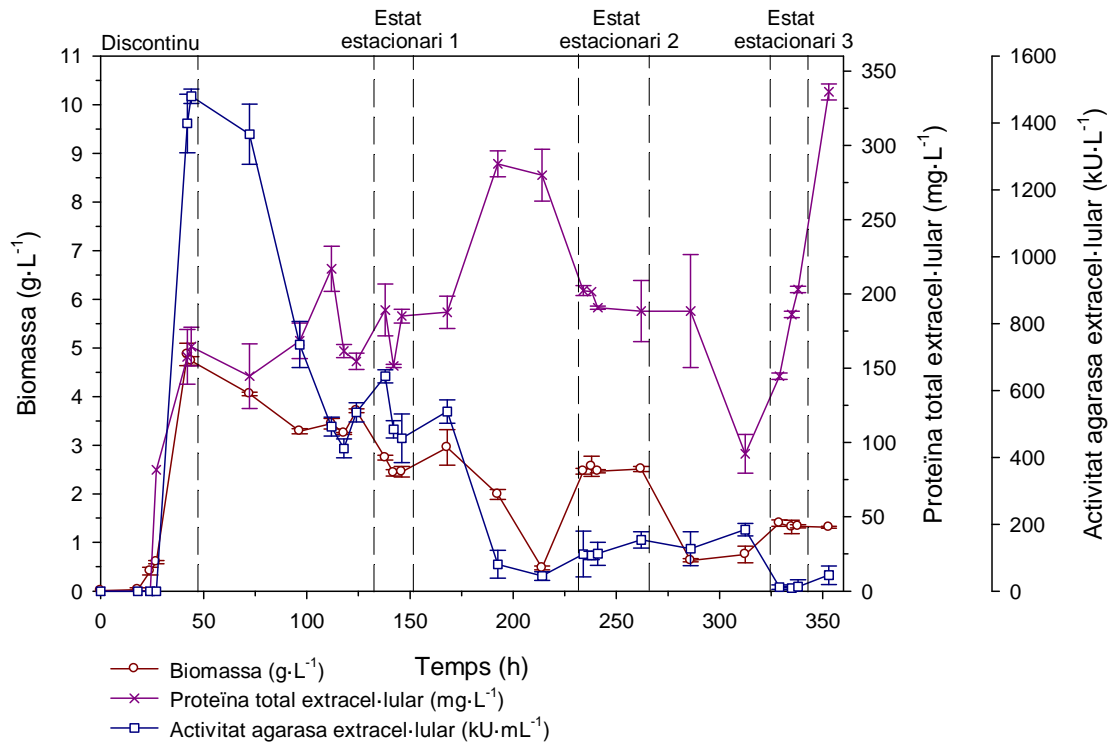


Figura 20. Cultiu en continu amb la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  amb medi NMMP amb mannitol i amb tres nivells de fosfat.

El procediment per dur a terme el procés en continu va ser el mateix que en el cas anterior amb la diferència que aquesta soca presenta unes propietats reològiques molt més favorables i això va permetre que es poguessin encadenar les diferents condicions en un mateix cultiu sense haver d'iniciar un cultiu per a cada un dels estats estacionaris que es volien assolir. El volum de treball va ser de 1L i la velocitat de dilució es va fixar a  $0.08h^{-1}$ . En aquest cas, la morfologia que va adoptar el microorganisme al llarg del cultiu no va ser un problema. La biomassa produïda no es va adherir a les parets del reactor tal com havia passat en el cas anterior i això va fer pensar que les mesures experimentals serien més ajustades a la realitat i tindrien menys error, sobretot en termes de biomassa.

Els resultats del procés en continu es presenten a la Figura 20 i es resumeixen en la Taula 18. S'observen igualment els valors dels tres estats estacionaris que difereixen entre ells per la concentració de fosfat present en el medi d'alimentació del continu. L'efecte que va tenir el nivell de fosfats en el medi va ser diferent que en el cas de la soca salvatge *S. lividans* TK21pAGAs5. En termes de quantitat de biomassa es va poder constatar que només el tercer nivell de fosfats, calculat a partir de la composició elemental del microorganisme, resultava limitant per al creixement. La diferència entre la biomassa obtinguda en el primer i el segon estat estacionari va ser inexistente i només en les terceres condicions de limitació de fosfat, el procés la concentració de biomassa va disminuir fins a  $1.35g \cdot L^{-1}$ . Pel que fa a la quantitat de proteïna total, no es van observar diferències significatives entre els tres estats estacionaris, sembla que la secreció de proteïnes no depengui del nivell de fosfat en el medi ni tant sols quan aquest és limitant. Però això es contraposa amb l'activitat agarasa mesurada que va ser sensiblement més elevada en les primeres condicions. L'activitat enzimàtica específica per unitat de massa de proteïna quan el nivell de fosfats era el més elevat va ser més de 5 vegades més gran respecte

al nivell intermedi i més de 40 vegades més elevada que en condicions limitants. En quant a la producció per cèl·lula també va ser molt major les primeres condicions, en les que la concentració de fosfat en el medi és l'inicial.

Taula 18. Resum dels processos en continu amb la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ .

Condicions estat estacionari	Biomassa ( $g \cdot L^{-1}$ )	Proteïna total extracel·lular ( $mg \cdot L^{-1}$ )	Activitat agarasa extracel·lular ( $kU \cdot L^{-1}$ )	Agarasa específica biomassa ( $kU \cdot g^{-1} DCW$ )	Agarasa específica proteïna ( $kU \cdot mg^{-1} prot$ )	Proteases extracel·lulars ( $\Delta Abs$ )
Inicial	2.54±0.17	175.3±20.7	528.0±100.2	207.5±41.8	3.0±0.67	0.028±0.018
Intermèdia	2.50±0.06	198.4±6.0	109.8±2.8	43.9±1.5	0.55±0.02	0.033±0.006
Limitant	1.35±0.04	177.4±29.9	11.6±2.0	8.5±1.5	0.07±0.02	0.032±0.021

Pel què fa a la presència de proteases en el medi extracel·lular (Taula 18) es va poder comprovar que pràcticament no hi havia activitat al medi de cultiu donant lloc a uns valors que poden ser assumits a zero ja que estan a la part més baixa de l'assaig, en la zona que és possible que sigui la senyal basal de l'assaig.

Així doncs, dels estudis en continu s'extreu que les dues soques amb les quals es treballa es van comportar diferent en els tres nivells de fosfat. Les dades d'activitat en les millors condicions per a les dues soques es resumeixen a la Taula 19. Mentre que la soca salvatge va obtenir el seu màxim en el nivell intermedi, la soca deficient en SipY el va obtenir en els nivells més alts. La comparació en quant a activitat específica de proteïna va deixar clar que la soca  $\Delta sipYpAGAs5$  resultava més interessant també en aquest cas igual com va quedar palès en els estudis en discontinu.

El proper pas seria estudiar altres estratègies operacionals per tal de millorar la producció aprofitant el coneixement adquirit fins ara del sistema.

Taula 19. Comparació final de les soques estudiades.

Condicions estat estacionari	Nivell de fosfat	Activitat agarasa extracel·lular ( $kU \cdot L^{-1}$ )	Agarasa específica per unitat de biomassa ( $kU \cdot g^{-1} DCW$ )	Agarasa específica per unitat de proteïna ( $kU \cdot mg^{-1} prot$ )
<i>S. lividans</i> TK21pAGAs5	Intermedi	388.0±79.4	478.9±100.7	1.93±0.52
<i>S. lividans</i> $\Delta sipYpAGAs5$	Inicial	528.0±100.2	207.5±41.8	3.0±0.67

### 5.3. Producció d'agarasa en la soca *S. lividans* $\Delta sipYpAGAs5$ en discontinu alimentat

Un cop realitzats aquests estudis en continu es va voler incrementar la producció d'agarasa seguint altres estratègies operacionals. Així doncs, el següent pas va ser dissenyar un cultiu discontinu alimentat utilitzant la concentració de fosfats del medi NMMP per tal de veure si l'increment de la quantitat de biomassa suposava un increment en la producció d'agarasa tal com era d'esperar. Per fer-ho, calia veure quina era la millor estratègia d'addició de substrat i

de quin substrat. Havent analitzat tots els resultats anteriors es van plantejar tres tipus d'addicions: addició de casaminoàcids, addició de mannitol o bé realitzar una addició combinada d'ambdós substrats.

Finalment, els millors resultats seran analitzats mitjançant la tècnica de Western blot per confirmar els resultats.

### 5.3.1. Operació discontinua alimentada: Addició de casaminoàcids o inici amb concentració doble d'casaminoàcids

La primera alternativa que es va provar va ser l'addició de casaminoàcids. S'havia observat anteriorment que els casaminoàcids resultaven ser la primera font de carboni que utilitzava el microorganisme en les primeres etapes del creixement quan la font de carboni principal del cultiu era mannitol. Tenint en compte doncs, que la cèl·lula podia fer servir els casaminoàcids com a una primera font per al creixement es va pensar que un cop s'hagués esgotat la font de carboni una segona addició de casaminoàcids ajudaria al creixement però també a la producció ja que els casaminoàcids no deixaven de ser una mescla d'aminoàcids que podia ajudar com a matèria primera més elaborada per a la producció de la proteïna d'interès.

A la

Figura 21 es presenta el creixement i producció de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  en la qual en el primer gràfic es presenta el creixement i el consum de mannitol i en el segon gràfic es presenta la proteïna total secretada al medi i l'activitat agarasa detectada al medi. Primerament es va poder veure de nou que la biomassa assoleix una concentració de  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  sense consumir la font de carboni, el mannitol. És en aquesta etapa on va començar la fase exponencial en la qual el microorganisme va créixer amb una velocitat específica de creixement de  $0.15\text{h}^{-1}$ . A les 50h es va esgotar la font de carboni (mannitol) i seguidament es va poder observar l'inici de la lisi cel·lular. Pel què fa a l'activitat agarasa, es pot veure com es comença a detectar a partir de les 41h i de forma una mica retardada respecte a la detecció de la proteïna al medi extracel·lular. Això concordaria amb el fet que l'agarasa és una proteïna que se secreta majoritàriament per al via Tat de secreció. Tot i que en el primer creixement presentat en la Figura 13A aquest fet no pogués ser confirmat taxativament, en la resta dels cultius duts a terme aquesta característica sí que ha estat ser observada.

A les mostres de les 56, 58 i 60h es va observar un estancament de l'increment de l'activitat agarasa que estava al voltant de les  $1300\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$  i va ser llavors quan es va decidir fer l'addició puntual de casaminoàcids que va restaurar la concentració dels casaminoàcids a  $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Malgrat aquesta addició, tal com es pot veure a la

Figura 21, això no va implicar un segon increment de l'activitat de la proteïna d'interès sinó que aquesta va disminuir fins a les  $700\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$ . En canvi, la quantitat de proteïna total al medi extracel·lular no va parar d'incrementar-se simultàniament amb la lisi cel·lular del cultiu. Així doncs, es va veure que l'addició extra de font de nitrogen orgànic no conduïa a un increment en la producció de la proteïna d'interès ni tampoc a l'increment de la biomassa. És possible que la soca ja no creixi més tot i l'addició de casaminoàcids perquè hagi arribat a un punt de col·lapse metabòlic donat per l'estrès de l'expressió i de la secreció. Això explicaria que, tot i

l'addició de casminoàcids, el cultiu continués lisant i s'augmentés la quantitat de proteïnes totals en el medi però en canvi que l'activitat agarasa disminuís.

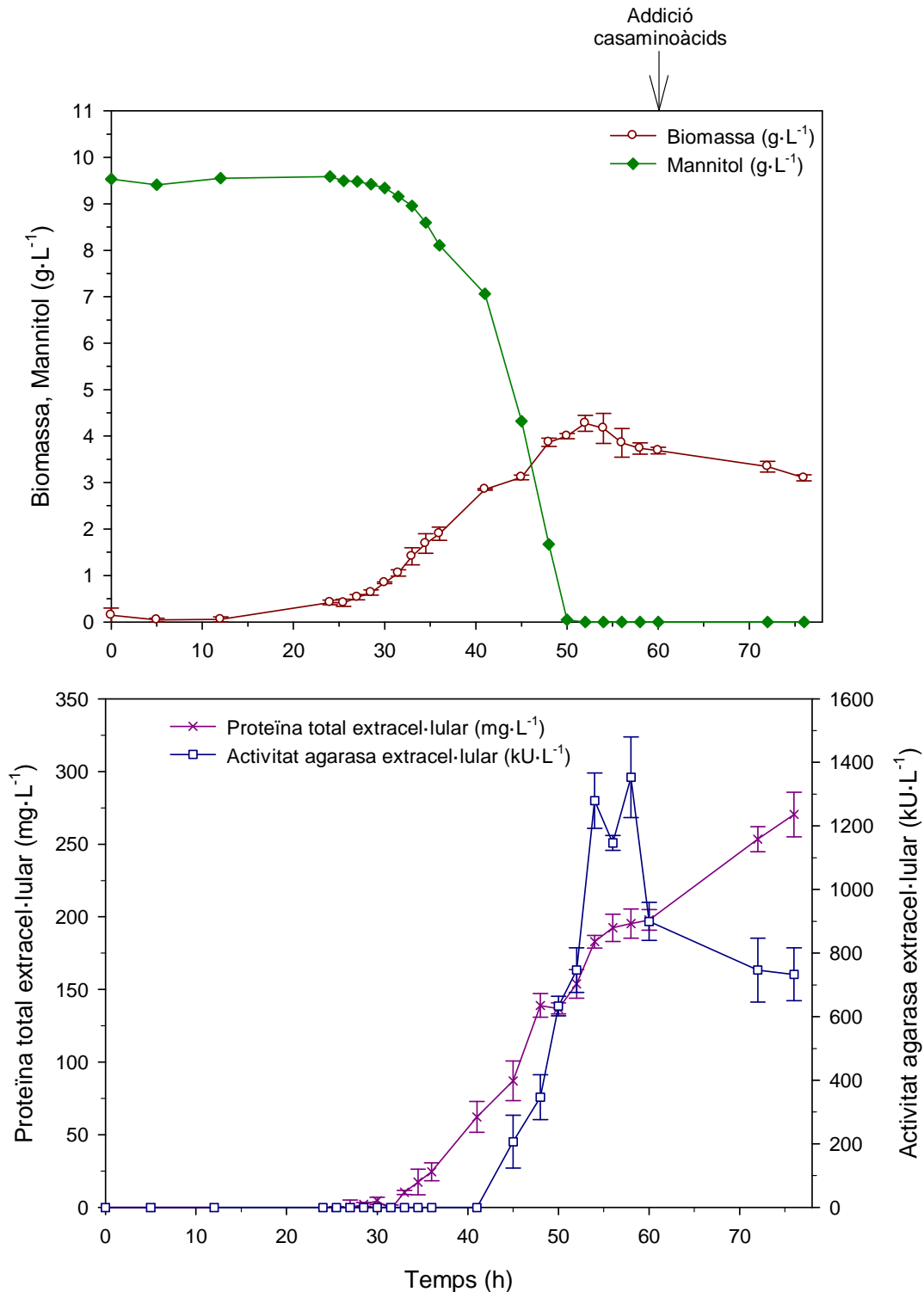
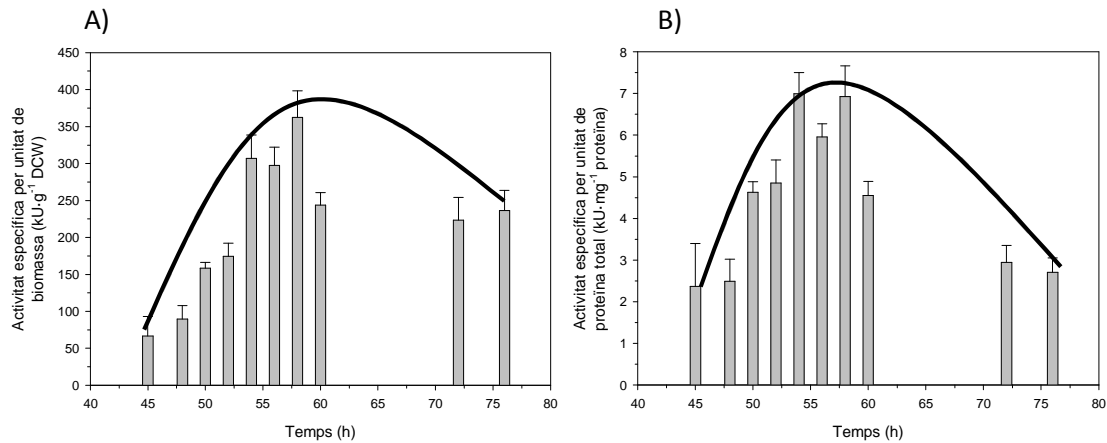


Figura 21. Cultiu discontinu alimentat amb una addició de casaminoàcids de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ .

En l'anàlisi de les activitats específiques es va poder avaluar com d'eficient era la biomassa a l'hora de produir la proteïna d'interès i com de pura resulta respecte al total de proteïnes secretades al medi extracel·lular. Aquesta anàlisi es pot veure en la Figura 22 en el qual hi ha

## 5. Resultats II: Desenvolupament d'una estratègia de producció de proteïnes Tat *Streptomyces lividans* $\Delta sipYpAGAs5$

representada l'activitat específica per unitat de biomassa (Figura 22A) i l'activitat específica per unitat de proteïna (Figura 22B). La tendència d'ambdós gràfics era la mateixa amb els màxims d'activitat específica a les 58h. Això implica que l'addició de casaminoàcids no dona cap efecte positiu de manera que aquesta estratègia de discontinu alimentat no és la més apropiada ja que s'obté més activitat en el discontinu.



**Figura 22. Representació de les activitats específiques del cultiu de *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  en el cultiu amb addició de casaminoàcids. A:** Representació de l'activitat específica per unitat de biomassa. **B:** Representació de l'activitat específica per unitat de proteïna.

En l'estudi de la lisi cel·lular es va veure que aquest fenomen es donava quan no quedava font de carboni en el medi. Per això, el segon procés que es va intentar per tal de veure si hi havia una major producció va ser realitzant addicions puntuals de manitol per tal d'evitar la lisi cel·lular però iniciant el cultiu amb una concentració de casaminoàcids doble per tal d'evitar la limitació d'aquests.

En la Figura 23 es poden observar els dos gràfics que esquematitzen aquest cultiu amb la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ . En el gràfic superior es representa la producció de biomassa i el consum de manitol. Com en tots els cultius en manitol la biomassa produïda va assolir una concentració igual a  $1.07\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a les 24h quan encara no s'havia consumit manitol. El cultiu va créixer a una velocitat específica de creixement de  $0.15\text{h}^{-1}$  que coincideix amb la del cultiu anterior. A les 44h es van esgotar els  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de manitol i per això es va realitzar una primera addició que va restablir la concentració inicial. En el moment que va tornar a haver-hi font de carboni al medi el creixement de la biomassa sembla que va disminuir però de seguida va tornar a augmentar. A les 58h i 78h es van tornar a fer dues addicions més per tal de seguir incrementant la producció.

Analitzant el perfil de la producció total de proteïna i de l'activitat agarasa (presentades en la gràfica inferior de la Figura 23, es va poder observar com la proteïna va començar a ser secretada en el medi extracel·lular a partir de les 24h i l'activitat agarasa a partir de les 48h. Així doncs, l'aparició de l'agarasa, al igual que passava en el cas anterior, va retardada respecte a l'aparició de la proteïna a l'exterior cel·lular. No obstant, la diferència amb el cultiu anterior raïa en el fet que en aquest cultiu, no es va detectar activitat agarasa fins hores més tard que s'hagués esgotat tot el manitol inicial.



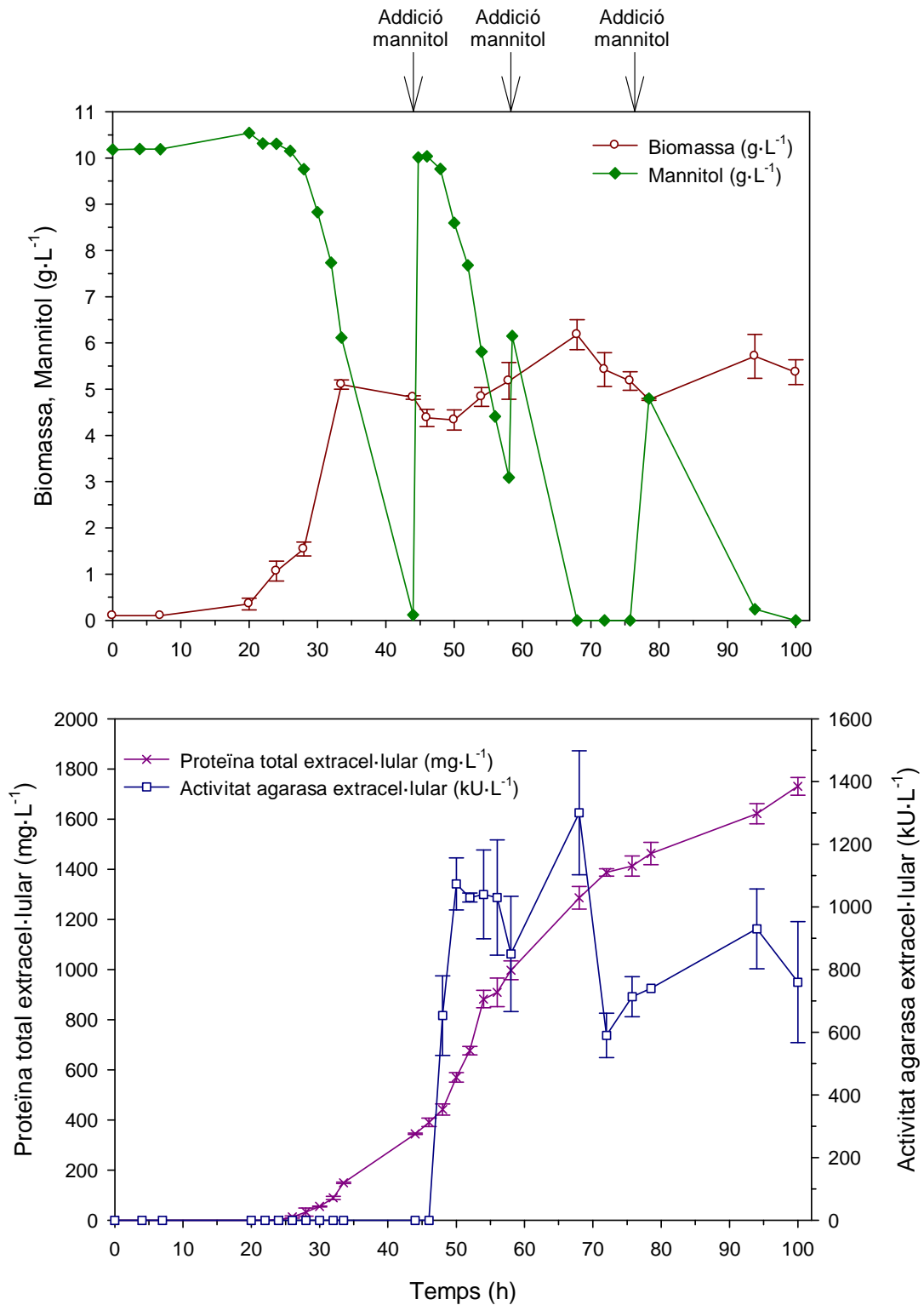


Figura 23. Cultiu discontinu alimentat partint d'una concentració de casaminoàcids doble i amb addicions puntuals de mannitol amb la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ .

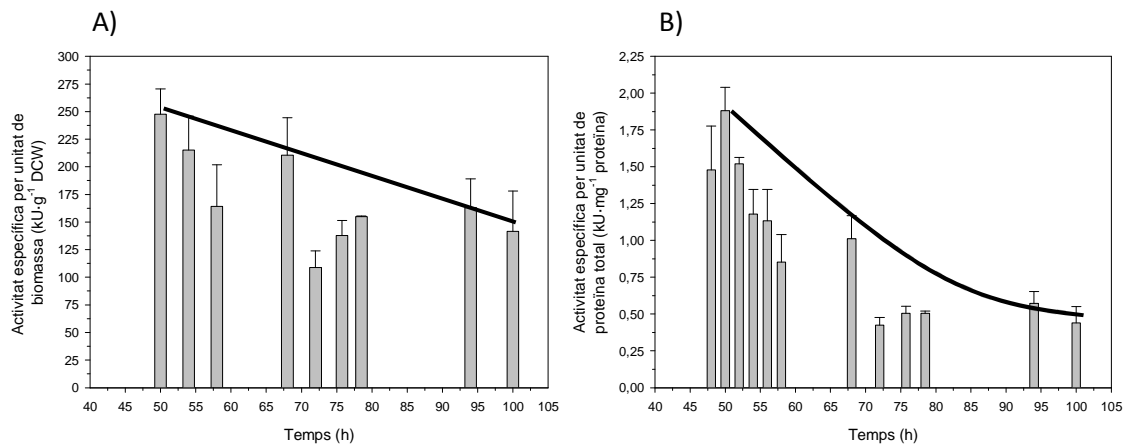
Quan es van calcular les activitats específiques per unitat de biomassa (Figura 24A) o per unitat de proteïna total (Figura 24B) es va veure que les tendències eren irregulars però els màxims s'obtenien després de la primera addició de mannitol. En etapes més tardanes la

## 5. Resultats II: Desenvolupament d'una estratègia de producció de proteïnes Tat *Streptomyces lividans* $\Delta sipYpAGAs5$

capacitat de producció d'agarasa per part de cada cèl·lula disminuïa així com també ho feia la quantitat d'agarasa respecte a la proteïna total.

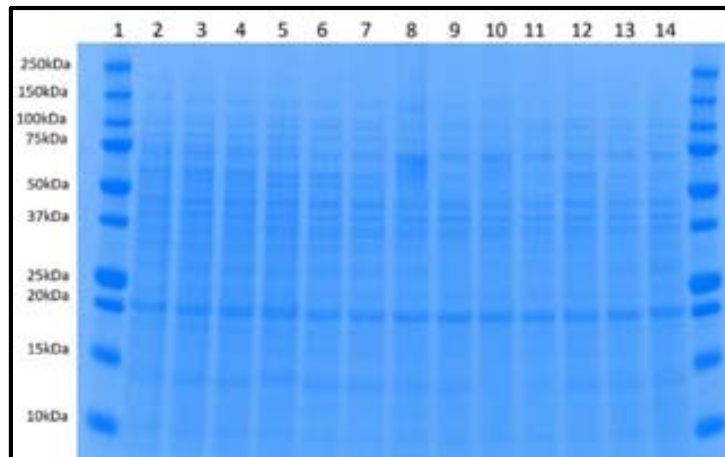
Així doncs, els nivells de producció que es van assolir van ser semblants als obtinguts amb el cultiu en el qual s'addicionava casaminoàcids però en cap cas superiors. Això podia ser explicat pel fet que les fonts de nitrogen orgàniques donen lloc a una menor producció de proteïnes recombinants tal com s'ha vist en altres microorganismes.

Aquests resultats van fer plantejar una última estratègia que es basa en iniciar el cultiu sense doblar la quantitat de casaminoàcids i fer addicions de manitol puntuals per tal d'evitar que el manitol sigui consumit completament i per tant evitar la lisi del cultiu. Això serà analitzat en el següent apartat.



**Figura 24. Representació de les activitats específiques del cultiu de *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  en el cultiu amb addició de manitol partint d'una concentració doble de casaminoàcids. A:** Representació de l'activitat específica per unitat de biomassa. **B:** Representació de l'activitat específica per unitat de proteïna.

Es va voler comprovar també si es visualitzava la banda corresponent a l'agarasa en una anàlisi d'electroforesi SDS-PAGE. El resultat es mostra en la Figura 25. En la zona on hi hauria d'haver la proteïna d'interès (32kDa) no es va observar cap banda ben definida o almenys que destaqués per sobre de la resta. Aquest fet cal comentar-lo perquè s'esperava veure la banda ja que s'està expressant el gen d'interès en alt número de còpies i s'esperava que aquesta sobreproducció fes que destaqués la banda de l'agarasa per sobre de la resta de proteïnes secretades a l'exterior cel·lular. Veient que no era així, es va decidir que se seguiria la producció de la proteïna mitjançant l'assaig d'activitat. Més endavant es van poder realitzar alguns assajos per Western blot que és una tècnica específica que permetrà que pugui ser visualitzada la banda.



**Figura 25. Electroforesi de proteïnes del cultiu amb addicions de manitol i partint d'una concentració doble de casaminoàcids de *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ .** El carril 1 correspon al marcador de pes molecular i la resta de carrils corresponen a les mostres del cultiu mencionat: 46h (carril 2), 48h (carril 3), 50h (carril 4), 52h (carril 5), 54h (carril 6), 56h (carril 7), 58h (carril 8), 68h (carril 9), 72h (carril 10), 76h (carril 11), 78h (carril 12), 94h (carril 13), 100h (carril 14).

### 5.3.2. Addició de manitol

L'última alternativa que va ser estudiada en aquest bloc de treball va ser una estratègia que consistia en impedir que la quantitat de manitol en el medi arribés a valors pròxims o iguals a zero. Per fer-ho es van realitzar addicions puntuals restablint cada vegada la concentració de manitol al voltant  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

L'evolució del cultiu es pot veure en les dues gràfiques de la Figura 26. En la gràfica superior es presenta l'evolució de la producció de biomassa i el consum de manitol i es va poder observar com, igual que a la resta de cultius, la biomassa va començar a créixer utilitzant els casaminoàcids i a partir de les 26h el manitol es comença a consumir. La velocitat específica de creixement en aquest cas també va ser de  $0.15\text{h}^{-1}$  en la fase exponencial del cultiu.

A les 46h de cultiu, la quantitat de biomassa que s'havia produït era de  $3.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  i quedava una quantitat de manitol  $1.87\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , la concentració de proteïna al medi que havia estat secretada era de  $230\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  i l'activitat detectada assolía el valor de  $1673\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$ . En aquest moment va ser quan es va addicionar la quantitat necessària de manitol per restablir la seva concentració al voltant dels  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En aquesta primera addició es va poder veure com hi havia un augment de la proteïna secretada a l'exterior cel·lular que va passar dels  $230\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  als  $540\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  abans de la segona addició. I també un increment considerable de l'activitat agarasa que va passar a  $2687\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$  que suposava un increment de 1.6 vegades respecte a l'activitat abans de la primera addició i era sensiblement major a les activitats obtingudes en els altres processos.

A les 58h es va fer la segona addició de substrat però aquesta ja no va suposar un increment tan significatiu respecte a la secreció de proteïna ni tampoc a producció d'agarasa, l'activitat de la qual va augmentar fins a  $3140\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$ . Per això, tot i que l'activitat va augmentar, no es donava un increment tant pronunciat com s'havia donat en la primera addició. A les 70h, veient que l'activitat agarasa no augmentava es va fer una addició de casaminoàcids per tal de veure si la font de nitrogen era limitant i per veure si amb la seva addició encara s'aconseguia un augment

## 5. Resultats II: Desenvolupament d'una estratègia de producció de proteïnes Tat *Streptomyces lividans* $\Delta sipYpAGAs5$

major de producció. No obstant, l'activitat agarasa es va mantenir fet que pot fer pensar que les cèl·lules ja es trobaven en col·lapse metabòlic. Inclús en l'última mostra a les 93h, l'activitat agarasa va caure en picat.

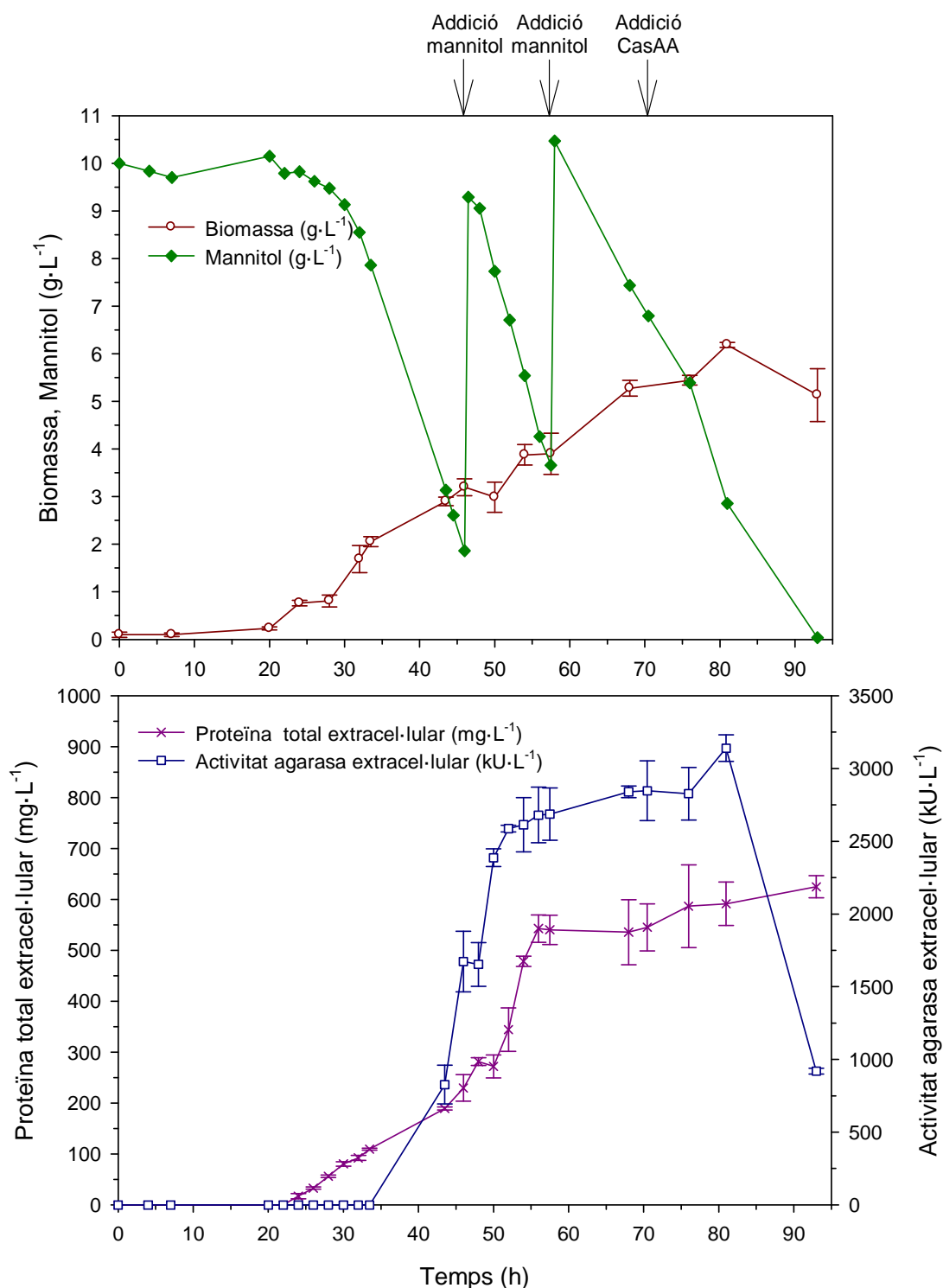


Figura 26. Cultiu discontinu alimentat amb addicions puntuals de mannitol amb la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ .

A la Figura 27 es pot veure l'evolució amb el temps de l'aparició de proteïna d'interès i de les proteases. Es pot veure que les proteases apareixen a les 50h i augmenten lleugerament infins a les 68h. L'aparició de les proteases coincideix amb l'estabilització de l'activitat agarasa.

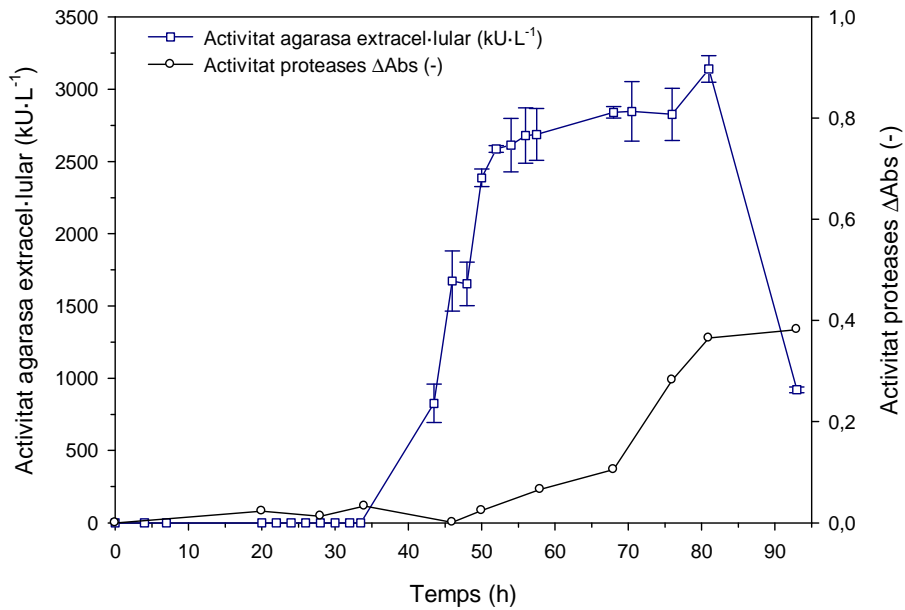


Figura 27. Evolució de l'activitat agarasa i l'aparició de proteases en el medi extracel·lular en el cultiu discontinu amb addicions de mannitol de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ .

Finalment, quan es va analitzar la productivitat de cada cèl·lula mitjançant l'evolució de l'activitat específica per unitat de biomassa (Figura 28A) es va poder veure que les hores posteriors a la primera addició van coincidir amb el moment en què més agarasa s'estava produint per cèl·lula. A les 50h és quan l'activitat específica per unitat de biomassa va assolir el valor màxim,  $798 \text{ kU} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DCW}$ . Respecte a l'activitat específica per unitat de proteïna total (Figura 28B) també és a les 50h quan és major amb un valor de  $9,5 \text{ kU} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteïna total. Així doncs, la primera addició dóna un efecte positiu a la producció d'agarasa però sembla que la segona addició no produeix una millora.

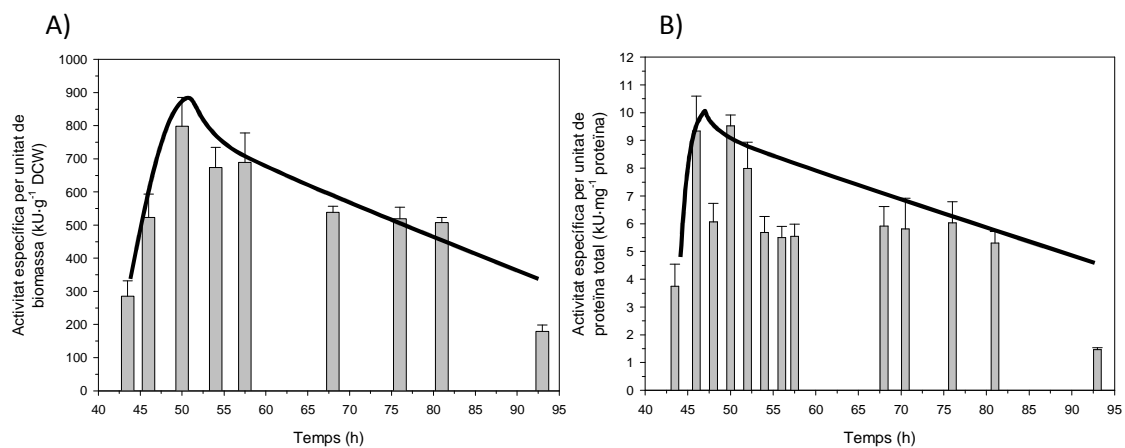
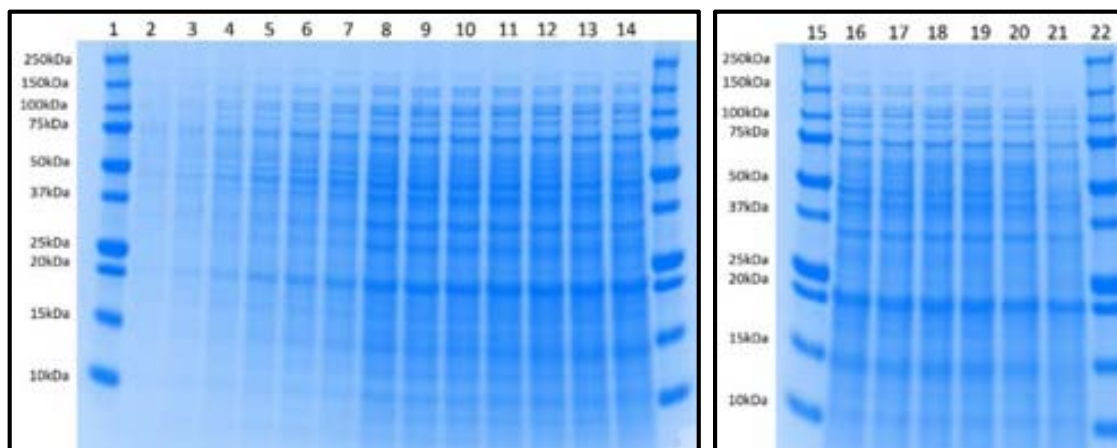


Figura 28. Representació de les activitats específiques del cultiu de *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  en el cultiu amb addicions de mannitol. A: Representació de l'activitat específica per unitat de biomassa. B: Representació de l'activitat específica per unitat de proteïna.

## 5. Resultats II: Desenvolupament d'una estratègia de producció de proteïnes Tat *Streptomyces lividans* $\Delta sipYpAGAs5$

Es va realitzar una anàlisi SDS-PAGE per tal de veure si es podia visualitzar la banda de l'agarasa i si aquesta destacava per sobre de la resta. El resultat es mostra en la Figura 29. Tot i que a 32kDa pot ser visualitzada la banda corresponent a l'agarasa es més endavant es realitzarien anàlisi de les mostres per Western blot.



**Figura 29. Electroforesi de proteïnes del cultiu amb addicions de manitol de *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ .** Els carrils 1, 15 i 22 corresponen al marcador de pes molecular i la resta de carrils corresponen a les mostres del cultiu mencionat: 24h (carril 2), 26h (carril 3), 28h (carril 4), 30h (carril 5), 32h (carril 6), 34h (carril 7), 44h (carril 8), 46h (carril 9), 48h (carril 10), 50h (carril 11), 52h (carril 12), 54h (carril 13), 56h (carril 14), 58h (carril 16), 68h (carril 17), 71h (carril 18), 76h (carril 19), 81h (carril 20) i 93h (carril 21).

### 5.3.3. Comparativa dels creixements en discontinu alimentat

Les tres estratègies plantejades en aquest apartat estan resumides en la Taula 20 en la qual es detallen numèricament l'activitat agarasa i les activitats específiques.

**Taula 20. Resum dels cultius en discontinu alimentat realitzats per a la producció d'agarasa.**

Discontinus alimentat	Activitat agarasa extracel·lular ( $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Agarasa específica per unitat de biomassa ( $\text{kU}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$ )	Agarasa específica per unitat de proteïna ( $\text{kU}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$ )
Addició de CasAA	1353±127	363±36	6.9±0.7
Addició de manitol amb 2XCasAA	1073±83	248±23	1.9±0.2
Addició de manitol	2387±61	799±87	9.5±0.4

Comparant les produccions, es va poder concloure que l'estratègia que consistia en partir del medi NMMP i realitzar addicions de manitol impedit la consumició total d'aquesta font de carboni va resultar ser la més efectiva. Seguint aquesta estratègia es van obtenir uns resultats sensiblement millors als obtinguts fins aleshores. Al voltant de les 50h de tots els cultius era quan més cèl·lules estaven produint la proteïna d'interès i quan hi havia més activitat específica per unitat de proteïna.

En la millor estratègia (addició de mannitol), l'activitat específica per unitat de biomassa va resultar ser 2.2 vegades major que quan s'addicionaven casaminoàcids i 3.2 vegades major que quan s'addicionava mannitol però es partia d'una concentració doble de casaminoàcids. Així doncs, les condicions d'aquest procés provocaven que les cèl·lules fossin molt més eficients. No obstant, addicions posteriors de mannitol no van comportar un increment de la producció degut, com ja s'ha dit anteriorment, al col·lapse metabòlic de les cèl·lules provocat per l'expressió de la proteïna i per la seva secreció.

Respecte a l'activitat específica per unitat de proteïna, també era major respecte els dos primers processos: gairebé 1.4 vegades major en el cas de l'addició de mannitol respecte a l'addició de casaminoàcids i 5 vegades major respecte a quan s'iniciava el cultiu amb la concentració de casaminoàcids doblada.

Amb l'anàlisi d'aquests resultats va quedar palès que la millor estratègia era realitzar addicions de mannitol prèvies a l'esgotament d'aquesta component del medi. El temps de cultiu es podia aturar a les 60h després de la primera addició i quan els nivells de producció són màxims.

#### 5.3.4. Anàlisi de la proteïna agarasa per Western blot

L'agarasa es detecta per assaig d'activitat però per anàlisi de SDS-PAGE no s'obtenen resultats concloents. Per això es va voler determinar si l'anàlisi per Western blot podia ser una tècnica adequada pel seguiment de la producció extracel·lular i que concordés amb l'assaig d'activitat.

Així doncs, l'objectiu d'aquesta anàlisi va ser confirmar la presència de la proteïna agarasa produïda en els experiments amb la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ . En primer lloc va ser necessari posar a punt el mètode de detecció de l'agarasa per Western-blot i, en segon lloc, aplicar-lo a la determinació d'agarasa en les produccions dutes a terme en discontinu alimentat amb addicions de mannitol evitant la consumició total d'aquesta font de carboni i per tant, intentant evitar la lisi cel·lular del cultiu. Aquests experiments es van realitzar durant la meua estada al grup del Dr. Rafael Pérez-Mellado al Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC, Madrid).

##### 5.3.4.1. Posta a punt del mètode analític

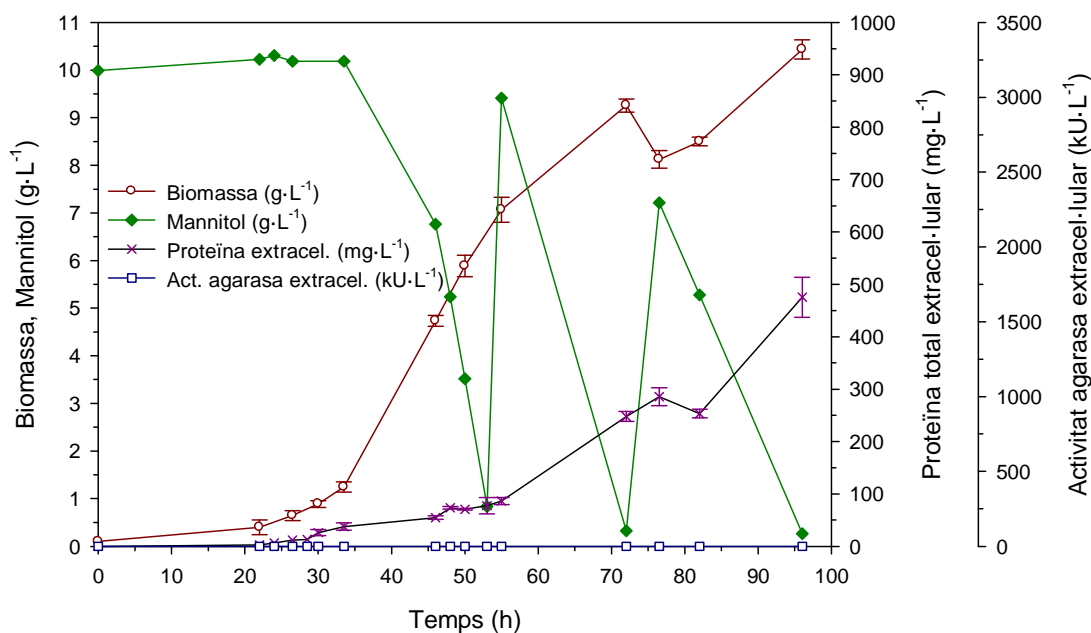
El Western blot és una tècnica analítica que s'utilitza per a detectar una proteïna específica en una mostra determinada que, com és aquest cas, és una mescla de proteïnes i altres components. Es realitza primer una electroforesi, procés en el qual se separen les proteïnes segons el seu pes molecular. Posteriorment les proteïnes són transferides a una membrana de PVDF i aquesta és tractada amb l'anticòs específic contra la proteïna d'interès que es busca. Finalment, es detecta la unió antigen-anticòs mitjançant un sistema de quimioluminescència.

Per la posta a punt del mètode es va haver d'optimitzar diferents paràmetres per tal que la detecció fos completa i fidel als resultats obtinguts. Així doncs es va haver d'establir quina era la quantitat de mostra adequada a carregar al Western, observar i estudiar les diferències entre les mostres precipitades i les mostres de medi extracel·lular i finalment estudiar quin era el millor temps de transferència per tal d'assegurar que aquesta fos total.

## 5. Resultats II: Desenvolupament d'una estratègia de producció de proteïnes Tat *Streptomyces lividans* $\Delta sipYpAGAs5$

L'anàlisi de Western blot es va realitzar amb les mostres del millor procés que va resultar ser el cultiu de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  en medi NMMP amb mannitol com a font de carboni i realitzant dues addicions puntuals d'aquesta font de carboni. L'evolució del cultiu es pot veure a la Figura 26, on es detalla la producció de biomassa, el consum de mannitol, la quantitat de proteïna total secretada al medi i l'activitat de la proteïna d'interès.

No obstant, per a poder realitzar l'assaig de Western blot es necessita un control negatiu, de manera que es va realitzar un cultiu equivalent amb la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpIJ487$  (anomenada a partir d'ara pIJ487) la qual conté el plasmidi sense insert, és a dir, és una soca que no és capaç de produir agarasa. El cultiu realitzat es presenta en la Figura 30 i és el control del cultiu presentat en la Figura 26.



**Figura 30.** Cultiu discontinu alimentat amb addicions puntuals de mannitol amb la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpIJ487$ . Aquest cultiu serveix com a control negatiu per a l'anàlisi de Western blot.

Es va poder observar que la biomassa produïda en aquest cultiu va ser major que en el cultiu homòleg amb la soca productora i que la quantitat de proteïna secretada al medi va ser menor. Les dues addicions tenen un efecte considerable en quant a la producció de nova biomassa i secreció de proteïna. L'activitat agarasa mesurada en totes les mostres va ser 0kU·L<sup>-1</sup>.

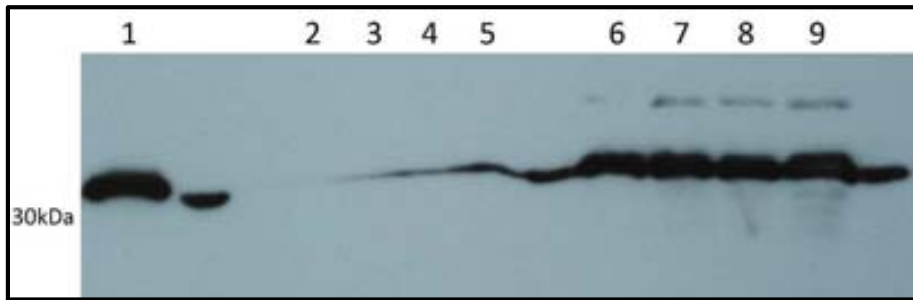
### 5.3.4.1.1. Mostres precipitades: Estudi de la quantitat de la biomassa i el temps de transferència

En primer lloc, va ser necessari dur a terme una sèrie de proves prèvies per determinar l'ajust correcte de la quantitat de mostra a carregar en el gel que estava referenciada a una quantitat de biomassa determinada. Aquest ajust en la quantitat de biomassa havia de ser prou gran com per a poder visualitzar la banda en l'anàlisi però no havia de ser major a la quantitat de proteïna que podia ser transferida a la membrana del Western.

Així doncs, es va decidir fer un primer estudi amb quatre altres ajustaments: 0.5mg, 1mg, 1.5mg i 3mg de pes sec de biomassa. Es va escollir una mostra en la qual se sabia que hi havia agarasa (mostra de les 46h) per a realitzar aquest estudi preliminar amb mostres precipitades i



es va realitzar el mateix procés amb la mostra equivalent del creixement control. El resultat d'aquest primer Western blot es mostra en la Figura 31. Es va poder confirmar que es va produir agarasa satisfactòriament en el cultiu analitzat. En el carril 1 en qual hi ha el control positiu es pot veure com el senyal passa al carril contigu així com també va passar en els carrils 2-5 en els quals es detecta senyal en la soca control pIJ487 quan no n'hi havia d'haver. Es creu que pot ser la interferència dels carrils 6-9 de la soca pAGAs5 és per això que es va decidir que els gels de la soca control i de la soca productora serien diferents. En els carrils de les mostres 6-9 també s'observa una banda més tènue en la part superior de l'agarasa que podria ser la preproteïna, és a dir, l'agarasa que encara contingués el pèptid líder.

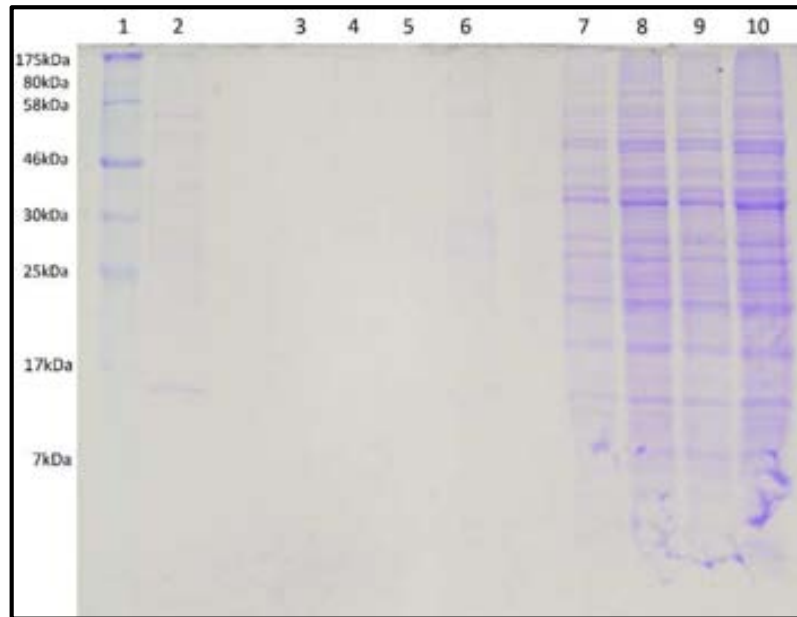


**Figura 31. Western de l'estudi preliminar de l'ajustament de la quantitat de mostra a carregar en el gel.** En el carril 1 es va carregar un control positiu d'una mostra d'un cultiu prèviament comprovat. Els carrils 2-5 corresponen a les mostres del control negatiu amb *S. lividans*  $\Delta sipYpIJ487$  amb la quantitat corresponent a 0.5mg (carril 2), 1.0mg (carril 3), 1.5mg (carril 4) i 3.0mg (carril 5). I finalment els carrils 6-9 corresponen al cultiu amb *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  amb les quantitats 0.5mg (carril 6), 1.0mg (carril 7), 1.5mg (carril 8) i 3.0mg (carril 9).

Pel què respecte a les mostres amb els quatre ajustaments (0.5mg, 1.0mg, 1.5mg i 3.0mg) es va poder veure que la banda era molt similar i que per tant encara resultava ser massa elevada perquè probablement hi havia una saturació de la membrana que provocava que en tots els casos l'agarasa detectada fos la màxima que podia absorbir aquesta membrana. Aquesta hipòtesi es va confirmar amb la tinció amb Comassie del gel que s'havia utilitzat per a fer la transferència a la membrana. Aquest gel (Figura 32) tenyit posteriorment a la transferència encara contenia gran quantitat de proteïna quan en realitat s'hauria de veure un gel transparent que indicaria que tota la proteïna havia sigut transferida a la membrana.

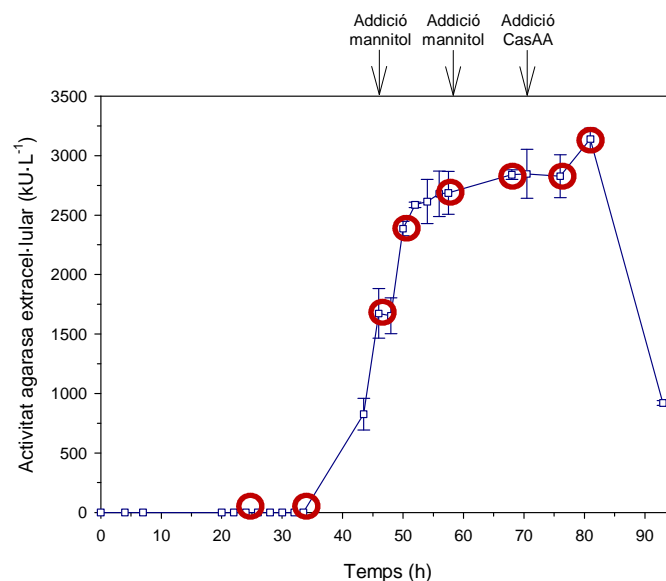
Així doncs es va creure que hi havia dos punts en els quals es podia millorar: l'ajustament de la mostra a menys biomassa i incrementar el temps de transferència.

## 5. Resultats II: Desenvolupament d'una estratègia de producció de proteïnes Tat *Streptomyces lividans* $\Delta sipYpAGAs5$



**Figura 32. Electroforesi SDS-PAGE del gel utilitzat per al Western.** La tinció amb el colorant Comassie es va donar posteriorment a la transferència de les proteïnes des del gel a una membrana mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric. En el carril 1 es va carregar un control positiu d'una mostra d'un cultiu prèviament comprovat. Els carrils 2-5 corresponen a les mostres del control negatiu amb *S. lividans*  $\Delta sipYpIJ487$  amb la quantitat corresponent a 0.5mg (carril 2), 1.0mg (carril 3), 1.5mg (carril 4) i 3.0mg (carril 5). I finalment els carrils 6-9 corresponen al cultiu amb *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  amb les quantitats 0.5mg (carril 6), 1.0mg (carril 7), 1.5mg (carril 8) i 3.0mg (carril 9).

Amb aquests resultats es va decidir provar dos ajustaments de biomassa més amb les mostres precipitades: 0.1mg i 0.25mg. A més a més, es va fer una selecció dels punts més importants del cultiu tenint en compte els moments de les addicions de manitol: 24h, 34h, 46h (abans de la primera addició de manitol), 50h, 58h (després de la segona addició de manitol), 68h, 76h i 81h. Les mostres seleccionades es troben encercades en vermell en la Figura 33 en la qual es dibuixa el perfil d'activitat agarasa. Per a poder fer paral·lelament l'experiment del control negatiu, es van agafar les mostres equivalents del cultiu control pIJ487 corresponents al creixement representat en la Figura 30.



**Figura 33. Evolució de l'activitat agarasa del cultiu de *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ .** Amb cercles vermells estan marcades les mostres que es van analitzar per Western blot.

Dels dos ajustaments a 0.1mg i 0.25mg va resultar que les bandes resultaven més nítides amb l'ajustament a 0.1mg. Per això es presenta el Westerns blot d'aquest ajust a la Figura 34 i la posterior tinció del gel transferit a la Figura 35.

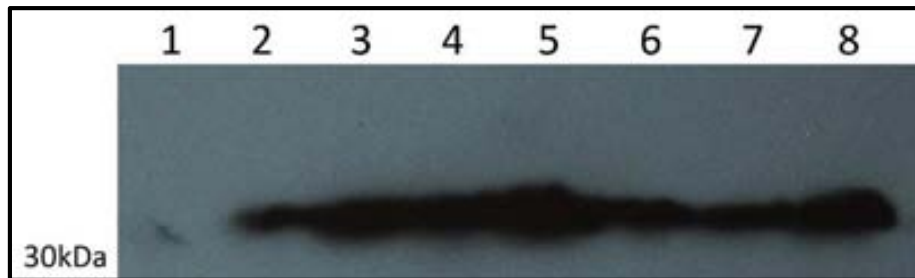


Figura 34. Western blot del cultiu de *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  amb un ajustament dels precipitats de 0.1mg de pes sec. Els carrils corresponen a l'evolució del cultiu: 24h (carril 1), 34h (carril 2), 46h (carril 3), 50h (carril 4), 58h (carril 5), 68h (carril 6), 76h (carril 7) i 81h (carril 8).

Observant els resultats es va arribar a dues conclusions. La primera és que el gel transferit encara contenia certa quantitat de proteïna (Figura 35) i que per tant s'havia d'aconseguir una major transferència. Això s'intentaria incrementant el temps d'exposició al camp elèctric. I per altra banda, la precipitació de les proteïnes donava lloc a resultats poc fidels a la realitat i això quedava palès en observar l'evolució de l'increment de la banda del western blot (Figura 34) que a les 68h i 76h la banda era menor que a les 58h.

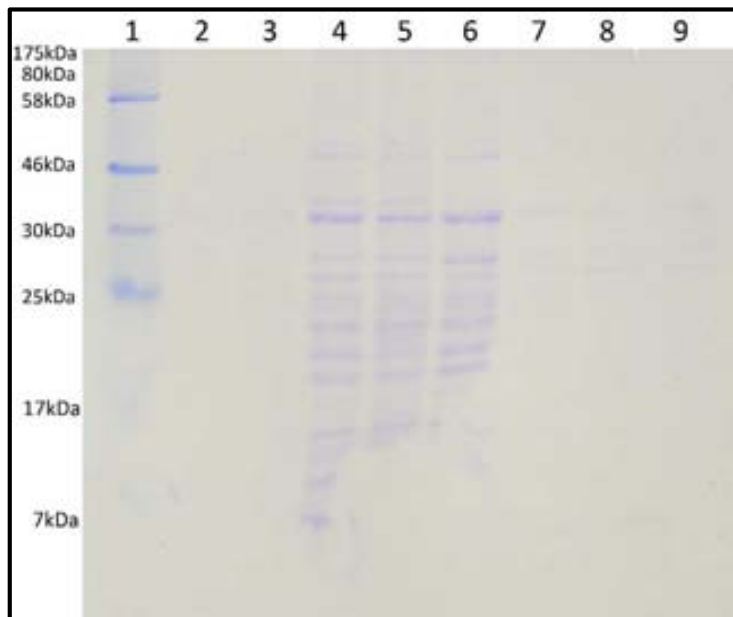


Figura 35. Electroforesi SDS-PAGE del gel utilitzat per al Western. Els carrils corresponen a l'evolució del cultiu: marcador de pes molecular (carril 1), 24h (carril 2), 34h (carril 3), 46h (carril 4), 50h (carril 5), 58h (carril 6), 68h (carril 7), 76h (carril 8) i 81h (carril 9).

Cal destacar que els Westerns blot amb les mostres del cultiu de pIJ487 no van donar cap senyal i que en els gels tenyits posteriorment a la transferència a la membrana no presentaven cap banda (resultats no mostrats).

En l'últim assaig amb les mostres precipitades es va seguir l'ajustament a 0.1mg de pes sec i es va incrementar el temps de transferència fins a 1.25h. Els resultats es presenten en la Figura 36 però a partir de les 46h ja no es pot veure un increment en la intensitat i la grandària de la

## 5. Resultats II: Desenvolupament d'una estratègia de producció de proteïnes Tat *Streptomyces lividans* $\Delta sipYpAGAs5$

banda. La tinció del gel va revelar que no havia quedat proteïna retinguda en el gel de proteïnes i que per tant no era problema de la transferència. És per aquest motiu que es va creure que la causa per la qual no es podia correlacionar els resultats del test d'activitat amb la intensitat de la banda del western blot podria ser degut al procés de precipitació. Per això, el següent pas va ser intentar realitzar el mateix procés però amb mostres de medi extracel·lular directament.

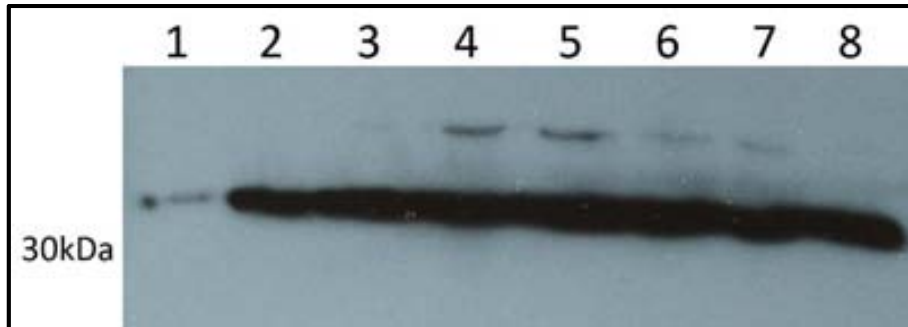


Figura 36. Western blot del cultiu de *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  amb un ajustament dels precipitats de 0.1mg de pes sec i amb una duració de la transferència de 1.25h. Els carrils corresponen a l'evolució del cultiu: 24h (carril 1), 34h (carril 2), 46h (carril 3), 50h (carril 4), 58h (carril 5), 68h (carril 6), 76h (carril 7) i 81h (carril 8).

### 5.3.4.2. Estudi de la detecció de l'agarasa mitjançant el western blot sense precipitar les proteïnes

Les mostres de cultiu cel·lular analitzades per Western blot sense el pas previ de precipitació de les proteïnes amb TCA tenen com a limitació la quantitat de proteïna que es pot carregar al gel d'electroforesi. El volum dels pous de l'electroforesi és limitat i per això es va ajustar a una quantitat de volum màxima. L'ajust de biomassa calculat va ser de 0.02mg de pes sec. El temps de transferència es va mantenir com en el cas dels precipitats a 1.25h.

El resultat d'aquesta anàlisi per Western blot amb les mostres sense precipitar es mostra en la Figura 37. Cal dir que la tinció del gel transferit amb Comassie no va donar bandes i per tant es confirmava que hi havia hagut una transferència total i per altra banda el western blot amb les mostres equivalents del cultiu pIJ487 no van donar cap senyal.

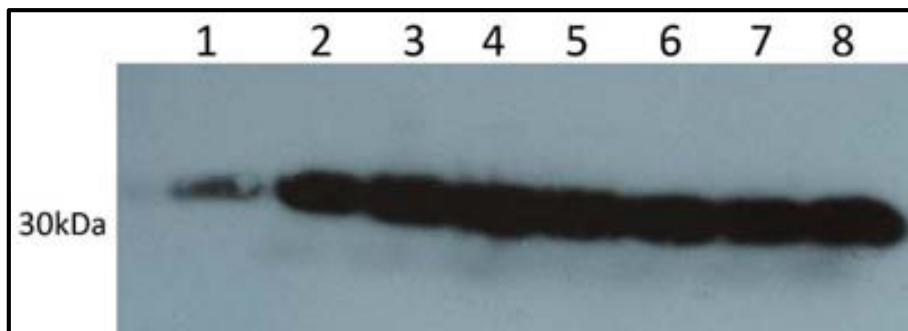


Figura 37. Western blot del cultiu de *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  amb un ajustament de les mostres del cultiu cel·lular a 0.02mg de pes sec i amb una duració de la transferència de 1.25h. Els carrils corresponen a l'evolució del cultiu: 24h (carril 1), 34h (carril 2), 46h (carril 3), 50h (carril 4), 58h (carril 5), 68h (carril 6), 76h (carril 7) i 81h (carril 8).

En aquest western es va poder veure com la intensitat de la banda va anar incrementant fins a les 50h i a partir d'aquest moment el gruix de la banda era similar. Això concordava totalment amb el perfil d'activitat observat prèviament (Figura 33) en el qual hi havia un increment important que s'aturava sensiblement a partir de les 58h.

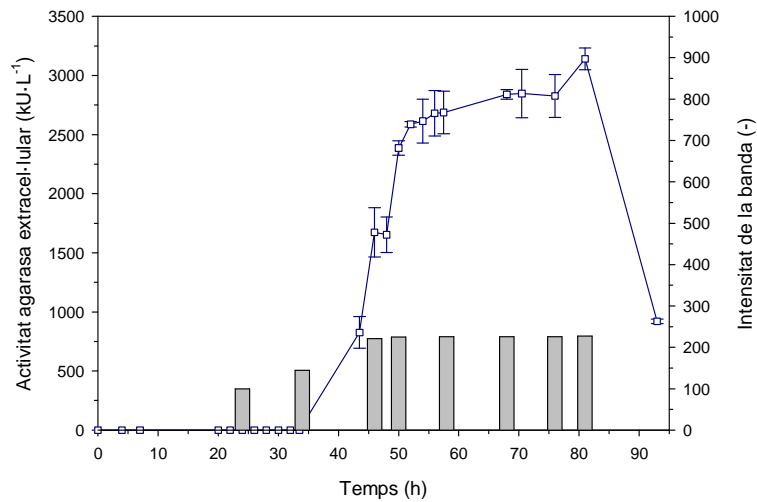


Figura 38. Evolució de l'activitat agarasa i l'increment en la intensitat del pic del Western blot.

En la quantificació de les bandes es poden destacar dues coses. En primer lloc va quedar palès que la tècnica del Western blot és més sensible que l'assaig d'activitat ja que es va detectar agarasa i s'observava banda quan encara no s'havia detectat agarasa al medi extracel·lular. I en segon lloc, es pot veure com la quantificació no és capaç de detectar l'increment més significatiu de l'activitat resultat de l'addició de mannitol.

#### 5.4. Comparació dels modes d'operació per a la producció d'agarasa

L'estudi en els tres modes d'operació: discontinu, continu i discontinu alimentat ha proporcionat la informació necessària per determinar quina seria la millor estratègia en cada un dels modes d'operació. Així, en els experiments en discontinu es va concloure que la soca deficient en SipY resultava ser més productiva. En els experiments en continu es va veure que la soca salvatge *S. lividans* TK21pAGAs5 es comportava diferent de com s'havia descrit anteriorment i de com es comportava la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  i aquesta última necessitava una concentració de fosfats en excés per tal de ser més productiva. I finalment, de totes les estratègies provades en discontinu alimentat es va poder concloure que la millor era aquella en la qual es realitzava una addició de mannitol puntual que es va efectuar abans que el mannitol fos consumit completament.

El proper pas es determinar quin dels modes d'operació ens dona una major producció i el que dona una major productivitat.

En la Taula 21 es pot observar com en quant a producció el mode més efectiu és el discontinu alimentat. Generalment, per a la producció de proteïnes recombinants és el mode més utilitzat en la indústria. En termes de producció total, el discontinu alimentat té una activitat 1.7 vegades major respecte al discontinu i les cèl·lules d'aquest primer són gairebé el doble més productives

5. Resultats II: Desenvolupament d'una estratègia de producció de proteïnes Tat *Streptomyces lividans*  $\Delta$ sjpYpAGAs5

respecte al segon. No obstant, en termes d'activitat específica per mil·ligram de proteïna, es pot veure com la diferència s'ajusta considerablement. I mentre en el discontinu la producció específica és de  $8.1\text{kU}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteïna}$ , en el discontinu alimentat és de  $9.5\text{kU}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteïna}$ . Cal dir que és major però no en els termes en què supera a l'activitat específica per unitat de biomassa. La causa d'aquesta diferència pot venir donada pel fet que en el cultiu discontinu alimentat les cèl·lules es troben durant més hores en fase de creixement i això pot portar a la secreció de més proteïnes que no siguin la nostra proteïna d'interès i provocar que l'activitat agarasa específica per unitat de proteïna disminueixi.

Taula 21. Resum de les produccions d'agarasa i produccions específiques de biomassa i proteïna total dels tres modes d'operació.

Mode d'operació	Activitat agarasa extracel·lular ( $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Agarasa específica per unitat de biomassa ( $\text{kU}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$ )	Agarasa específica per unitat de proteïna ( $\text{kU}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$ )
Discontinu*	1396±241	411±106	8.1±1.1
Continu amb nivell de fosfats inicial	528±100.2	208±42	3.0±0.7
Discontinu alimentat (addicions de manitol)	2387±61	799±87	9.5±0.4

\*S'ha utilitzat el valor d'activitat calculat de la transformació de les dades.

En quant a termes de productivitat (Taula 22), també cal dir que el millor mode d'operació és el discontinu alimentat. No obstant, les diferències no són tan clares i el continu esdevé una alternativa també factible com a mètode d'operació si s'avalua la productivitat. El fet que sigui un producte extracel·lular fa que l'operació en continu esdevingui atractiva i els resultats en quant a productivitat la postulen com a favorable.

Taula 22. Resum de les productivitats d'agarasa i productivitats específiques de biomassa i proteïna total dels tres modes d'operació.

Mode d'operació	Activitat agarasa extracel·lular ( $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	Agarasa específica per unitat de biomassa ( $\text{kU}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}\cdot\text{h}^{-1}$ )	Agarasa específica per unitat de proteïna ( $\text{kU}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}\cdot\text{h}^{-1}$ )
Discontinu (48h)*	29.1±5.0	8.6±2.2	0.17±0.02
Continu amb nivell de fosfats inicial	42.2±8.0	16.6±3.4	0.24±0.06
Discontinu alimentat (addicions de manitol) 50h	47.7±1.2	16.0±1.7	0.19±0.008

\*S'ha utilitzat el valor d'activitat calculat de la transformació de les dades i el temps contemplat és una mitjana dels temps dels tres processos seleccionats.

### 5.5. Conclusions finals del capítol II

- S'han avaluat alternatives operacionals per a la producció d'agarasa amb la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$ : discontinu, continu i discontinu alimentat. La major productivitat s'obté amb discontinu alimentat amb addicions de mannitol amb  $47.7 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  però també cal destacar l'operació en continu en la qual s'obté una productivitat de  $42.2 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .
- La producció d'agarasa s'atura en tots els cultius degut, probablement, al col·lapse metabòlic de les cèl·lules provocat per l'expressió de la proteïna i l'estrès de secreció.
- Les alternatives estudiades incrementant la concentració de casaminoàcids en el cultiu ja sigui amb addicions o doblant la concentració des d'un inici no han resultat tan eficients.
- S'ha avaluat l'efecte de la disminució i limitació del nivell fosfats en el medi en la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  per a intentar incrementar la secreció de la proteïna d'interès sense cap efecte en quant a producció.
- L'anàlisi per "Western blot" de les mostres ha validat completament la presència d'agarasa en el cultiu. Aquest anàlisi s'ha pogut dur a terme evitant l'etapa de precipitació de proteïnes i és més sensible que l'assaig d'activitat.

5. Resultats II: Desenvolupament d'una estratègia de producció de proteïnes Tat *Streptomyces lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$

---



## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral era estudiar la producció i la secreció d'una proteïna model per tal de després poder aplicar el coneixement adquirit en soques que produïssin una proteïna d'interès industrial. Tal com s'ha explicat en la Introducció, la proteïna escollida va ser una lacasa (EC 1.10.3.2). Aquests enzims són majoritàriament produïts per eucariotes (fongs i plantes) però també s'han descrit en bacteris grampositius i gramnegatius (Moya et al. 2011). Dins de les lacases bacterianes les més estudiades són les de l'ordre dels actinomicetals en la qual està inclòs el gènere *Streptomyces*. Un exemple d'aquest estudi pot ser el de la lacasa de *S. coelicolor* que té una homologia del 99% d'identitat amb la lacasa de *S. lividans* i que va ser caracteritzada per Machczynski et al. (2004).

En aquesta part del treball es proposa sobreexpressar lacasa pròpia de *S. lividans* en la soca de *S. lividans* deficient en la proteïna SipY (Palacín et al. 2002). L'interès d'aquest treball a l'hora de produir aquesta proteïna en la soca SipY<sup>-</sup> és múltiple. Per una banda, cal destacar l'interès industrial que desperta aquest enzim, el qual té aplicacions molt diverses com ara: en la indústria alimentària per a la modificació dels colors i la terbolesa dels aliments i begudes (Zeeb et al. 2014); en la indústria del paper per a la deslignificació de la polpa del paper i per a la producció de noves fibres de fusta; en la indústria tèxtil per a la síntesi de tints i la decoloració de teixits i degradació de residus; en la nanobiotecnologia per al desenvolupament de biosensors per detectar compostos fenòlics, fàrmacs, grups cel·lulars, etc.; però sobretot en la bioremediació per a la degradació d'efluents industrials. Així doncs, el motiu de la tria d'aquest enzim queda justificat per l'enorme aplicació que té aquest enzim. A més a més, s'ha demostrat la lacasa de *S. coelicolor*, a diferència de la majoria de les lacases fúngiques, és capaç de treballar a pHs bàsics i té el seu màxim d'activitat en un pH de 8-9 (Machczynski et al. 2004). La lacasa de *S. lividans* s'espera que tingui aquesta mateixa característica, significativa des del punt de vista de tractament d'aigües residuals i per a la utilització d'aquest enzim en biocatàlisi.

Per altra banda, destacar que de l'estudi amb la proteïna model (agarasa) se n'havien extret varies conclusions però un dels problemes que va sorgir i que va ser limitant en tot moment per a completar l'estudi, va ser degut a la incompatibilitat de l'estudi de creixement i producció d'agarasa amb la utilització de glucosa com a font de carboni. El problema d'utilitzar aquesta font de carboni era que l'assaig d'activitat agarasa es basa en la detecció de sucres reductors produïts per l'acció de l'enzim i la presència de glucosa al medi interferia en les mesures de l'enzim. En canvi, la producció de lacasa i el seu assaig d'activitat no es veu afectat per la presència de glucosa en el medi. Així doncs, es pot completar l'estudi realitzat anteriorment.

En l'estudi de producció d'aquest enzim aprofitant el coneixement adquirit anteriorment, van anar sorgint problemes que van fer que a més a més de completar l'estudi de fonts de carboni i d'operació, també s'estudiés la força del promotor per a la producció d'aquesta proteïna.

En un primer moment, es va clonar l'enzim sota control del seu propi promotor i començant per la soca salvatge ja que així s'havia fet en el cas de l'agarasa. El fet que no s'observés activitat i que el creixement fos limitat ja en la soca salvatge, va fer que es plantegessin dues alternatives:

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

---

la producció sota el control d'un promotor constitutiu fort com pot ser el promotor del gen de resistència a eritromicina (ermE\*p) i la producció sota el control del promotor del gen agarasa (DagAp) que s'havia provat anteriorment i que se sabia que donava una bona resposta en termes de producció. Ambdós constructes es van introduir directament en la soca deficient en SipY ja que es va voler evitar el pas per la soca salvatge. En els tres casos es va mantenir la seqüència líder del propi gen de la lacasa que condueix aquesta proteïna cap a la via de secreció Tat (Machczynski et al. 2004).

### 6.1. Generació de les soques sobreproductores de lacasa de *Streptomyces lividans* TK21

Es va estudiar de forma paral·lela l'efecte que podria comportar la força i els nivells d'expressió de cada un d'aquests promotors sobre el creixement del microorganisme i sobre la producció de la lacasa.

#### 6.1.1. Clonació de la lacasa sota el seu propi promotor (SLI6712p)

La primera fase de la clonació de la lacasa es va dur a terme durant l'estada realitzada al Centro Nacional de Biotecnología del CSIC de Madrid al Departament de Biotecnologia Microbiana. El treball va ser supervisat pel Dr. Rafael Pérez-Mellado, la Dra. Sonia Gullón i es va comptar amb el suport de la Dra. Rebeca López que pertanyen al grup de Expressió gènica i secreció heteròloga en bacteris Gram-positius d'aplicació industrial. Per tal d'alterar el mínim possible l'estabilitat gènica del microorganisme i tal com s'acostumava a fer en la sobreexpressió de gens en *Streptomyces*, en un primer intent de producció d'aquest enzim, es va mantenir tota la seqüència sense cap tipus d'alteració: ni en el promotor ni en la seqüència del pèptid líder.

Per tal d'obtenir el gen de la lacasa (SLI6712) de *S. lividans*, es van dissenyar dos oligonucleòtids a partir de la seqüència de *S. coelicolor* (Bentley et al. 2002) que, com ja s'ha dit, és altament homòloga a la seqüència de *S. lividans* i utilitzant el banc de dades Strep DataBank (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>). Els oligonucleòtids dissenyats i utilitzats per a l'amplificació del gen sencer són LacR\_Fw i LacM\_Rv la seqüència dels quals és detallada a l'apartat de Materials i Mètodes així com les condicions de l'amplificació per PCR. El gen va ser amplificat a partir de mostres de material genòmic de *S. lividans* i clonat a un plasmidi pGEM-T Easy el qual va ser introduït a *E. coli* DH5 $\alpha$  (dades no mostrades). L'amplificació del gen i la comprovació de la introducció de l'insert així com de la correcta seqüència amplificada va ser dut a terme per la Dra. Rebeca López Vicente prèviament a la meua estada en el laboratori del CNS-CSIC.

El resultat donava lloc a una seqüència amplificada de 1434 parells de bases que es detalla a la Figura 39.

```
CTTTTCTTCTCGCGCTCAACCTCTTAAGGGCATGGGCACCTCTCGGTACGGCAGCAGCGCCAAGGAAGCTAGACCTTTTGCGCGGTAC
GCCAATAGGTATGACCGCAATCGAACGAACTTTGTCTGAGTGTGGATAAACACGGCGGCAACCGGTACGGTCCACAGGCTCATCACAG
CAAATCAGGTCTGGGTCTGCGCACATTCCGTATCGGCGTGGGGAGTTCGGCATGGACAGGCGAGGCTTTAACCGACGGGTACTGCTGG
GCGGGCGGGCCGCGCAGCATCGTTGTCCATCGTCCGGAGGTGCGGGGCGCCGCCCGCGGCAAGGGGATCACCGGAGGACGGC
ACCGGCCGGGGGCGAGGTGAGACCTCAAGATGTACGCCGAGAAGCTGGCGGACGGTCAAGATGGGCTACGGCTTCGAGAAGGGCAA
GGCGTGGTCCCGGCCGCTGATCGAGGTCAACGAGGGCGACACGCTGCATATCGAGTTCACCAACACGATGGACGTGCGGGCCAGC
CTGCACGTGCACGGCCTGGACTACGAGATCTCCAGCGACGGTACCGGATGAACAAGAGCGACGTCGAGCCCGGCGGACCCCGCACCT
ACACCTGGCGCACCCACAAACCGGGCCGCGCAGCAGCGCACCTGGCGGGCAGCGCGGGTACTGGCACTACCACGACCCAGT
CGTCGGCACCGAACACGGCACCGGAGGCATCCGCAACGGCCTGTACGGCCGGTGTATCGTGCGCCGCAAGGGGGACGTGCTGCCGGAC
GCCACGCACACGATCGTCTTCAACGACATGACCATCAACAACCGCAAGCCGCACACCGGCCCGACTTCGAGGCCACCGTGGGGCAGCCG
CGTGGAGATCGTATGATCACGCACGGGGAGTACTACCACACCTTCCACATGCACGGTACCGCTGGGGCGGACAACCGGACCGGCATCC
TCACGGGCCCGGACGACCCGTCCCGGGTATCGACAACAAGATCACCGGCCGGCGACTCCTTCGGCTTCAGATCATCGCGGGGGAG
GGGGTGGGCGCGGGGCGTGGATGTACCACTGCCACGTCCAGAGCCACTCCGACATGGGCATGGTGGGGCTGTTCTTGGTGAAGAAGC
CGGACGGCACGATCCCGGGTACGAACCGCACGAGCACGGCGGGGCGACCGCAAGAGCGGGCGAGAGCGGGGAGCCGACGGGGCGGG
GCGGGCCGCACGAAACAGGACTGAGCCGGGGCCGGCCGGCGCCACCGGGCCCGCGGTACGTGCGTGACCGTTCTTCTGT
ACATACGCCCATGCTGACGACCGCACCCGCCGCGCACAAAGAACGTTTTTCGGTCCCGGAGCGCCCTCCCGCGCGCGGCTGCCGCTA
TCCTGAGCCGCGAGT
```

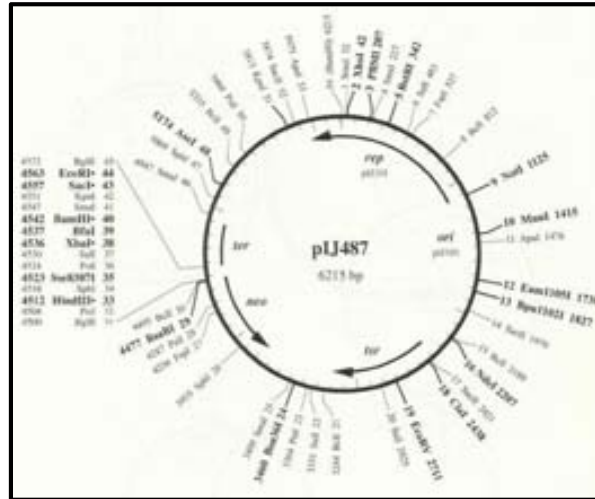
Figura 39. Seqüència amplificada del gen complet de la lacasa de *Streptomyces lividans*. En blau se senyalitza el gen lacasa (des del codó d'inici al codó stop) i en grana la possible regió promotora.

L'estratègia seguida a l'hora de clonar aquest gen complet en un plasmidi va ser doble: per una banda es va intentar clonar al plasmidi utilitzat fins aquell moment, el plasmidi pIJ487 i per altra banda, Al plasmidi pFD666 que té com a avantatge respecte al primer que té l'origen de replicació d'*E. coli* i, per tant, tot el procés de manipulació genètica es pot realitzar en aquest altre microorganisme per després transformar el constructe a *S. lividans*.

#### 6.1.1.1. Clonació de la lacasa sota el seu propi promotor utilitzant pIJ487

El plasmidi pIJ487 (Figura 40) és el vector multicòpia més utilitzat en *Streptomyces* i conté el gen *neo* sense promotor (que confereix resistència a kanamicina) just després del lloc de clonatge múltiple. També conté el gen *tsr* (que confereix resistència a thiostrepton) que servirà com a mètode de selecció. L'inconvenient més destacat de la utilització d'aquest plasmidi per a la clonació de la lacasa en *S. lividans* és que no té origen de replicació d'*E. coli* i, per tant, tota la manipulació genètica s'ha de realitzar directament en *S. lividans*. La complicació ve donada pels baixos rendiments de les extraccions de material plasmídic en *Streptomyces*. És, doncs, més complicat obtenir resultats positius si s'utilitza aquest vector. No obstant, a partir d'extraccions plasmídiques cedides pel grup del CNB es va realitzar la clonació de l'amplicó detallat a la Figura 39. Com ja s'ha dit, aquesta seqüència va ser amplificada a partir dels oligonucleòtids LacR\_Fw i LacR\_Rv que introdueixen a l'amplicó les dianes de restricció BamHI i HindIII als extrems 5' i 3' respectivament. Així, realitzant la digestió enzimàtica del plasmidi pIJ487 amb aquests dos enzims, quedaran una seqüència lineal amb extrems cohesius per a aquestes dues dianes de restricció que seran lligades amb l'insert prèviament amplificat per PCR amb els oligonucleòtids esmentats i digerit pels dos mateixos enzims: BamHI i HindIII.

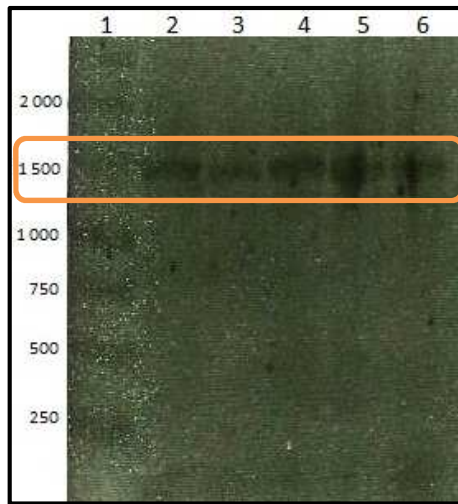
## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*



**Figura 40.** Mapa plasmídic de pIJ487: utilitzat en un primer moment per a la clonació de la lacasa sota control del seu propi promotor.

El resultat de la lligació va ser introduït a protoplasts de *S. lividans* TK21 sense una prèvia comprovació de la lligació degut al poc material genètic del qual es disposava. La transformació dels protoplasts es va dur a terme tal com s'indica a l'apartat Materials i Mètodes. De les colònies que es van obtenir se'n van seleccionar 4, les quals es van cultivar en medi sòlid R5 en dues condicions: plaques amb R5 en presència de thiostrepton ( $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) i paral·lelament plaques amb R5 en presència de thiostrepton ( $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) i kanamicina ( $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Dels creixements en medi sòlid se'n van fer dues passades més de selecció: novament en medi sòlid en les dues condicions i per altra banda es van fer créixer en medi líquid YEME suplementat amb thiostrepton amb una concentració final de  $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Del creixement en medi líquid se'n va fer l'extracció plasmídica i una posterior digestió amb els mateixos enzims de restricció utilitzats per a la clonació. El resultat va ser un gel molt poc nítid degut a la brutícia acumulada de l'extracció plasmídica (dades no mostrades).

Per aquest motiu es va procedir a la comprovació per PCR. L'objectiu era veure si en les mostres de les extraccions plasmídiques l'amplificació era major que en el control. Les mostres a analitzar eren les extraccions plasmídiques dels quatre clons obtinguts i el control una mostra de DNA genòmic de *S. lividans* TK21. És important remarcar que en el genoma del microorganisme hi ha una còpia d'aquest gen, per tant, sense aquest control no es podria saber si les amplificacions de les extraccions plasmídiques eren degudes a la presència del plasmidi o bé a la presència del gen provinent de restes de material genòmic en les mostres. Així doncs, s'esperava observar una diferència considerable entre les amplificacions de les mostres en comparació amb el control de material genòmic. El resultat es mostra en la Figura 41 en el qual es pot observar que aquest resultat no era conclouent. La diferència entre la intensitat de banda de l'amplificació per PCR del control amb material genòmic en comparació amb les quatre bandes que corresponien a l'amplificació del material de l'extracció plasmídica no era directament observable. Això va fer que no es pogués concloure amb total seguretat que el plasmidi contenia l'insert malgrat prèviament havia crescut en medi en presència de kanamicina.

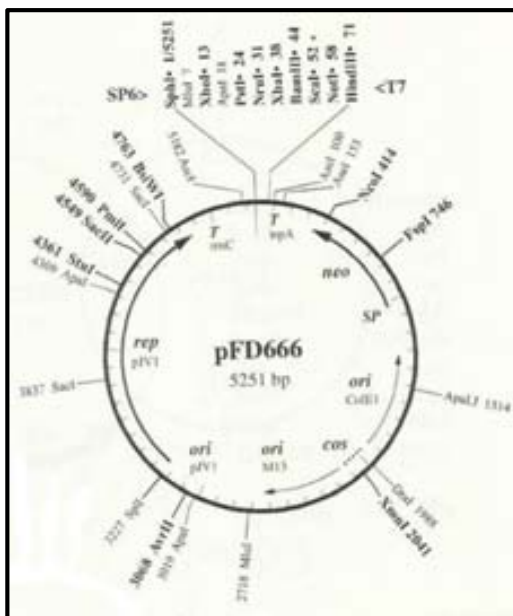


**Figura 41. Comprovació per PCR de la clonació de la lacasa en el plasmidi pIJ487.** Per ordre de carrils: marcador (carril 1), control amb DNA genòmic (carril 2), extracció plasmídica dels 4 clons positius (carrils 3, 4, 5 i 6). Es va fer un control negatiu que va confirmar que no hi havia contaminacions (no mostrat).

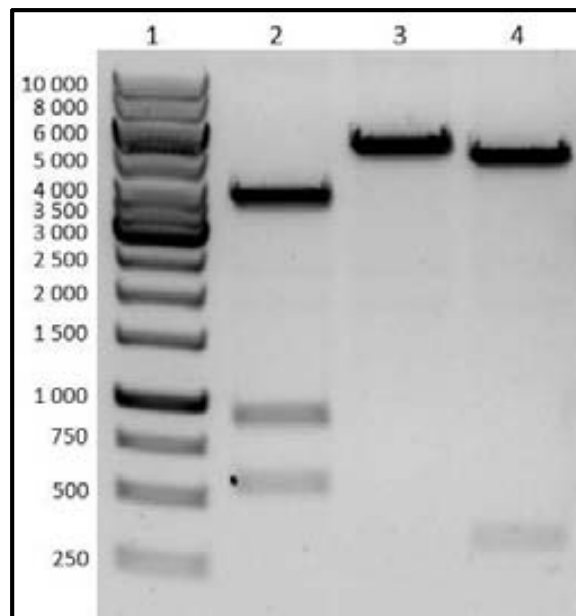
6.1.1.2. Clonació de la lacasa sota el seu propi promotor utilitzant pFD666

Les dificultats per a assegurar un correcte clonatge amb pIJ487 van provocar que paral·lelament s'iniciés el clonatge de la lacasa amb el seu propi promotor en el plasmidi pFD666 (Figura 42A). Aquest plasmidi, com ja s'ha dit, té com a avantatge que la seva seqüència conté un origen de replicació per a *E. coli* de manera que tota la manipulació genètica es pot dur a terme en aquest microorganisme.

A)



B)

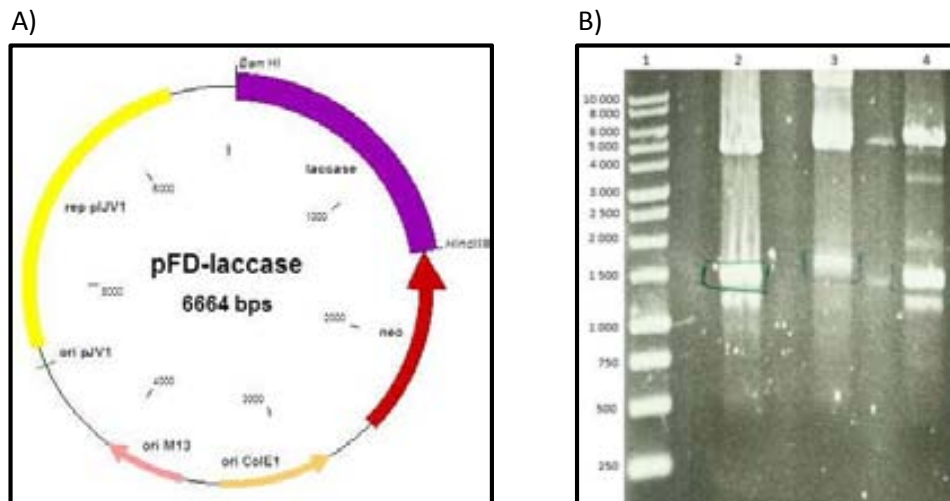


**Figura 42. Plasmidi utilitzat per a *Streptomyces*, pFD666.** A) Mapa plasmídic del plasmidi pFD666. B) Comprovació per restricció del plasmidi pFD666 amb els enzims de restricció. Els carrils corresponen a: marcador de pes molecular (carril 1), digestió plasmidi pFD666 amb NotI i SacI que dona lloc a fragments de 569bp, 900bp i 3782bp (carril 2), digestió amb NotI que dona un fragment de 5251bp (carril 3) i digestió amb NcoI i HindIII que dona dos fragments de 343bp i 4908bp (carril 4).

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

El gen es va obtenir de la mateixa manera descrita en l'apartat anterior. El plasmidi va ser obtingut de l'extracció plasmídica de *E. coli* XL1-Blue que contenia aquest plasmidi pFD666 sense insert. L'extracció plasmídica va ser comprovada mitjançant una triple restricció amb diverses combinacions d'enzims. Els enzims utilitzats van ser NotI, SacI, NcoI i HindIII. La primera digestió es va dur a terme amb NotI i SacI que dona lloc a tres fragments de 569bp, 900bp i 3782bp les bandes dels quals es poden observar al carril 2 de la Figura 42B. La segona restricció va ser realitzada amb NotI donant lloc a un sol fragment de 5251bp (carril 3 de la mateixa figura). I finalment la digestió amb NcoI i HindIII dona lloc a dos fragments de 343bp i 4908bp i que es poden visualitzar en el carril 4 de la Figura 42B.

Un cop comprovat el plasmidi, es va procedir a iniciar el procés de clonatge de la lacasa utilitzant els enzims de restricció BamHI i HindIII tan per l'insert com pel plasmidi per a la digestió tal com s'indica a Materials i Mètodes i posteriorment es va dur a terme la lligació durant tota la nit a 4°C. El resultat de la lligació és el plasmidi que s'anomenarà pFD-lacasa (Figura 43A).



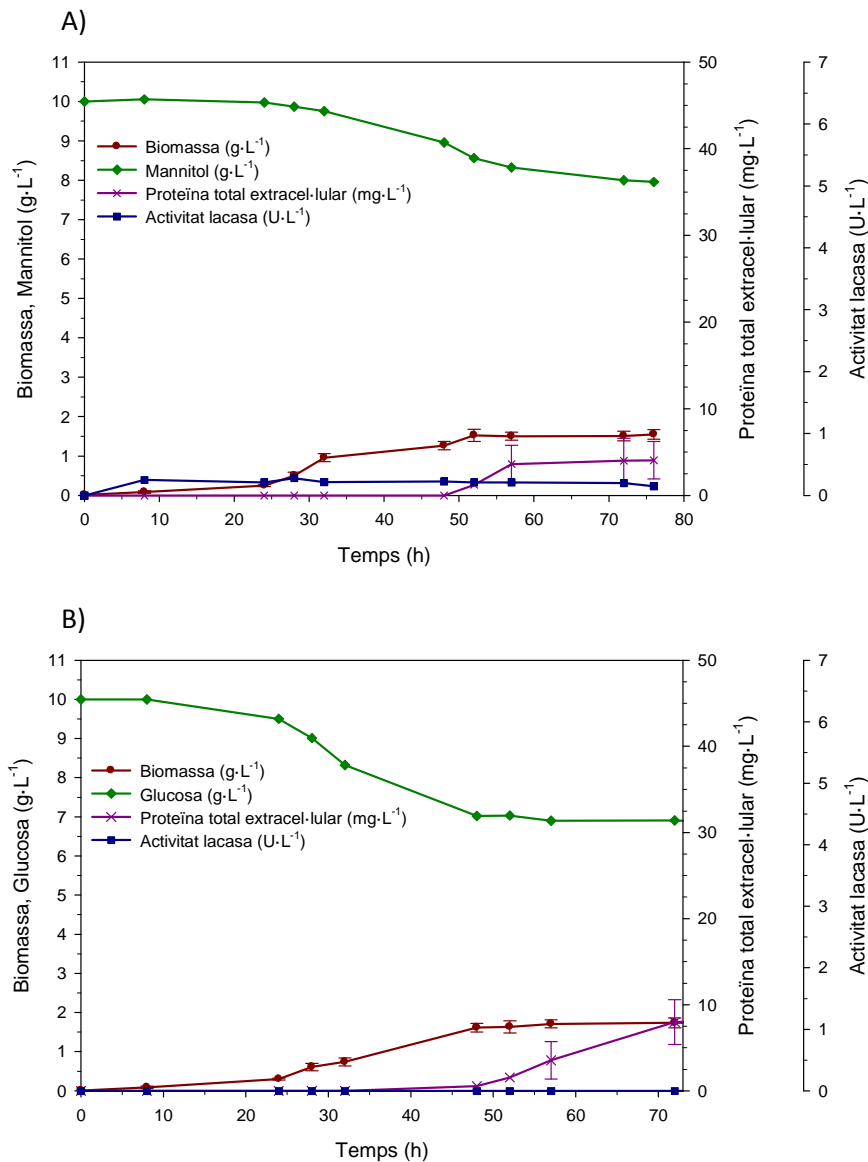
**Figura 43. Generació del plasmidi de sobreproducció de la lacasa sota el control del seu propi promotor.** A: Representació del plasmidi pFD-laccase per a la construcció de la soca productora de lacasa sota el control del seu propi promotor. B: Anàlisi per restricció d'un dels clons obtinguts. Per ordre d'esquerre a dreta hi ha: el marcador de pes molecular (carril 1), clon 1 (carril 2), clon 2 (carril 3) i clon 3 (carril 4).

La transformació a cèl·lules competents d'*E. coli* XLI-Blue es va dur a terme per xoc tèrmic i es van sembrar en plaques de LB amb kanamicina a 37°C durant tota la nit. D'aquestes plaques se'n van obtenir només 3 colònies que anomenarem *E. coli* pFD-laccase de les quals es va fer un cultiu líquid per a l'extracció plasmídica. El resultat d'aquesta extracció i de la posterior restricció amb BamHI i HindIII per a comprovar la presència de plasmidi i l'insert es presenta en la Figura 43B. Com es pot observar, aquest gel realitzat al CNB no és nítid degut a una probable activitat estrella de l'enzim BamHI. No obstant, a l'altura de les 1500 parells de bases s'observa clarament una banda que correspon a l'insert lacasa.

Posteriorment es procedeix a la transformació en protoplasts de *S. lividans* TK21 mitjançant la tècnica explicada a Materials i Mètodes. L'observació de creixement en plaques en medi MS en presència d'antibiòtic (kanamicina) ja era indicatiu d'una correcta transformació ja que el plasmidi s'havia comprovat prèviament en *E. coli* pFD-lacasa. Per tant, havent acabat aquest procés ja es disposava d'una primera soca de *S. lividans* pFD-lacasa.

### 6.2. Anàlisi de creixement i producció de la soca *S. lividans* TK21 pFD-lacasa

El creixement de la soca *S. lividans* TK21pFD-lacasa va ser estudiat en matrassos Erlenmeyer i en bioreactor. Es va escollir la colònia número 1 de les 7 colònies obtingudes en la transformació ja que era la que presentava un millor creixement en medi sòlid R5 i en medi líquid NMMP. No obstant, en el creixement en Erlenmeyer utilitzant el medi NMMP no s'hi observava activitat. Degut a això es va pensar que potser hi havia problemes de transferència d'oxigen i per aquest motiu es va passar a realitzar un creixement en discontinu en bioreactor. Les condicions estan detallades a Materials i Mètodes.



**Figura 44. Creixement de la soca productora sota el control del seu propi promotor en medi NMMP. A:** Creixement de la soca *S. lividans* TK21pFD-lacasa en mannitol. **B:** Creixement de la soca *S. lividans* TK21pFD-lacasa en glucosa.

En la Figura 44 es presenta el creixement d'aquesta soca en medi NMMP utilitzant mannitol com a font de carboni. El comportament en mannitol va ser molt semblant al que va tenir en glucosa com es pot apreciar a les Figura 44A i Figura 44B. En un determinat punt s'aturava el creixement i la producció de l'enzim era indetectable.

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

---

Com es pot apreciar en els creixements representats, la biomassa màxima que es va assolir en el cas del creixement en mannitol era de  $1.55 \pm 0.124 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  i es va consumir un total de  $2 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de mannitol. Per altra banda, quan es va utilitzar glucosa com a font de carboni es va arribar fins a les  $1.73 \pm 0.205 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  i es va consumir  $3.1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de glucosa. Els nivells màxims de proteïna que es van poder assolir també diferien lleugerament ja que en el cas del mannitol es van detectar  $4.1 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de proteïna total extracel·lular mentre que en el cas de la glucosa es van detectar  $8.1 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Les desviacions estàndard són en ambdós casos molt altes degut a la proximitat d'aquests valors al límit de detecció de l'assaig de quantificació de proteïna total.

L'activitat lacasa només va ser detectada en el cas de la utilització de mannitol que al final del cultiu era de  $0.2 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$  a les 72 hores. El càlcul de l'activitat específica per unitat de biomassa era de  $0.13 \text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{DCW}$  i l'activitat específica per unitat de proteïna total va resultar ser  $0.05 \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteïna. En el cas de la utilització de la glucosa no es va detectar activitat en cap de les mostres assajades.

Aquests valors són molt inferiors als que es podrien esperar degut a l'absència pràctica d'activitat lacasa i és a partir d'aquest moment que es plantegen diverses alternatives per tal d'intentar incrementar la producció.

La primera alternativa es va plantejar quan es van analitzar les proteases d'ambdós cultius. Quan es va analitzar la presència de proteases extracel·lulars en ambdós cultius, tot i que no eren molt elevats, eren molt més alts que els analitzats en la producció d'agarasa. Per tant, s'espera que la transformació a la soca *S. lividans*  $\Delta sipY$  tingui un efecte favorable.

En segon lloc, la parada del creixement abans d'esgotar la font de carboni també conduïa a pensar que hi havia una limitació d'algun component en el medi.

Malgrat tot això, el poc creixement, la presència gairebé nul·la de lacasa i la nul·la producció de proteïna en medi ric va fer pensar que el problema potser estava en el propi gen. La desconeixença de la naturalesa del promotor de la lacasa va conduir a la hipòtesi que un dels problemes també fos la força relativa d'aquest promotor. Per aquest motiu, es van proposar dos nous constructes en què el gen de la lacasa estava regulat o bé pel promotor del gen de resistència a eritromicina es coneix que és constitutiu fort i per altra banda el promotor de l'agarasa que se sabia que donava lloc a bons resultats comprovats en els primers capítols d'aquest treball i no afectava al creixement del microorganisme.

### 6.3. Promotors alternatius per a la producció de lacasa en *S. lividans*

Com a alternativa per expressar lacasa es proposa el clonatge del gen sota el control de dos promotors:  $\text{ErmE}^*p$  i  $\text{DagAp}$ .

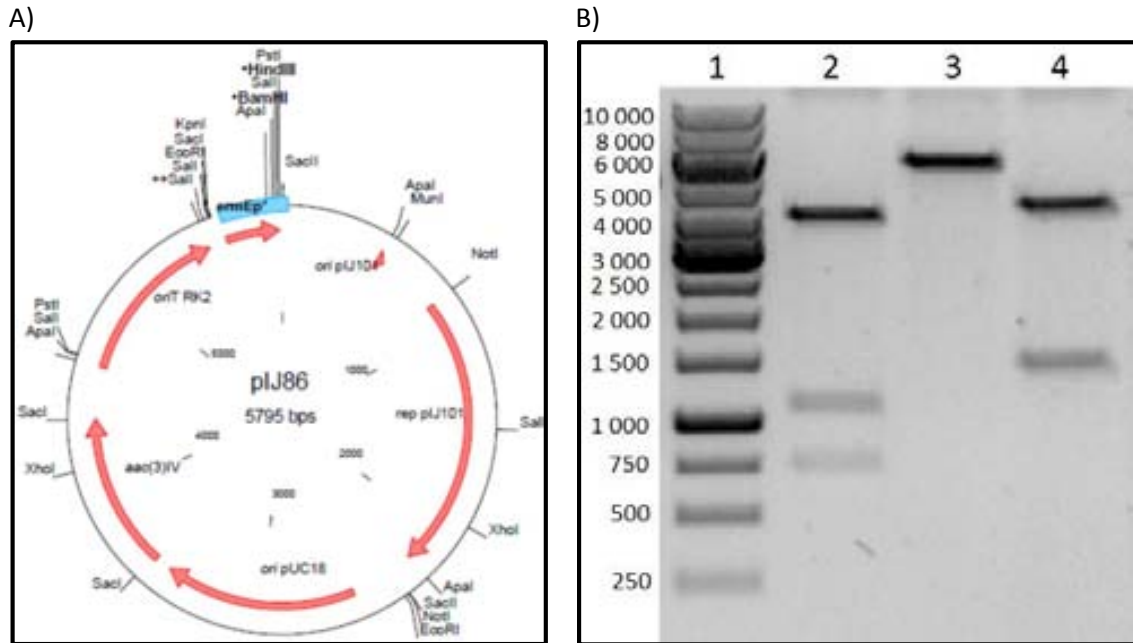
#### 6.3.1. Clonació de la lacasa sota el promotor del gen de resistència a eritromicina

La clonació de la lacasa sota el control del promotor del gen de resistència a eritromicina ( $\text{ermE}^*p$ ) es va dur a terme a partir del plasmidi pIJ86 (Figura 45A) cedit pel Professor Mervyn Bibb del Departament de Microbiologia Molecular del John Innes Centre a Norwich (Regne Unit). En l'estudi dut a terme per Bibb et al. (1985) es descriu la naturalesa d'aquesta regió  $\text{ermE}p$  que



## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

contenia dos promotors ermEp(2) i ermEp(1) que diferien entre ells segons la proximitat amb l'origen de traducció. En l'estudi d'expressió d'aquest gen en diferents bacteris grampositius es va veure que la seva expressió era induïble a nivell traduccional degut a la presència de l'antibiòtic (Dubnau 1984). No obstant, l'expressió en *Streptomyces* és constitutiva ja que no es van observar diferències a nivell de mRNA en el creixement de *S. erythraeus* en presència o absència de l'antibiòtic. I per altra banda, *S. lividans* presentava un fenotip constitutivament resistent a eritromicina quan el gen complet *ermE* era sobreexpressat (Bibb et al. 1985).



**Figura 45. Plasmidi utilitzat per a *Streptomyces*, pIJ86.** A) Mapa plasmídic del plasmidi pIJ86. B) Comprovació per restriccions del plasmidi pIJ86 amb enzims de restricció. Els carrils corresponen a: marcador de pes molecular (carril 1), digestió del plasmidi pIJ86 amb *SacI* que dona lloc a fragments de 751bp, 1132bp i 3912bp (carril 2), digestió amb *BamHI* que dona un fragment de 5795bp (carril 3) i digestió amb *NotI* que dona fragments de 1478bp i 4317bp (carril 4).

El plasmidi que s'utilitzarà conté la regió promotora *ermEp\** flanquejada per zones de restricció múltiple i el gen de resistència a l'antibiòtic apramicina (Figura 45A). La naturalesa d'aquest plasmidi va ser comprovada mitjançant una triple restricció amb 3 enzims diferents: *SacI*, *BamHI* i *NotI*. L'enzim de restricció *SacI* dona lloc a tres fragments de diferent tamany: 751bp, 1132bp i 3912bp les bandes dels quals es poden observar en el carril 2 de la Figura 45B. La restricció per *BamHI* és única donant lloc a un fragment igual a la mida total del plasmidi, 5795bp i que es pot observar al carril 3 de la mateixa figura. I finalment, la restricció amb *NotI* dona lloc a dos fragments de 1478bp i 4317bp les bandes dels quals s'observen al carril 4 de la mateixa Figura 45B.

Havent comprovat els llocs de restricció es va procedir al clonatge del gen sense el promotor. Per fer-ho es va amplificar aquest gen amb els oligonucleòtids *LacM\_Fw* i *LacR\_Rv*. L'oligonucleòtid *LacM\_Fw* introdueix la diana de restricció de *BamHI* i comença a amplificar el gen a partir del primer nucleòtid que serà traduït. Per tant, l'amplificació amb aquests dos oligonucleòtids tindrà com a resultat un fragment de DNA més curt, de 1206 parells de bases. La restricció de l'amplicó i dels plasmidi amb els enzims *BamHI* i *HindIII* i la posterior lligació amb

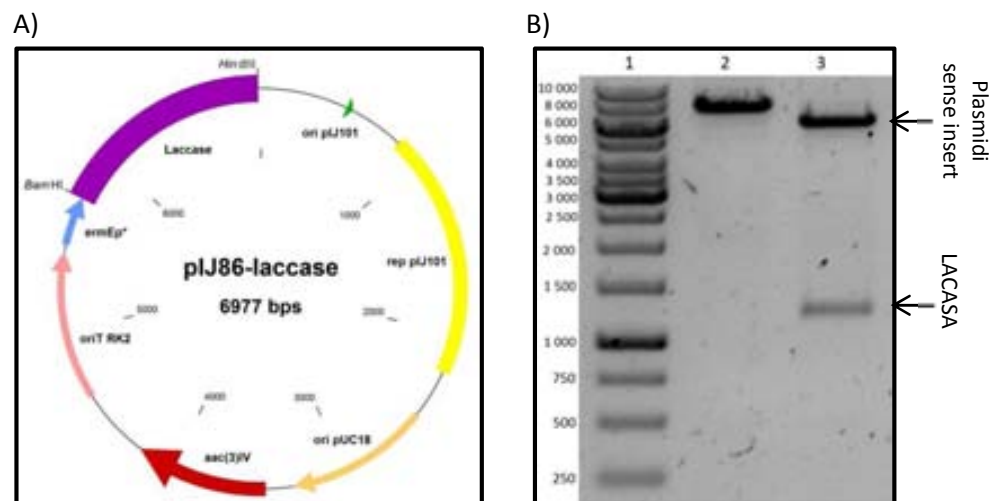
## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

l'enzim lligasa donarà lloc al constructe d'interès, el pIJ86-lacasa que queda esquematitzat en la Figura 46A.

El nou constructe va ser transformat en cèl·lules competents d'*E. coli* DH5 $\alpha$  per electroporació i sembrant les cèl·lules transformades en medi LB en presència d'apramicina per tal de seleccionar les colònies amb plasmidi. La nova soca es va anomenar *E. coli* pIJ-lacasa. De les colònies obtingudes se'n van realitzar cultius líquids per a fer una extracció plasmídica i posteriorment dues noves restriccions: una d'elles amb BamHI i l'altra una restricció doble amb BamHI i HindIII. El resultat es mostra en la Figura 46B. Es pot observar que en el carril 2 en el qual s'ha realitzat la restricció simple amb BamHI el tamany del plasmidi està al voltant dels 7 000 parells de bases mentre que en el carril 3, on hi ha la restricció doble, s'observen dues bandes, una d'elles al voltant dels 6 000 parells de bases i l'altra banda es troba entre els 1 000 i els 1 500 parells de bases que correspon al fragment de la lacasa que és de 1206 parells de bases. Aquest constructe va ser seqüenciat per tal de comprovar la seva veracitat i correcta seqüència.

La transformació a *S. lividans* va ser directament a la soca deficient en SipY. Per tant, es van fer protoplasts de *S. lividans*  $\Delta sipY$  i després de la incubació durant 24h en medi ric sòlid amb thiostrepton, l'*overlay* es va realitzar amb medi SNA i apramicina per tal de seleccionar les soques que contien el plasmidi prèviament comprovat en *E. coli*. Les soques obtingudes van ser ressebrades tres vegades consecutives en medi sòlid en presència dels dos antibiòtics per tal d'assegurar la presència del plasmidi. La nova soca s'anomenarà *S. lividans*  $\Delta sipY$  (pIJ-lacasa).

Un cop fet això, els creixements en medi líquid van ser satisfactoris quan aquest era medi complex però, en canvi, s'observaven molts problemes de creixement quan s'utilitzava el medi NMMP. En apartats posteriors s'analitzaran aquests fets.



**Figura 46. Generació del plasmidi de sobreproducció de lacasa sota el control del promotor de l'agarasa. A:** Representació del plasmidi pIJ86-laccase per a la construcció de la soca productora de lacasa sota el control del promotor del gen de resistència a eritromicina. **B:** Anàlisi per restricció d'un dels clons obtinguts. Per ordre d'esquerre a dreta hi ha: el marcador de pes molecular (carril 1), plasmidi digerit amb BamHI (carril 2) i el resultat de la restricció doble amb BamHI i HindIII (carril 3) en que s'observa una banda al voltant de 6000pb i una altra d'uns 1200pb.

### 6.3.2. Clonació de la lacasa sota el promotor de l'agarasa

L'última estratègia seguida va ser aquella en la qual el gen de la lacasa es va clonar contiguament al promotor de l'agarasa. Aquesta estratègia venia donada per l'èxitosa experiència anterior de la producció de l'agarasa sota el seu propi promotor. Donat que es tractava de dues proteïnes Tat i sabent que l'agarasa tenia una producció acceptable, es va construir el mateix sistema d'expressió però amb el plasmidi pFD666.

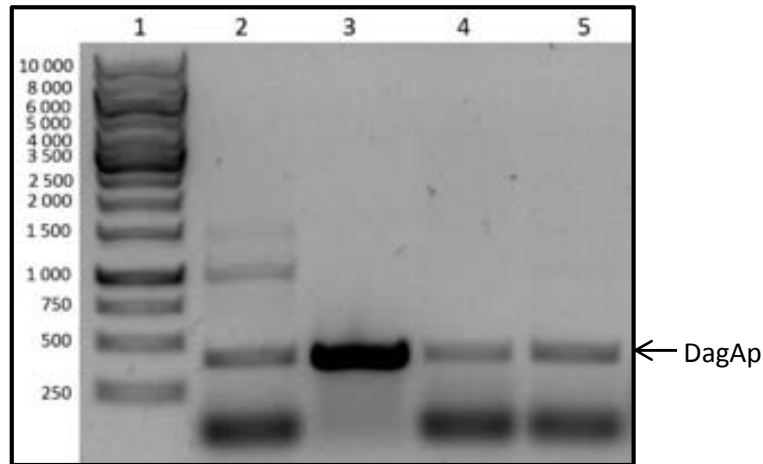
Per tal d'obtenir el fragment del promotor del gen de l'agarasa es van dissenyar els oligonucleòtids DagAp\_Fw i DagAp\_Rv (Taula 8, Materials i mètodes) en base a la seqüència *upstream* de la seqüència coneguda del gen *dagA* de *Streptomyces coelicolor* (SCO3471, gen que es troba entre la base 3831705 i la 3832624) per a poder amplificar per PCR el fragment corresponent al promotor. La informació de la seqüència *upstream* del gen va ser extreta del banc de dades Strep DataBank (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>). En la bibliografia s'havia descrit que aquest gen estava regulat per almenys 4 promotors en els quals es podien unir fins a tres i probablement quatre holoenzims de la RNA polimerasa que contenien cada una un factor  $\sigma$  diferent (Servín-González et al. 1994). En aquest mateix estudi dut a terme per Servín-González et al. (1994) es va demostrar l'existència d'aquests quatre promotors diverses metodologies: mapeig per S1 nucleasa (S1 nuclease mapping), anàlisi de transcripció *in vitro* (in vitro transcription analysis), estudis de transcripció *in vitro* d'encebadors dinucleòtids (dinucleotide-primed in vitro transcription studies) i experiments de sondeig de promotor (promoter-probing experiments). Posteriorment, Parro V. et al. (1993) va descriure una possible cinquena regió promotora (Parro V. Et al. 1993) d'aquest gen. La regió promotora amplificada de 389pb conté les cinc possibles regions promotores (Figura 47).

```
GCACTGCAGGGCTTGATGAATCGTGACCGGGCGGACGGGGCGAGTGACCGAGGTCGCCGCTGGATCACAGTCGGG
CACGGCACGAAATCTGGGAAC TACTGCAGCCGTACCGATTGTCACCCCTGCGACACTCCGCTGTAGCATTGGGA
AACCGGTTACCTCATGAATGATCAGGCGAGCGAAAGCCAGAACTTACCTCCTGGAGCCTAGCTCCTCCTGC
GCCGTGGAATGATCGTGCCACGTGGCGTTCCGGAAC TTTTGCACGCACGCGAGCTCTCGAATTTTGGCGCCCA
GGGTCTGCGGAAGTCATTGCCAAATATAAGATTCTTCAGCCAGGCGGGAATCGAAGAAGGAGAACGATCGTGGTCA
ACCGACGTGATCTCATCAAGTGGGATCCGCG
```

**Figura 47. Amplicó generat amb els oligonucleòtids DagAp\_Fw i DagAp\_Rv.** En lila se senyalitzen les dianes de restricció per a la posterior clonació, en verd la seqüència utilitzada per al disseny dels oligonucleòtids, en grana la seqüència que conté les 5 possibles regions promotores (subratllades) i en blau l'inici de transcripció del gen.

El fragment total amplificat corresponia a un número total de 402pb utilitzant com a motlle el DNA plasmídic que provenia del plasmidi pAGAs5. El fragment va ser clonat al vector pFD666 utilitzant els enzims de restricció PstI i BamHI. Dels 4 clons provats, se selecciona el que es pot visualitzar en el carril 3 de la Figura 48. Com es pot veure en el gel de DNA, va donar una intensitat de banda que feia pensar que seria un clon positiu pel què fa a la presència de l'insert.

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

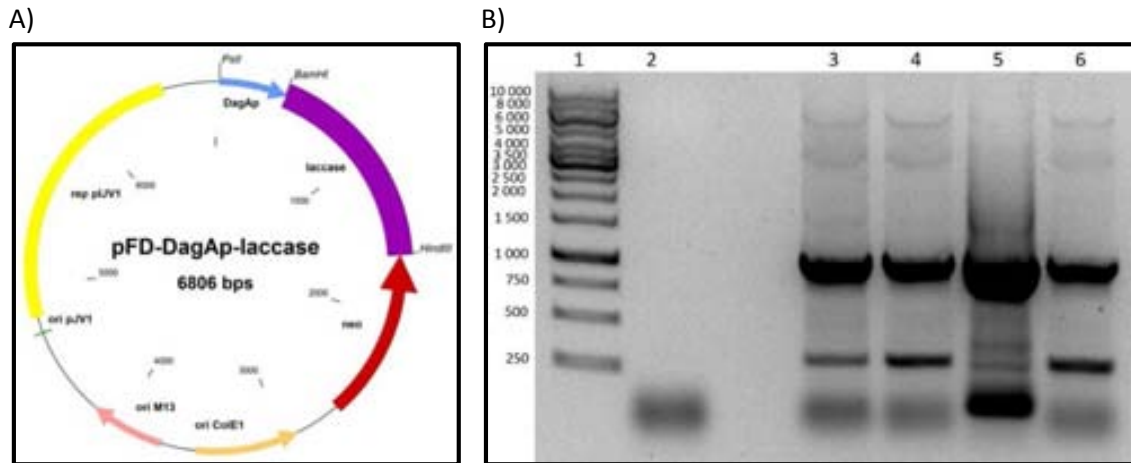


**Figura 48. Comprovació per PCR colonial de la clonació de DagAp.** Presentació del gel d'electroforesi de DNA en el qual hi ha el marcador (carril 1) i el resultat de les PCR colonials dels clons 5 (carril 2), clon 16 (carril 3), clon M (carril 4) i clon R (carril 5).

Un cop comprovada la lligació per PCR i per digestió enzimàtica amb els enzims PstI i BamHI es va procedir a clonar la lacasa contiguament al promotor DagAp utilitzant la diana BamHI i HindIII. La lacasa va ser obtinguda per amplificació per PCR utilitzant els oligos LacM-Fw i LacR-Rv tal com s'havia fet el cas de la clonació a pIJ86. L'amplicó resultant té com a inici el primer nucleòtid que es traduirà i acaba 120pb més tard del final de la seqüència traduïda assegurant que s'inclourà la seqüència terminadora del propi gen. Així doncs, el constructe inclourà promotor del gen de l'agarasa, la seqüència codificant del gen de la lacasa i 120pb addicionals. El clonatge es va dur a terme tal com s'ha descrit anteriorment.

La lligació del plasmidi amb l'insert es va transformar a una *E. coli* DH5 $\alpha$  i el resultat de l'electroporació es va sembrar en plaques de medi LB i kanamicina per tal de seleccionar les soques que contenen el plasmidi nou construït que es va anomenar pFD-DagAp-lacasa (Figura 49A). De les colònies que van créixer se'n van seleccionar varies i se'n van fer PCR colonial utilitzant els plasmidis LacM-Fw i LacM-Rv que amplifiquen una seqüència de DNA sense les últimes 120pb addicionals de manera que l'amplicó final té 1032pb. En la Figura 49B es pot observar com de les 4 colònies analitzades, la que té una amplificació més clara és la del carril 5. Es per això que d'aquesta colònia se'n va fer cultiu líquid i es va comprovar també per restricció enzimàtica i per seqüenciació. Respecte a la seqüència de *S. lividans* l'única variació s'observa a la base número 18 que en el cas del gen amplificat té una T enlloc de la C original. Això és degut a què el disseny dels oligonucleòtids per a la PCR van ser dissenyats a partir de la seqüència de *S. coelicolor* ja que la seqüència de *S. lividans* encara no havia estat totalment comprovada. Aquest canvi en aquest nucleòtid inicial no comportarà canvis en la seqüència aminoacídica (els triplets TTC i TTT donen lloc ambdós a la fenilalanina).

A continuació es procedeix a la transformació d'aquest constructe a protoplasts de la soca deficient en SipY de *S. lividans* tal com s'indica a la secció de Materials i Mètodes. La selecció de les colònies transformades es fa amb la presència dels antibiòtics thiostrepton i kanamicina. Així se seleccionen els clons que creixen en plaques en ambdós antibiòtics i es realitzen tres ressembres per tal d'assegurar el fenotip resistent als dos antibiòtics i, per tant, la presència del plasmidi. La nova soca s'anomenarà *S. lividans*  $\Delta$ sipYpFD-DagAp-lacasa.



**Figura 49. Generació del plasmidi de sobreproducció de la lacasa sota el control del promotor de l'agarasa. A:** Representació del plasmidi pFD-DagAp-laccase per a la construcció de la soca productora de lacasa sota el control del promotor de l'agarasa. **B:** Anàlisi per PCR colonial d'alguns dels clons obtinguts. Per ordre d'esquerre a dreta hi ha: el marcador de pes molecular (carril 1), control negatiu per a determinar possibles contaminacions (carril 2), i els resultats de les PCR colonials diferents clons: clon 26 (carril 3), clon 35 (carril 4), clon 3 (carril 5) i clon 14 (carril 6).

#### 6.4. Redisseny i modificació del medi NMMP per als creixements en Erlenmeyer i bioreactor per a la producció de lacasa

Les colònies obtingudes van ser ressemerades tres vegades en medi R5 sòlid suplementat amb els antibiòtics corresponents per assegurar la presència del plasmidi. El següent pas va ser adaptar les noves soques construïdes al medi líquid.

En medi ric R5 van créixer les tres soques (*S. lividans* TK21pFD-laccase, *S. lividans*  $\Delta$ sipYpIJ-laccase i *S. lividans*  $\Delta$ sipYpFD-DagAp-laccase) però no hi havia producció en cap d'elles (els resultats es mostren més endavant). En canvi, el creixement en medi NMMP va donar lloc a més inconvenients. En el cas de la soca *S. lividans*  $\Delta$ sipYpIJ-laccase, el creixement era inexistent. La biomassa inicial inoculada a partir del cultiu provinent del medi ric era igual a la biomassa final.

Pel què fa a la soca *S. lividans*  $\Delta$ sipYpFD-DagAp-laccase, aquesta sí que presentava creixement però en la primera etapa de l'adaptació del creixement d'aquestes soques al medi NMMP, el creixement es donava amb pèl·lets molt grans provocant que no fos possible realitzar el seguiment per pes sec ja que no era possible tenir mostres homogènies. Els pèl·lets i la seva grandària es poden observar en la Figura 50.

Durant la fase d'adaptació al creixement en medi líquid de les soques construïdes es va estudiar la possibilitat que hi hagués la necessitat d'afegir algun component del medi per tal de millorar el creixement i la producció.

La principal font de nitrogen en el medi utilitzat NMMP són els casaminoàcids que és una barreja d'aminoàcids i petits pèptids obtinguts de la hidròlisi de la caseïna. Aquest hidrolitzat conté tots els aminoàcids menys el triptòfan que queda degradat durant la hidròlisi de la proteïna amb àcid sulfúric o àcid clorhídric. Per aquest motiu el primer aminoàcid amb el que es decideix suplementar el medi de cultiu és el triptòfan per tal de complementar aquesta

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

deficiència i facilitar el creixement del microorganisme evitant que hagi de ser sintetitzat de *novo*.

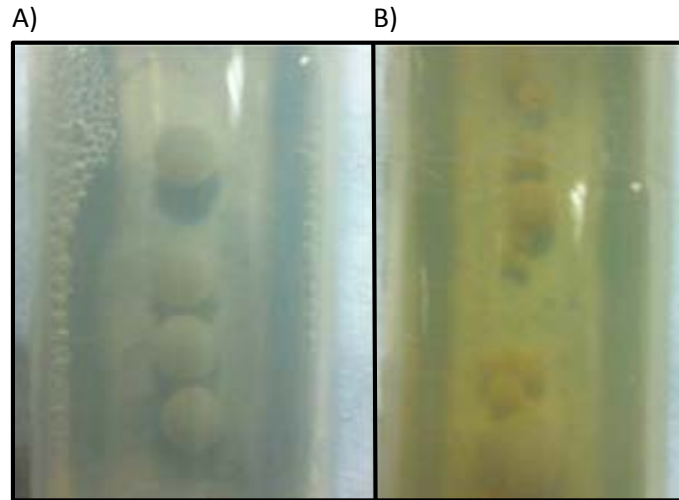


Figura 50. Pèl·lets de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagAp-lacasa$  en medi NMMP. A: Medi NMMP amb mannitol com a font de carboni. B: Medi NMMP amb glucosa.

Per altra banda es va analitzar la seqüència de la proteïna que es vol produir (Figura 51) per tal de veure si a part del triptòfan hi havia algun altre aminoàcid que fos limitant o estigués en baixa concentració. Es va poder determinar el percentatge de cadascun dels aminoàcids presents en la proteïna (Taula 23) i es va determinar que l'aminoàcid que predominava era la glicina.

La composició dels casaminoàcids s'ha detallat en algun estudi (Nolan 1971; D'Huys et al. 2011) tot i que aquesta és sensiblement variable entre lot i lot. No obstant, el contingut en glicina és baix. Per aquest motiu també es va decidir suplementar el medi de cultiu amb glicina.

La concentració a la qual es va suplementar els dos aminoàcids va ser un consens de les concentracions trobades a la bibliografia i es va fixar a 5mM.

```
MDRRGFNRRVLLGGAAAATSLSI APEVAGAAPA AKGITARTAPAGGEVRHLKMYAEKLADGQMGYGF E
KGKASVPGPLIEVNEGDTLHIEFTNTMDVRASLHVHGLDYEI SSDGTAMNKSDVEPGGTRTYTWRTHK
PGRRDDGTWRPGSAGYWHYHDHVVGTEHGTGGIRNGLYGPVIVRRKGDVLPDATH TIVFNDMTINNRK
PHTGPDFEATVGD RVEIVMITHGEYYHTFHMHGHRWADNRTGIL TGPDDPSRVIDNKITGPADSFQ
I IAGEGVGAGAWMYHCHVQSHSDMGMVGLFLVKKPDGTIPGYEPHEHGGATAKSGESGEPTGGAAAHE
HEH
```

Figura 51. Seqüència d'aminoàcids de la pre-proteïna lacasa extreta del NCBI.

Taula 23. Anàlisi de la composició aminoacídica de la proteïna lacasa de *Streptomyces*. Dades obtingudes amb l'eina ProtParam de l'ExpASy.

Aminoàcid	Nomenclatura	Número d'aminoàcids	Percentatge
Alanina	A	31	9%
Arginina	R	20	5.8%
Asparagina	N	10	2.9%
Aspartat	D	22	6.4%
Cisteïna	C	1	0.3%
Glutamina	Q	3	0.9%
Glutamat	E	20	5.8%
Glicina	G	50	14.6%
Histidina	H	24	7%
Isoleucina	I	17	5%
Leucina	L	14	4.1%
Lisina	K	13	3.8%
Metionina	M	11	3.2%
Fenilalanina	F	9	2.6%
Prolina	P	19	5.5%
Serina	S	14	4.1%
Treonina	T	27	7.9%
Triptòfan	W	5	1.5%
Tirosina	Y	11	3.2%
Valina	V	22	6.4%

Per altra banda, també es va suplementar el medi amb sulfat de coure ja que les lacases necessiten coure per ser activament catalítiques (Claus 2004). Per això es va suplementar el medi de cultiu NMMP amb 5µM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O.

Es va poder demostrar observar qualitativament que les soques creixen en Erlenmeyer amb aquesta modificació en el medi i es va passar a bioreactor. L'objectiu d'aquesta sèrie d'experiments és estudiar la producció de la lacasa tenint tots els paràmetres controlats tals com el pO<sub>2</sub>, pH, agitació, concentració de substrat, etc.

### 6.5. Expressió de la proteïna lacasa i estudi de producció en dues fonts de carboni

En aquest primer estudi es van realitzar els cultius en discontinu de la soca control *S. lividans* ΔsipY i de les dues soques construïdes productores de lacasa: *S. lividans* ΔsipYpFD-DagAp-lacasa i *S. lividans* ΔsipYpIJ-lacasa. Els cultius de les tres soques es van fer en mannitol i en glucosa. Tot i que estudis anteriors havien determinat que la utilització de glucosa comportava un augment de la degradació de la proteïna a nivell intracel·lular (Parro & Mellado 1994), l'estudi en la soca deficient en SipY resultava interessant degut al seu fenotip. A més a més cal destacar també la compatibilitat entre la utilització de la glucosa, amb el seguiment de la producció de la proteïna lacasa mitjançant el seu assaig d'activitat.

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

### 6.5.1. Estudi del creixement i producció de la lacasa en dues fonts de carboni i expressant el gen sota el promotor del gen de resistència a eritromicina

Els clons obtinguts de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpIJ$ -lacasa que contenia el gen de la lacasa clonat contiguament al promotor del gen de resistència a l'antibiòtic eritromicina van ser adaptats al medi líquid. Per fer-ho es van fer sèries de creixements en Erlenmeyer en medi ric R5 o bé en medi semicomplex NMMP suplementat. La soca va ser capaç de créixer mínimament en medi ric però no s'observava creixement en el medi NMMP suplementat.

Per tal de descartar que el poc creixement es devia d'una limitació d'oxigen o a l'efecte del pH, es va procedir a realitzar un cultiu en discontinu en reactor on els paràmetres tals com el pH, el  $pO_2$ , l'agitació són controlats. Es van fer dos cultius en discontinu: utilitzant com a font de carboni el mannitol o bé utilitzant la glucosa. Es volia veure si hi havia un comportament diferent en aquestes dues fonts de carboni. La falta de creixement en Erlenmeyer va provocar que s'hagués de preparar un volum molt gran per a aconseguir la suficient biomassa per a inocular el reactor. Per això es van fer créixer 4 Erlenmeyers d'1L de capacitat amb un volum de cultiu de 250mL de medi NMMP suplementat per a garantir que es començava amb un inòcul equivalent als cultius realitzats fins a aquell moment.

El comportament en ambdues fonts de carboni va ser similar en termes de creixement. Per tal de posar un exemple, en la Figura 52 es presenta el creixement en medi NMMP suplementat utilitzant la glucosa com a font principal de carboni. Es pot observar que pràcticament no es va consumir aquesta font de carboni i que no hi va haver pràcticament creixement. Tot i haver suplementat el medi amb glicina i triptòfan i sulfat de coure, es creu que hi devia haver alguna altra deficiència per a aquesta soca o bé que la forta expressió del gen donava lloc a un col·lapse metabòlic que donava lloc a molt poc creixement. Caldrien més estudis per tal de determinar quina és la causa de la ineficàcia d'aquesta soca per a créixer i produir.

Els mals resultats en discontinu van fer que ja es descartés aquesta soca com a possible candidata a obtenir una major producció de lacasa de *S. lividans*.

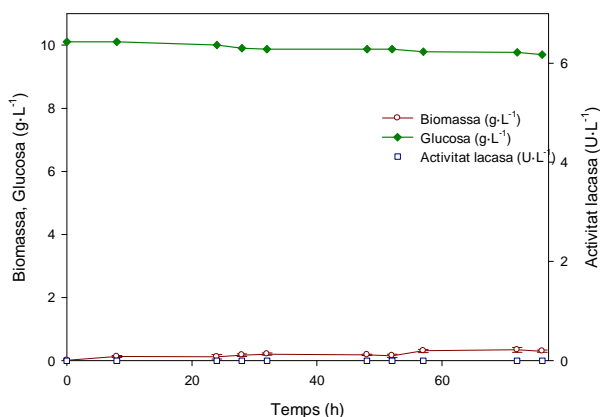


Figura 52. Cultiu en discontinu en bioreactor utilitzant glucosa com a font de carboni de la soca productora *S. lividans*  $\Delta sipYpIJ$ -lacase.



6.5.2. Estudi del creixement i producció de lacasa en dues fonts de carboni i expressant el gen sota el promotor de l'agarasa

Els cultius presentats en aquest apartat s'engloben dins l'estudi de producció de la lacasa sota control del promotor del gen agarasa. Es presenten dos apartats que difereixen en la font de carboni utilitzada: mannitol o glucosa.

6.5.2.1. Cultiu en discontinu utilitzant mannitol

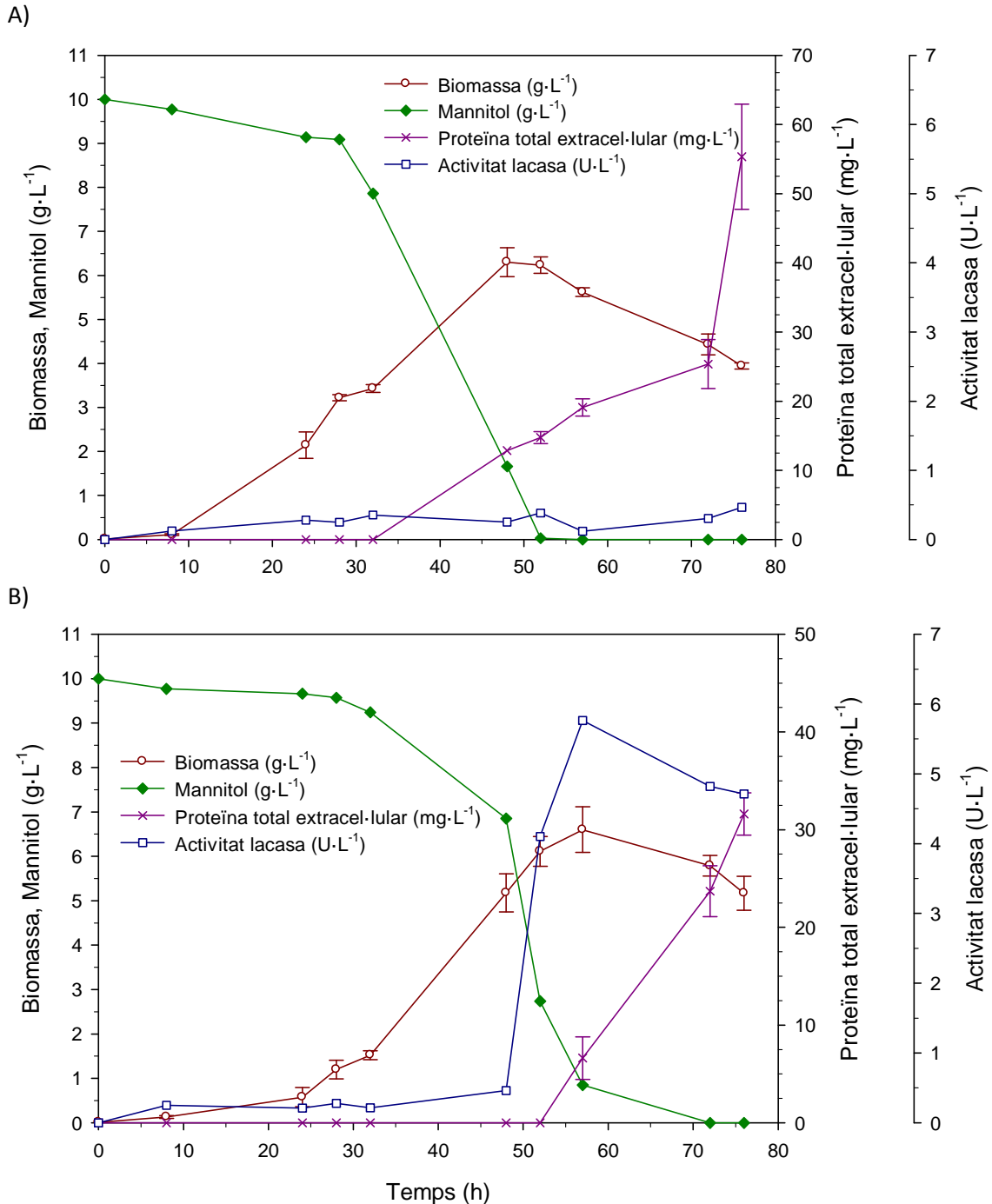
Els creixements de les soques *S. lividans*  $\Delta sipY$  i *S. lividans*  $\Delta sipYpFD$ -DagAp-laccase es presenten en la Figura 53. La soca control (Figura 53A) va tenir un creixement més directe, sense fase de latència, en canvi la soca productora (Figura 53B) no va començar a créixer fins a les 24h on es començava a veure un creixement exponencial. El cultiu de la soca control va arribar a un màxim de biomassa a les 48h, mentre que la soca productora no va arribar al seu màxim de biomassa fins una mica abans de les 60h. Ambdós moments coincidien amb l'acabament del mannitol com a font de carboni i era a partir d'aquell moment que el cultiu començava a lisar. La velocitat específica de creixement també era similar en el cultiu de la soca control que en la fase exponencial era de  $0.10h^{-1}$  mentre que la soca productora assolía un valor de  $0.09h^{-1}$ .

Pel què fa al perfil de la proteïna total detectada al medi extracel·lular hi havia diferències entre els cultius. En la soca control, a partir de les 48h, quan el creixement es va aturar, ja s'observava una quantitat de proteïna extracel·lular al medi de cultiu igual a  $12.9mg \cdot mL^{-1}$  i augmentava fins a  $25.4mg \cdot mL^{-1}$  a les 72h i finalment en les últimes quatre hores de cultiu la quantitat de proteïna extracel·lular es doblava fins a  $55.4mg \cdot mL^{-1}$ . En canvi, en la soca productora *S. lividans*  $\Delta sipYpFD$ -DagAp-laccase, no es detectava proteïna en el medi fins a les 57h amb una quantitat de  $6.6mg \cdot mL^{-1}$  i aquesta va anar augmentant fins al final on hi havia  $31.6mg \cdot mL^{-1}$  de proteïna total al medi de cultiu. Cal dir que en aquesta última mesura el cultiu ja s'havia donat la lisi cel·lular.

És evident i ja s'ha demostrat àmpliament que quan la font de carboni s'esgota el cultiu tendeix a lisar. No obstant, es creu que en la soca productora el moment d'esgotament de la font de carboni coincideixen dos fenòmens: l'alliberació de la proteïna provinent de la lisi cel·lular amb la secreció de la proteïna d'interès que té un pèptid líder que la condueix per la via Tat de secreció.

Pel què respecte a la producció de l'enzim d'interès cal denotar que hi va haver una clara diferència entre la soca control i la soca productora podent afirmar contundentment que s'havia aconseguit produir lacasa en bioreactor utilitzant el mannitol com a font de carboni i produint l'enzim sota control del promotor estudiat del gen de l'agarasa. A més a més, observant el perfil de producció de la Figura 53B es pot veure que el patró de secreció correspon a una proteïna de tipus Tat ja que es va secretar en la fase tardana del cultiu i pràcticament quan el creixement ja s'havia aturat. L'activitat enzimàtica es va començar a detectar clarament a les 52h amb  $4.1U \cdot L^{-1}$  i va augmentar hores després fins a  $5.8U \cdot L^{-1}$ , però posteriorment l'activitat de lacasa al medi extracel·lular disminueix.

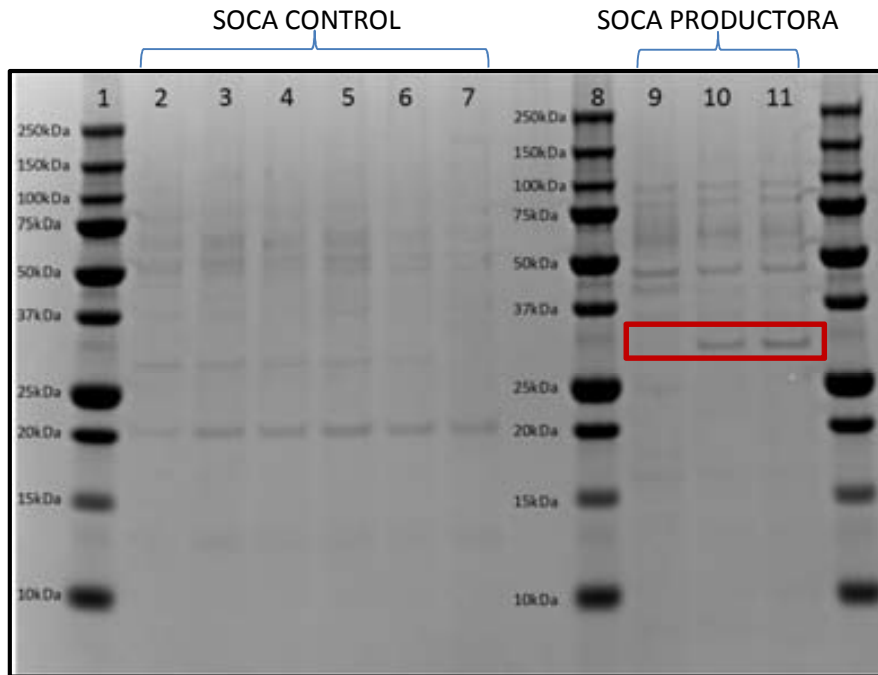
6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*



**Figura 53. Cultius en discontinu en bioreactor utilitzant mannitol com a font de carboni. A:** Creixement de la soca control *S. lividans* ΔsipY en mannitol. **B:** Creixement de la soca productora *S. lividans* ΔsipYpFD-DagAp-laccase en mannitol.

Seguidament es va voler comprovar si aquest perfil d'activitat era equivalent a la visualització de la banda per electroforesi desnaturalitzant (Figura 54). Es va observar que al final del creixement de la soca productora, en les dues últimes mostres que corresponien als temps de 72h i 76h, s'observava clarament una banda creixent que corresponia a la massa molecular de la lacasa (32kDa). En la quantificació de les bandes es va poder veure com la banda

va resultar ser un 15.3% del total a les 72h. Això implicaria que del total de proteïnes a l'exterior cel·lular ( $23.7\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $3.6\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  són lacasa.

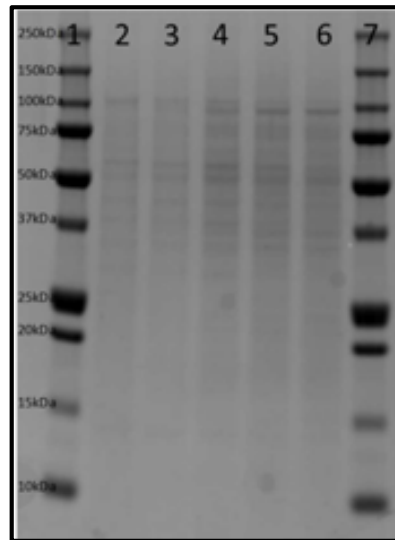


**Figura 54. Electroforesi de proteïnes dels cultius de la *S. lividans*  $\Delta sipY$  i la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagAp-laccase$ .** Els carrils 1 i 8 són el marcador de pes molecular i els carrils de 2-7 corresponen a les mostres del cultiu control: 33h (carril 2), 48h (carril 3), 52h (carril 4), 57h (carril 5), 72h (carril 6) i 76h (carril 7). I els carrils 9-11 corresponen a les mostres del cultiu de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagAp-laccase$ : 57h (carril 9), 72h (carril 10) i 76h (carril 11). En un requadre vermell s'ha assenyalat la banda que correspon al pes molecular de la lacasa (32kDa).

A més a més, per tal de determinar si la lacasa s'acumulava dins les cèl·lules i si aquesta lacasa era activa en l'interior cel·lular, es va procedir a lisar aquestes cèl·lules tal com s'indica en l'apartat de Materials i Mètodes i es van analitzar els lisats on hi quedava el contingut cel·lular. Es va determinar l'activitat lacasa que va donar uns resultats d'entre  $0-1\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$  i es va realitzar un anàlisi d'electroforesi SDS-PAGE (Figura 55). Es va poder observar que no hi havia cap banda que correspongués a la preproteïna de la lacasa o almenys no destaca per sobre de la resta de proteïnes intracel·lulars.

Així doncs, aquesta soca creix més dificultosament i també té una secreció menor respecte a la soca productora d'agarasa. En el cas de l'agarasa, la velocitat específica de creixement era de  $0.14\text{h}^{-1}$  i la proteïna extracel·lular a final del discontinu era de  $176\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  mentre que aquí la velocitat és de  $0.09\text{h}^{-1}$  i la proteïna final secretada és de  $55\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*



**Figura 55. Electroforesi de proteïnes del contingut intracel·lular del cultiu de *S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagAp-laccase$ .** Els carrils 1 i 7 són el marcador de pes molecular i els carrils de 2-6 corresponen a les mostres del cultiu control: 48h (carril 2), 52h (carril 3), 57h (carril 4), 72h (carril 5), 76h (carril 6).

### 6.5.2.2. *Cultiu en discontinu utilitzant glucosa*

Per continuar amb l'estudi plantejat es va realitzar el creixement de les dues soques (*S. lividans*  $\Delta sipY$  i *S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagAp-laccase$ ) amb les quals s'està treballant però utilitzant una font de carboni convencional com és la glucosa. L'evolució dels cultius es presenten en les figures següents (Figura 56A i Figura 56B).

En cas d'utilitzar la glucosa com a font de carboni el comportament en termes de creixement és, en general, semblant al cas del manitol. El creixement de la soca control es dona de forma més directa i sense tanta fase de latència. Per altra banda, el creixement és clarament exponencial fins a les 30h i a partir d'aquest moment i fins a les 48h creix més lentament. És en aquest moment quan s'acaba la font de carboni. Acabada la glucosa, sembla que el cultiu comença a utilitzar els casaminoàcids restants en el medi per a incrementar la biomassa  $1.1g \cdot L^{-1}$  més. Aquest increment final coincideix amb un augment considerable de la quantitat de proteïna total alliberada al medi. Això pot ser degut a la combinació de la lisi cel·lular donada per l'esgotament de la font de carboni principal i la secreció de proteïnes que pot realitzar aquesta soca malgrat les dificultats que té per dur a terme el procés de secreció.

Per altra banda, el creixement de la soca productora té una fase de latència més gran. L'increment de biomassa es dona fins a les 57h tot i que la font de carboni s'hagi acabat de consumir abans de les 48h. L'increment de biomassa un cop finalitzada la font de carboni és de  $1.7g \cdot L^{-1}$  és a dir, encara major que en el cas de la soca control. No és fins a les últimes 12h de cultiu en les que s'observa lisi cel·lular. En ambdós casos la velocitat específica de creixement és molt similar en la fase exponencial ja que és de  $0.14h^{-1}$  en la soca control *S. lividans*  $\Delta sipY$  i de  $0.15h^{-1}$  en la soca productora *S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagAp-laccase$ .

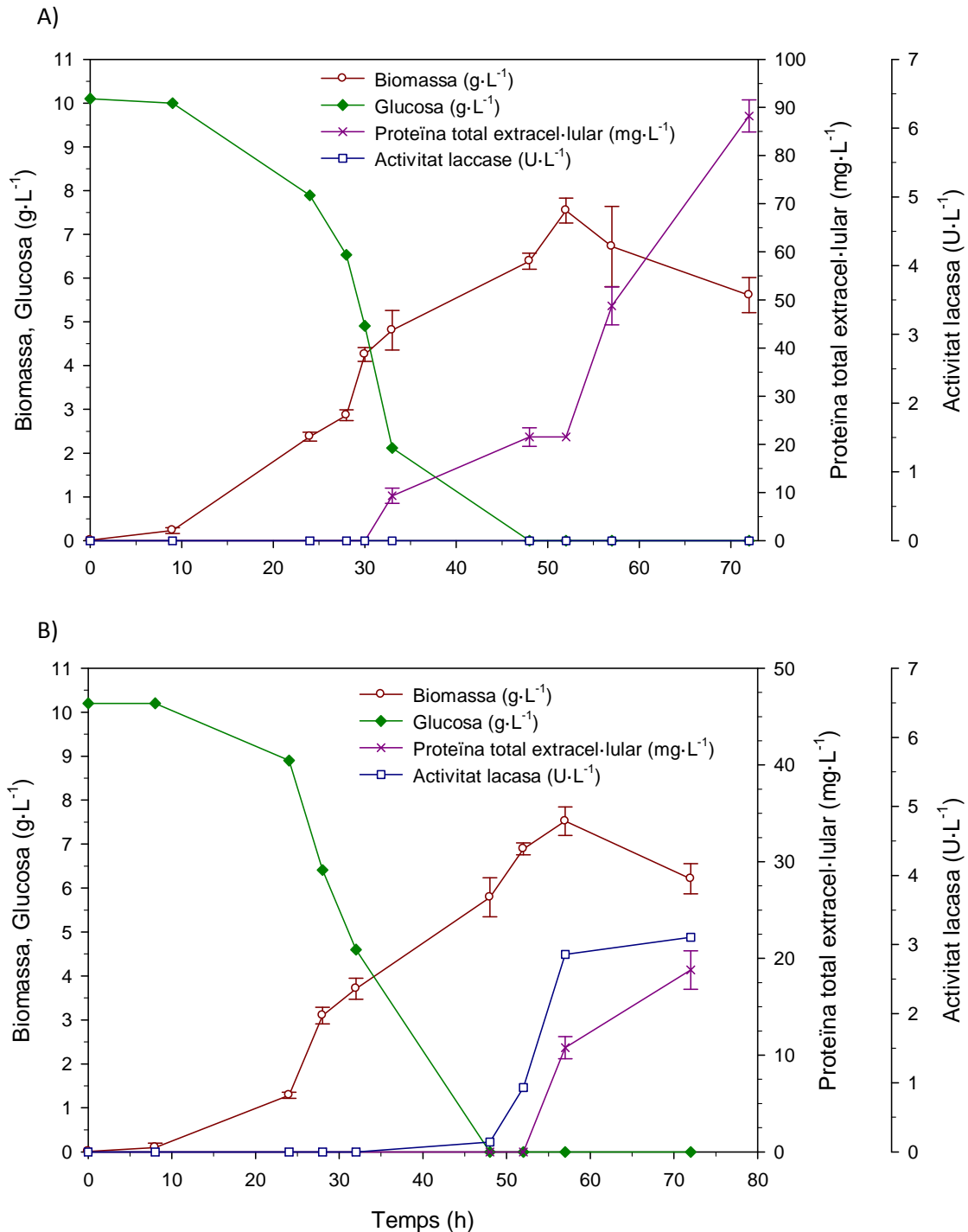


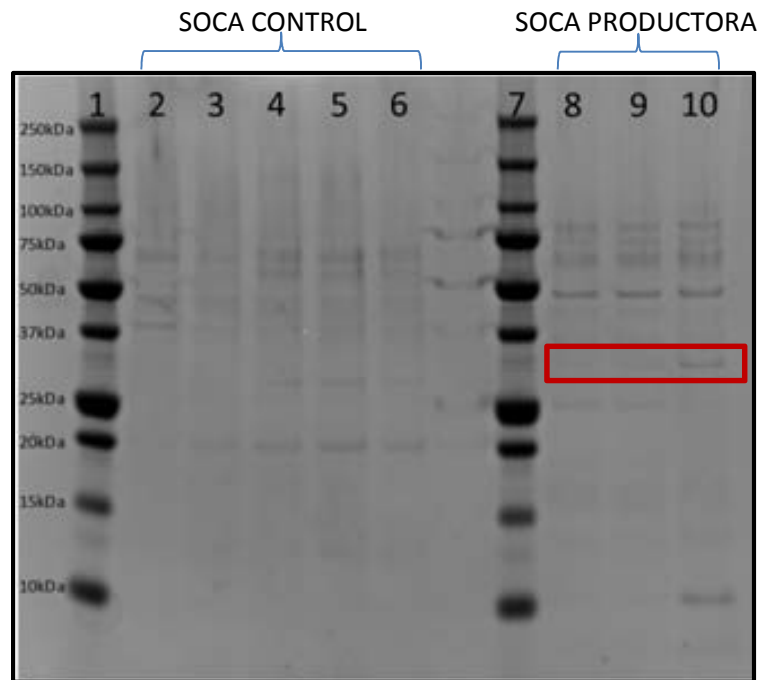
Figura 56. Cultius en discontinu en bioreactor utilitzant glucosa com a font de carboni. A: Creixement de la soca control *S. lividans*  $\Delta sipY$ . B: Creixement de la soca productora *S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagAp-laccase$ .

Respecte a la proteïna secretada a l'exterior cel·lular els patrons de les dues soques difereixen considerablement. Començant per la soca control, es comença a detectar proteïna a l'exterior cel·lular a les 33h de cultiu, quan la font de carboni encara no s'ha esgotat i augmenta progressivament fins a les 52h. A partir d'aquest moment, la quantitat de proteïna detectada a l'exterior cel·lular es dispara fins al final del cultiu, moment en el qual haurà arribat als  $88mg \cdot L^{-1}$ . Per altra banda, l'alliberació de proteïna al medi per part de la soca productora *S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagAp-laccase$  no es dona fins a fases molt avançades del procés. No és fins a les 57h

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

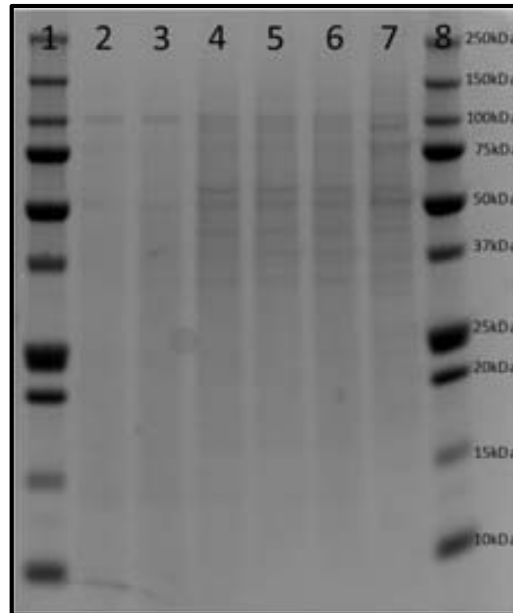
que es detecta proteïna a l'exterior cel·lular moment que concorda amb l'aparició d'activitat lacasa però aquestes quantitat són inferiors a les quantitats alliberades per a la soca control i fins i tot a les quantitats alliberades en els creixements en mannitol.

La producció de lacasa amb la utilització de glucosa com a font de carboni també ha quedat demostrada en aquest cas veient que es detecta activitat lacasa en les mostres finals del discontinu dut a terme. Aquesta lacasa també es va poder visualitzar en l'electroforesi desnaturalitzant que es mostra a la Figura 57.



**Figura 57. Electroforesi de proteïnes dels cultius de la *S. lividans*  $\Delta sipY$  i la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagAp-laccase$  en glucosa.** Els carrils 1 i 7 són el marcador de pes molecular i els carrils de 2-6 corresponen a les mostres del cultiu control: 32h (carril 2), 48h (carril 3), 52h (carril 4), 57h (carril 5) i 72h (carril 6). I els carrils 8-10 corresponen a les mostres del cultiu de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagAp-laccase$ : 52h (carril 8), 57h (carril 9) i 72h (carril 10). En un requadre vermell s'ha assenyalat la banda que correspon al pes molecular de la lacasa (32kDa).

Tal com també s'havia fet anteriorment es va mirar si hi havia lacasa intracel·lular mitjançant l'anàlisi d'activitat dels lisats cel·lular. El resultat de les activitats, de la mateixa manera que va passar en el cas dels cultius en mannitol, es trobava entre  $0.3-0.8U \cdot L^{-1}$ . En l'anàlisi d'aquests lisats cel·lulars per electroforesi tampoc es va observar que la banda de la pre-proteïna lacasa destaqués per sobre de la resta de proteïnes intracel·lulars (Figura 58).



**Figura 58. Electroforesi de proteïnes del contingut intracel·lular del cultiu de *S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagAp-laccase$  en glucosa.** Els carrils 1 i 8 són el marcador de pes molecular i els carrils de 2-7 corresponen a les mostres del cultiu control: 28h (carril 2), 32h (carril 3), 48h (carril 4), 52h (carril 5), 57h (carril 6) i 72h (carril 7).

### 6.6. Comparació de producció dels cultius

La comparació en termes de producció i productivitat és necessària per tal de extreure conclusions sobre quina és la millor font de carboni i el millor mode d'operació per dur a terme el procés.

#### 6.6.1. Comparativa dels cultius en discontinu

Per tal de realitzar la comparativa dels processos en discontinu es van calcular paràmetres com són l'activitat específica per gram de biomassa, l'activitat específica per mil·ligram de proteïna i l'activitat específica de lacasa.

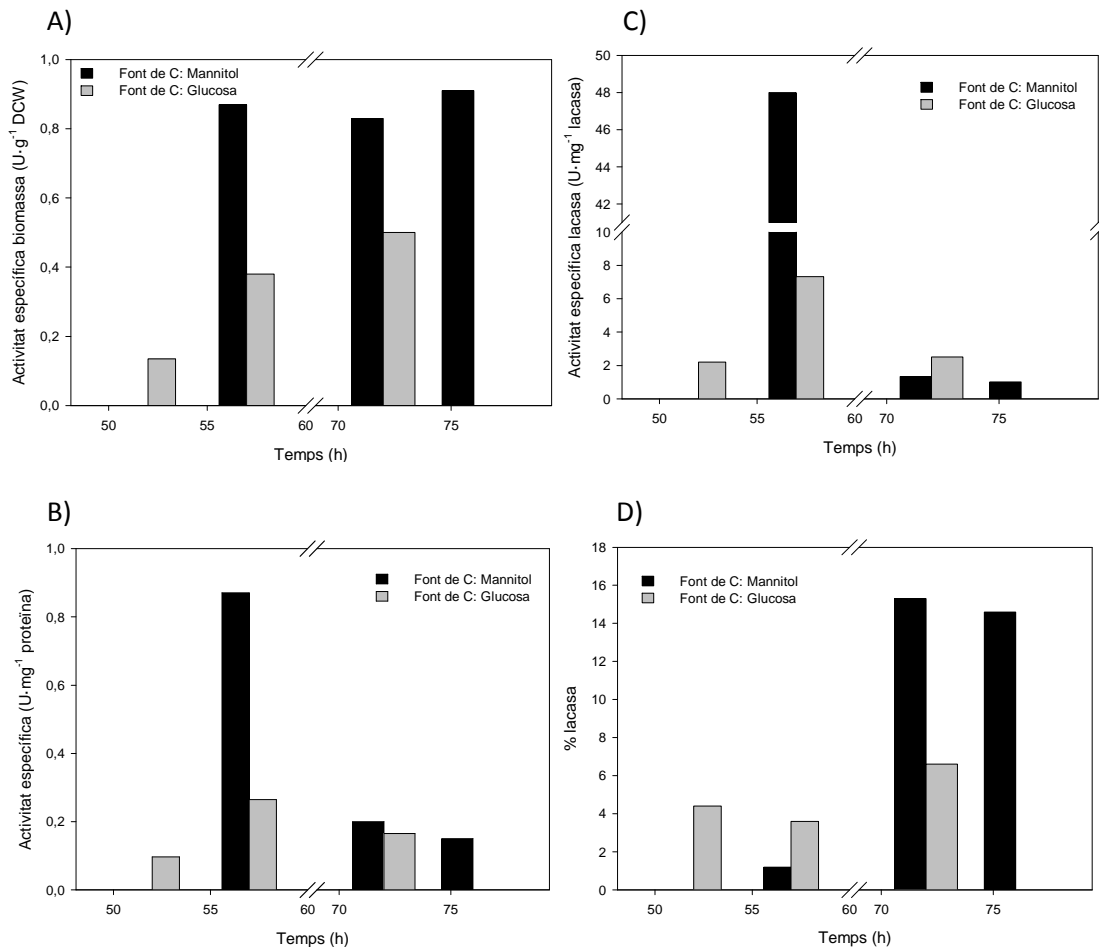
L'avaluació de cada un dels paràmetres ens dóna una informació diferent del contingut i qualitat de la lacasa. S'ha calculat els valors dels paràmetres des del moment en què s'observava lacasa al medi extracel·lular.

En termes generals, es pot veure a les gràfiques de la Figura 59 que les barres que representen al cultiu en manitol donen millor resultats. Això és degut a què l'activitat lacasa en aquest cultiu va ser més alta i també ho és en termes d'activitat específica.

En la Figura 59A es representa l'activitat específica per unitat de biomassa de la lacasa en el procés en manitol i en el procés en glucosa. L'evolució del valor en el cultiu on s'ha utilitzat manitol es manté pràcticament constant al llarg del temps. Si s'observa l'evolució del creixement i l'activitat lacasa en la Figura 53A es pot veure que tant la biomassa com la lacasa disminueixen al llarg del temps. Per això aquesta disminució progressiva per part dels dos paràmetres fa que el valor de la seva divisió es mantingui constant. Tenint en compte que no s'ha detectat lacasa intracel·lular, es pot afirmar que la lisi cel·lular afecta negativament a la

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

producció de l'enzim ja que aquest és degradat. No obstant, aquesta degradació no és suficientment agressiva com per fer disminuir la relació de producció d'enzim per cada cèl·lula.



**Figura 59. Comparativa dels processos en discontinu utilitzant mannitol o glucosa.** Evolució amb el temps de: l'activitat específica per gram de biomassa (A), l'activitat específica per mil·ligram de proteïna (B), l'activitat específica de lacasa (C) i el percentatge de lacasa en el total de proteïnes del sobredant (D). En tots els gràfics les barres negres corresponen al cultiu en mannitol i les barres grises al cultiu en glucosa.

En canvi, quan s'utilitza glucosa, la quantitat de lacasa produïda per cada una de les cèl·lules augmenta. En el cas de la mostra a les 57h és clar que la producció de cada cèl·lula ha augmentat però en el cas de la mostra a 72h això no és tan clar ja que augmenta l'activitat per gram de biomassa però a la Figura 56B es pot veure que el cultiu ha lisi. Així doncs, no es pot afirmar que hi hagi més producció per part de cada cèl·lula sinó que la disminució de la quantitat de biomassa afecti al càlcul. Malgrat això, a diferència de quan s'utilitza mannitol, l'activitat de l'enzim es manté en les últimes hores del cultiu. Així doncs, es pot afirmar que malgrat hi hagi lisi cel·lular aquesta no afecta negativament a la producció o en tot cas la nova producció de l'enzim compensa la degradació per part de proteases intracel·lulars que han pogut ser alliberades degut a la lisi.

En el moment en què es fixa l'atenció en l'activitat específica per mil·ligram de proteïna és quan es pot denotar clarament el fenomen de lisi cel·lular sobretot en el cas del cultiu en mannitol. El valor d'activitat específica passa dels  $0.87\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteïna als  $0.15\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteïna. És a dir, disminueix 5.8 vegades degut a què la quantitat de proteïna total augmenta però en



canvi l'activitat enzimàtica no ho fa de la mateixa manera. A més a més, també es pot veure en la Figura 59C que la lacasa perd qualitat ja que l'activitat específica per mil·ligram de lacasa disminueix dràsticament.

Per altra banda quan s'analitza el cultiu en glucosa, es pot veure en els dos gràfics enumerats anteriorment que l'activitat específica per mil·ligram de proteïna i l'activitat específica per mil·ligram de lacasa són més baixes que en el cas del mannitol. No obstant, també és interessant veure com la disminució no és tan pronunciada així doncs es manté la hipòtesi enunciada anteriorment que la lacasa no es degrada tant quan s'utilitza glucosa com a font de carboni així com ho fa amb el mannitol.

Finalment, en l'observació de l'evolució del percentatge de lacasa respecte a la proteïna total es pot veure com així com en el cas del cultiu en mannitol augmenta i posteriorment es manté, mentre que en la glucosa primer es manté i finalment augmenta.

La comparació esdevé més clara quan es comparen els màxims de cada un dels paràmetres en els dos processos. En la Taula 24 es poden veure els valors màxims d'activitat a l'exterior cel·lular i els seus respectius valors de les activitats específiques per unitat de biomassa, de proteïna total i de lacasa així com la quantitat de lacasa respecte a la quantitat de proteïna total expressada en percentatge. Amb la comparació d'aquests valors queda palès que la utilització de mannitol dóna lloc a millors resultats tant en termes d'activitat total com en termes específics. L'activitat detectada al sobrenedant és 4.6 vegades major en el cas del mannitol que en de la glucosa i en termes d'activitat específica també és més gran en qualsevol dels tres paràmetres. No obstant, la quantitat de lacasa relativa respecte a la proteïna total és molt més alta en el cas del cultiu de glucosa que en el de mannitol. Cal dir el moment del cultiu triat en ambdós casos és aquell en què l'activitat lacasa era màxima que en cas del mannitol va resultar ser a les 57 hores i en el cas de la glucosa a les 72 hores. En el cultiu en mannitol, la quantitat de lacasa respecte a la proteïna total a les 57h era només de 1.2% però en canvi donava més activitat que en etapes més avançades del cultiu. Aquest percentatge va incrementar posteriorment i a les 72h era de 15.3%, un percentatge molt superior al màxim obtingut en el cultiu amb glucosa en el mateix temps.

Taula 24. Comparació dels valors màxims d'activitat en els cultius de *S. lividans*  $\Delta sipYpFD$ -DagAp-lacasa en mannitol o glucosa.

Font de carboni	U·L <sup>-1</sup>	U·g <sup>-1</sup> DCW	U·mg <sup>-1</sup> proteïna	U·mg <sup>-1</sup> lacasa	% lacasa
Mannitol (57h)	5.76	0.9	0.87	48	1.2
Glucosa (72h)	3.10	0.5	0.16	2.5	6.6

#### 6.6.1.1. Cultius en discontinu alimentat utilitzant en dues fonts de carboni: mannitol o glucosa

Analitzant els cultius en discontinu es va poder concloure que la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpFD$ -DagAp-laccase era capaç de produir lacasa tant quan s'utilitzava mannitol com quan s'utilitzava glucosa com a font de carboni. En termes d'activitat, s'havia vist que la producció era millor quan s'utilitzava mannitol però el fet que el creixement fos més ràpid en glucosa va fer que es

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

---

plantegessin dos processos en discontinus alimentat. El disseny d'aquests dos discontinus alimentats va ser mimetitzat al dels cultius amb la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpAGAs5$  per a la producció de la proteïna agarasa. Així doncs, s'utilitzarà el coneixement adquirit en la primera part d'aquest treball per tal de realitzar aquests cultius en discontinu alimentats.

En la producció d'agarasa només es va poder realitzar el cultiu en discontinu utilitzant el mannitol com a font de carboni. L'addició de substrat es realitzava de forma puntual abans que s'esgotés completament la font de carboni per tal d'evitar els fenòmens de lisi cel·lular. La quantitat de substrat addicionada era la necessària per a restablir la concentració del substrat inicial. En el cas de la producció d'agarasa i utilitzant mannitol com a font de carboni es van realitzar dues addicions. No obstant, un cop es van analitzar els resultats es va poder concloure que amb una sola addició el cultiu arribava al seu màxim de producció. Per tant, la primera premissa a l'hora de realitzar aquests cultius per a la producció de lacasa va ser que en la utilització de mannitol només calia una sola addició, eliminant la segona ja que no donava lloc a cap efecte.

Per altra banda, la compatibilitat del seguiment de la producció de la lacasa amb la utilització de la glucosa com a font de carboni feia que es presentés l'oportunitat d'estudiar l'efecte de l'addició de glucosa en un cultiu de *S. lividans* per a la producció d'una proteïna. En el cas de la glucosa, i tal com es va fer inicialment amb el mannitol, es van realitzar dues addicions per tal de veure quin era l'efecte que donen i poder extreure conclusions d'aquesta metodologia.

Així doncs, a continuació es presenten dos cultius: el primer utilitzant mannitol com a font de carboni i amb una addició en el moment que aquesta font de carboni està a punt d'acabar-se; el segon utilitzant glucosa com a font de carboni i amb dues addicions consecutives seguint el mateix patró, és a dir, quan la glucosa era propera acabar-se s'addicionava la quantitat necessària per tal de restablir la concentració inicial de substrat.

Els creixements presentats (Figura 60A utilitzant mannitol i Figura 60B utilitzant glucosa) tenen un comportament diferent. Mentre la utilització del mannitol no dóna lloc a un increment notable de l'activitat lacasa tal com s'havia vist amb la producció de l'agarasa, en el cas del procés en el que s'ha utilitzat glucosa, sí que hi ha hagut un increment de l'activitat.

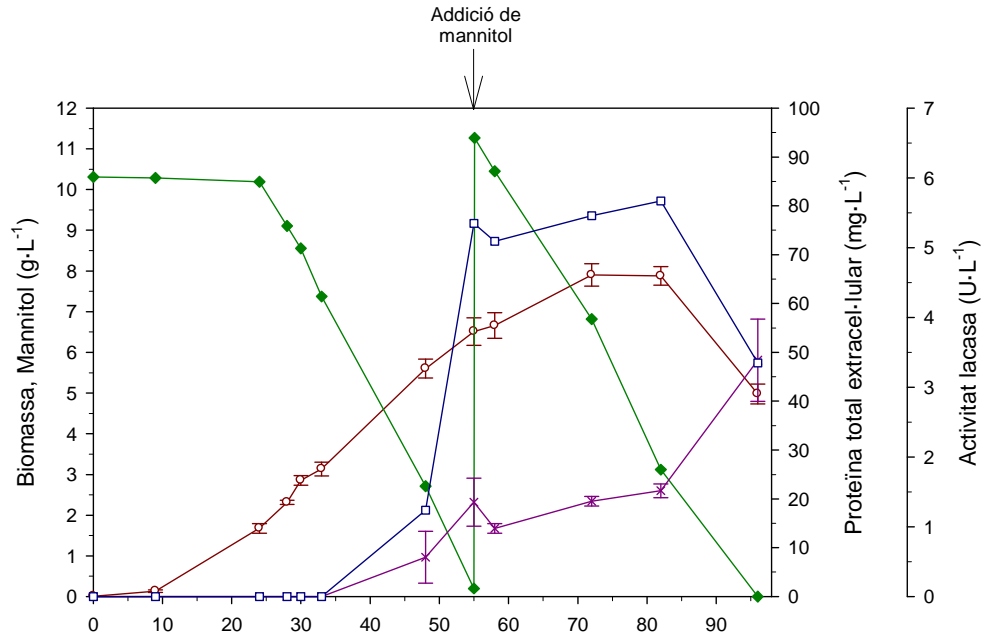
Analitzant primerament el cultiu amb mannitol cal destacar que el creixement no s'atura fins a les 82h. En la mostra de les 96h el cultiu ha lisat molt, reduint considerablement la quantitat de biomassa en el cultiu degut al fenomen de lisi cel·lular.

Pel què fa a la quantitat de proteïna secretada a l'exterior cel·lular, l'aparició es dóna a les 48h i l'augment és progressiu fins a les 82h. Aquest augment progressiu coincideix a les 55h amb un augment molt considerable de l'activitat lacasa que arriba a un valor de  $5.35U \cdot L^{-1}$ . Aquest increment es dóna simultàniament amb l'addició de mannitol. En les mostres posteriors a aquesta addició l'activitat lacasa augmenta lleugerament fins a les 82h. Finalment, en l'última mostra a les 96h el cultiu lisa clarament i l'augment de les proteïnes és molt considerable fins a  $48.4mg \cdot L^{-1}$  moment que coincideix amb l'aparició final de proteases al medi extracel·lular. Així doncs, es pot dir que l'activitat lacasa es veu molt moderadament afectada per l'addició de mannitol i que aquesta addició ajuda a què es mantingui al llarg del temps mentre que en el

6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

procés en discontinu disminueix lleugerament. No obstant, a l'última mostra, a les 96h, l'enzim perd activitat probablement a causa de l'alliberació de les proteïnes de l'interior cel·lular que probablement causaran la degradació de l'enzim.

A) Mannitol:



B) Glucosa:

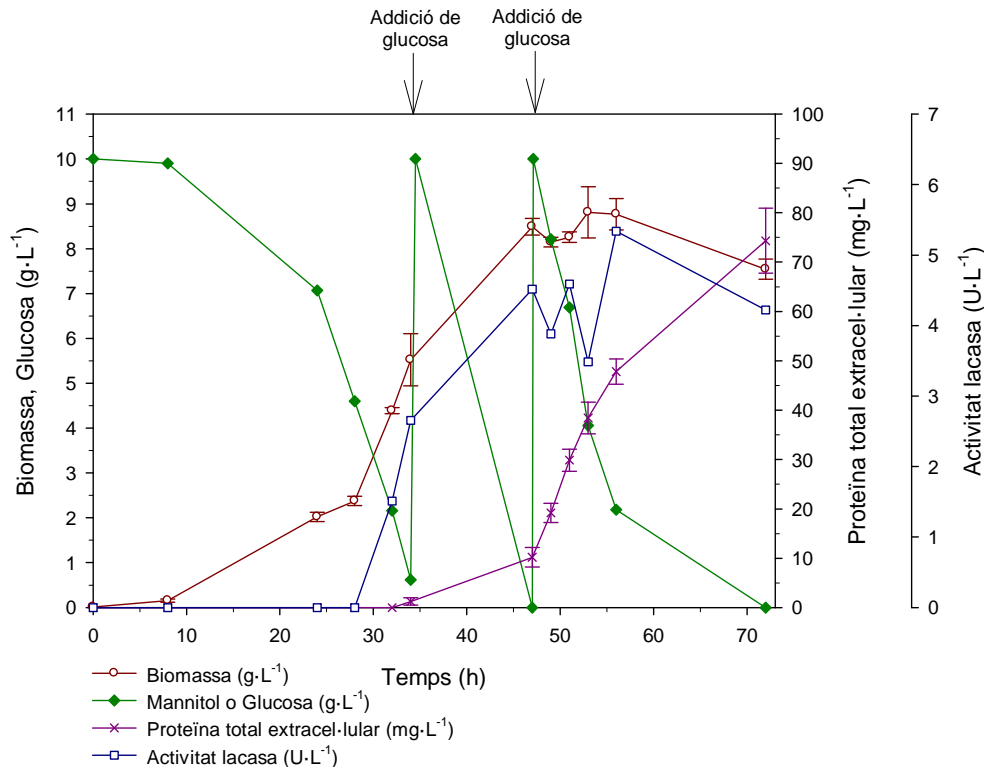
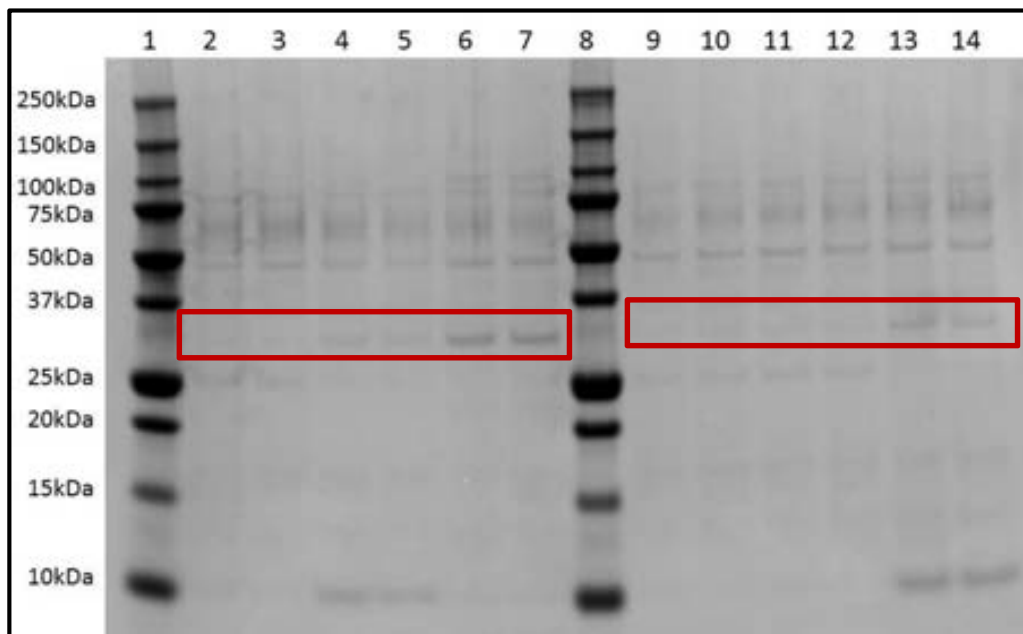


Figura 60. Cultius en discontinuo alimentat en bioreactor. A: Creixement de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpFD$ -DagAp-laccase en mannitol. B: Creixement de la soca productora *S. lividans*  $\Delta sipYpFD$ -DagAp-laccase en glucosa.

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

Respecte a la utilització de glucosa com a font de carboni, el comportament és semblant al cultiu crescut en mannitol en termes de creixement: la biomassa no para d'augmentar fins a l'última mostra quan la glucosa s'ha esgotat i el cultiu lisa. La quantitat de proteïna també va augmentant progressivament fins al final del cultiu a les 56h moment on hi ha una concentració de proteïna extracel·lular de  $47.8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  i tal com passava en el cultiu en mannitol és en l'últim període del procés, des de les 56h fins a les 72h que la concentració augmenta molt clarament fins a  $74.3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Considerant la producció de l'enzim sí que en aquest cas l'addició de substrat provoca un efecte molt significatiu en la producció. Així, en la primera addició s'augmenta l'activitat lacasa 1.7 vegades.

En l'anàlisi per electroforesi SDS-PAGE dels dos cultius també es va poder observar la banda que corresponia a la lacasa (Figura 61). En ambdós casos es va poder observar la banda i tal com havia passat en el cas dels cultius en discontinu, la banda del cultiu en glucosa va ser més dèbil que en el cas del mannitol. Aquest anàlisi ajuda a comprova qualitativament que hi ha hagut producció i es pot quantificar la banda respecte a la proteïna total.



**Figura 61. Electroforesi de proteïnes dels cultius discontinus alimentats de la soca *S. lividans*  $\Delta sipYpFD-DagAp-laccase$ .** Els carrils 1 i 8 corresponen al marcador de pes molecular. Els carrils de 2-7 corresponen a les mostres del cultiu discontinu alimentat amb addició de mannitol (Figura 60A): 48h (carril 2), 55h (carril 3), 58h (carril 4), 72h (carril 5), 82h (carril 6) i 96h (carril 7). Els carrils de 9-14 corresponen a les mostres del cultiu discontinu alimentat amb addicions de glucosa (Figura 60B): 47h (carril 9), 49h (carril 10), 51h (carril 11), 53h (carril 12), 56h (carril 13) i 72h (carril 14).

### 6.6.2. Comparativa dels cultius en discontinu alimentat

L'anàlisi i comparativa que s'ha dut a terme en l'apartat anterior es durà també a terme en els cultius en discontinu. Les dades es recolliran abans de les addicions i després de les addicions i es compararan per tal de veure quina és la millor alternativa.

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

S'analitzarà l'activitat específica per gram de biomassa, l'activitat específica per mil·ligram de proteïna total extracel·lular, l'activitat específica per mil·ligram de lacasa i la quantitat relativa de lacasa respecte a la proteïna total (Figura 62 a Figura 65).

En termes de producció total es pot dir que l'addició de mannitol ha tingut un efecte modest sobre l'activitat de la lacasa, mentre que l'addició de glucosa ha provocat que pràcticament es doblés l'activitat lacasa.

En la Figura 62 es presenta l'activitat específica per gram de biomassa. En el cas del mannitol es pot veure com aquest paràmetre s'ha mantingut després de l'addició i fins i tot ha disminuït lleugerament. I en el cas de la glucosa la quantitat de lacasa produïda per cada cèl·lula, tot i que és irregular, sembla seguir una tendència tímidament positiva.

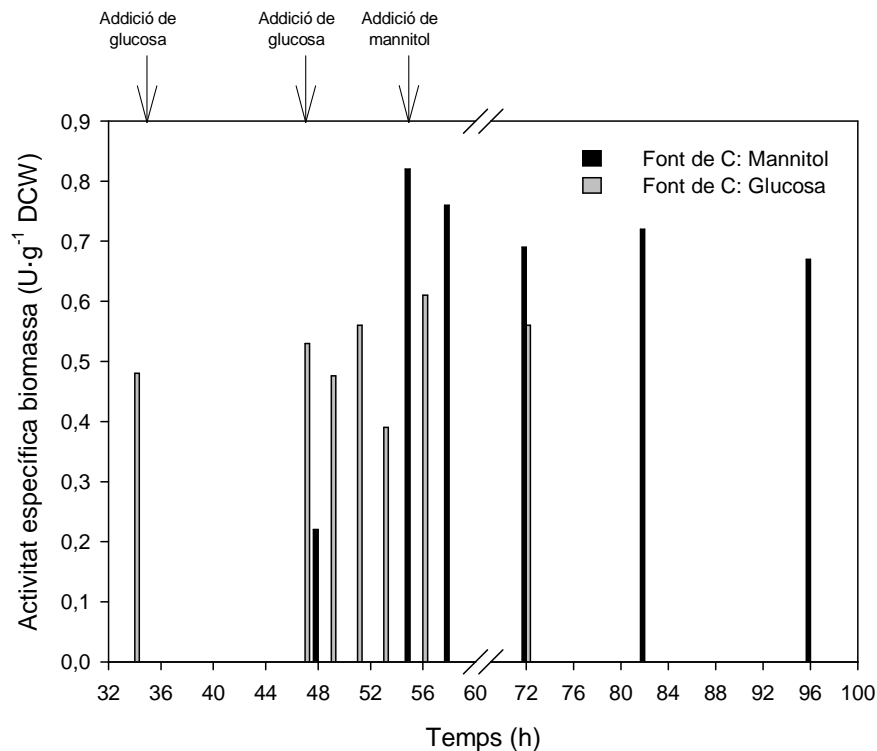


Figura 62. Comparativa dels processos en discontinu alimentat utilitzant mannitol o glucosa. Activitat específica per gram de biomassa en el temps.

Pel que fa a l'activitat específica per mil·ligram de proteïna total (Figura 63), es pot veure com en el cas del mannitol s'incrementa abans i després de l'addició de substrat i posteriorment, a partir de les 57h, decreix.

En canvi, en el cas de la glucosa abans de l'addició sembla que era molt pura a l'inici però l'activitat específica va disminuint degut probablement a l'increment de la quantitat de proteïna extracel·lular alliberada com a conseqüència de la lisi cel·lular (a partir de les 82h).

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

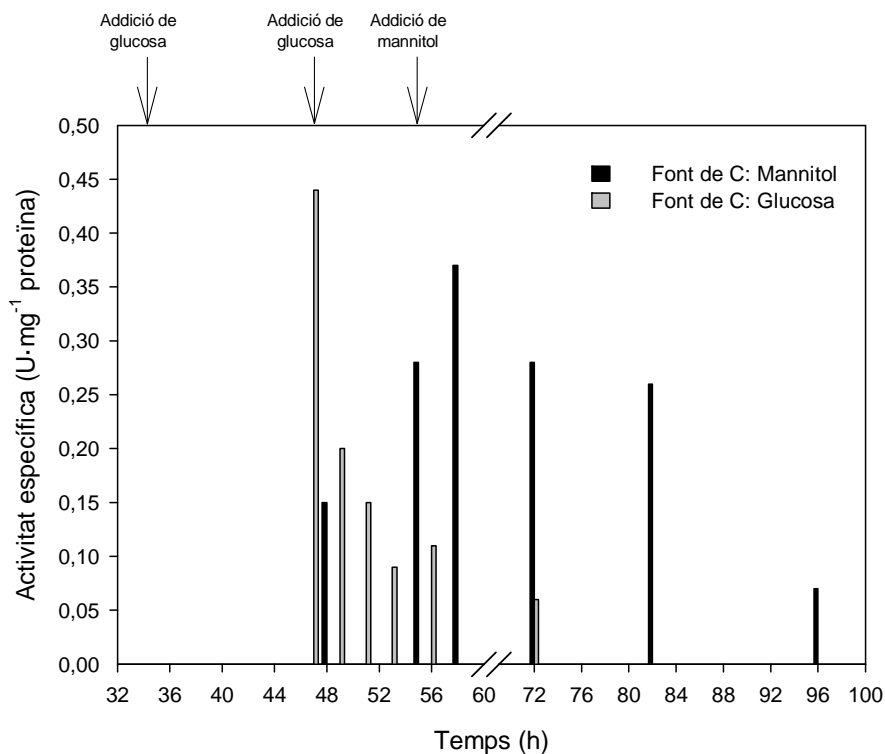


Figura 63. Comparativa dels processos en discontinu alimentat utilitzant mannitol o glucosa. Activitat específica per mil·ligram de proteïna en el temps.

Per altra banda, a la Figura 64 es presenta l'activitat específica per mil·ligram de lacasa. Aquí també s'observa el mateix patró que anteriorment. La proteïna sembla molt pura i activa a l'inici però a mesura que avança el cultiu va perdent activitat específica fins a arribar, en ambdós casos, a nivell més baixos. Es pot veure com les addicions de substrat en aquesta proteïna no tenen un efecte directe en la conservació de l'activitat per mil·ligram d'enzim.

Finalment, quan s'analitza la quantitat relativa de lacasa respecte a proteïna total es pot observar com a mesura que avança el cultiu aquest paràmetre augmenta considerablement. Així, en el cas del mannitol sí que sembla que l'addició impliqui un augment en l'alliberació de lacasa al medi extracel·lular ja que és després de la seva addició quan hi ha l'increment més gran. Tot i així, el fet que aquest augment de la quantitat relativa augmenti però no ho faci l'activitat és indicatiu que la lacasa que és alliberada a l'exterior cel·lular no sigui funcional. Bé perquè no es conformi correctament l'estructura terciària d'aquesta molècula o perquè no pugui ser activa catalíticament.

En canvi, en el cas de la glucosa, no es veu tant l'efecte de les addicions del substrat com del pas del temps del cultiu. Així, ja sigui degut a la lisi cel·lular o a l'augment de la secreció de la proteïna lacasa, en la Figura 65 es pot veure clarament com la quantitat relativa de lacasa augmenta al llarg del temps.

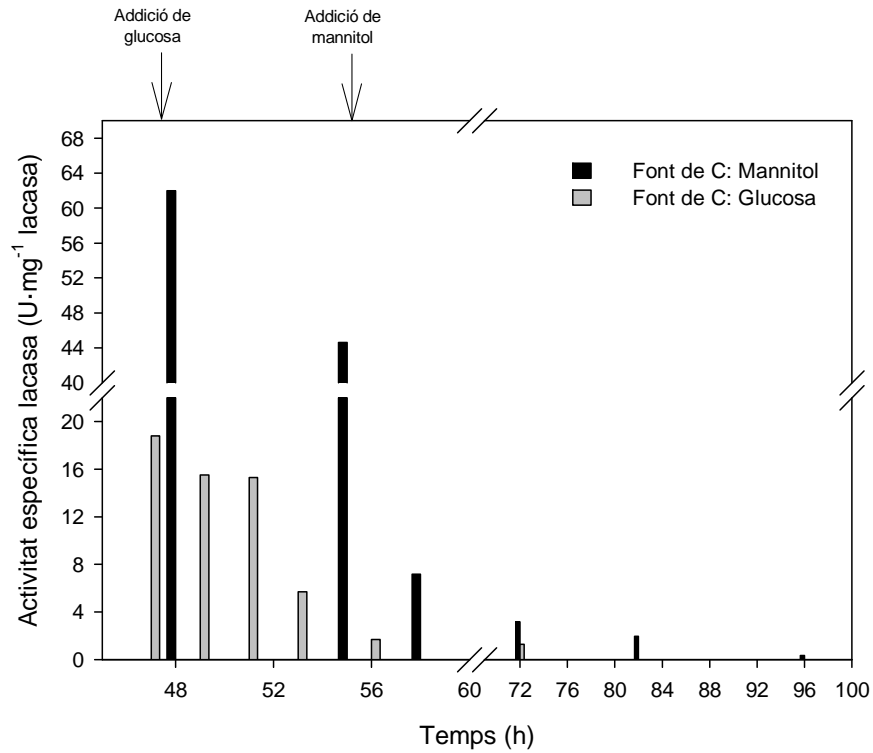


Figura 64. Comparativa dels processos en discontinu alimentat utilitzant mannitol o glucosa. Activitat específica per mil·ligram de lacasa en el temps. En el cas de la glucosa només es presenta la segona addició.

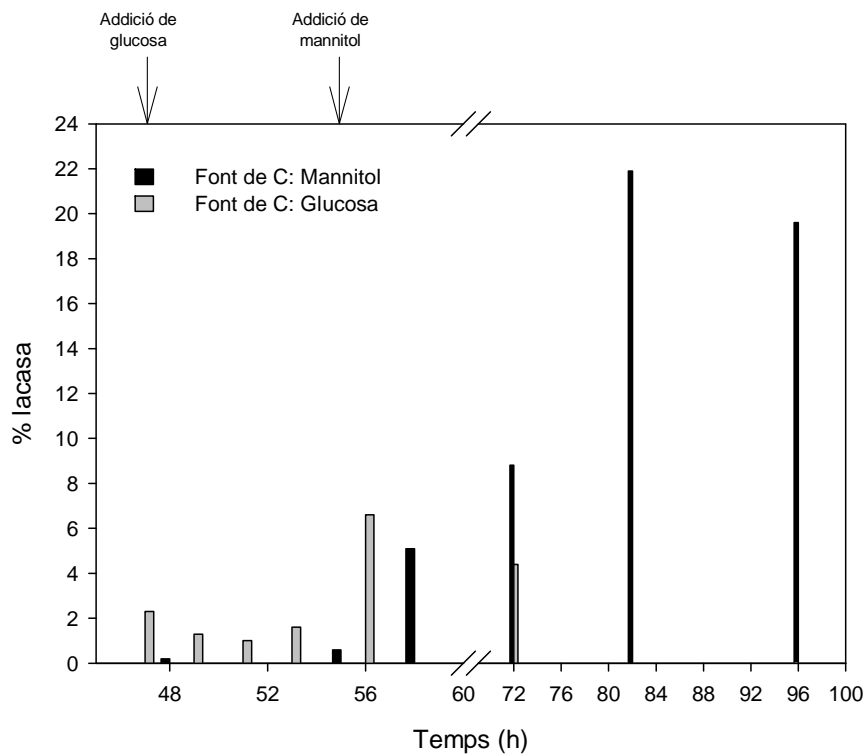


Figura 65. Comparativa dels processos en discontinu alimentat utilitzant mannitol o glucosa. Percentatge de lacasa en el total de proteïnes del sobrenedant.

## 6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

La comparació final entre els dos cultius es realitza amb els màxims de les activitats obtinguts en cada creixement abans i després de les addicions de substrat. En el cas del mannitol, el màxim d'activitat abans de l'addició és a les 55h i posteriorment a l'addició a les 82h. En el cas de la glucosa es presentaran tres valors: abans de la primera addició, entre la primera i la segona addició i el màxim després de la segona addició.

Taula 25. Comparació dels valors màxims d'activitat en els cultius de *S. lividans*  $\Delta sipYpFD$ -DagAp-lacasa en mannitol o glucosa abans i després de les addicions de substrat.

Font de carboni	Temps (h)	U·L <sup>-1</sup>	U·g <sup>-1</sup> DCW	U·mg <sup>-1</sup> proteïna	U·mg <sup>-1</sup> lacasa	% lacasa
Mannitol	55	5.35	0.82	0.28	44.6	0.6
	82	5.67	0.72	0.26	1.97	21.9
	34	2.65	0.48	-	-	0
Glucosa	47	4.51	0.53	0.44	18.79	2.3
	56	5.34	0.61	0.11	1.69	6.6

En la La comparació final entre els dos cultius es realitza amb els màxims de les activitats obtinguts en cada creixement abans i després de les addicions de substrat. En el cas del mannitol, el màxim d'activitat abans de l'addició és a les 55h i posteriorment a l'addició a les 82h. En el cas de la glucosa es presentaran tres valors: abans de la primera addició, entre la primera i la segona addició i el màxim després de la segona addició.

Taula 25 es pot veure que en termes de producció se seleccionaria el mannitol com a millor font de carboni. La producció assolida amb mannitol abans de l'addició és 5.35U·L<sup>-1</sup> i després de l'addició és similar. No obstant, quan es té en compte la quantitat de lacasa relativa, aquesta augmenta més de 36 vegades i això indica que l'addició sí que ha provocat un augment en la secreció de la proteïna d'interès però que aquesta no és activa. Així doncs, l'efecte que provoca l'addició de mannitol és el mateix que en el cas de l'agarosa però caldria destinar esforços a saber per què aquesta proteïna no perd activitat i la lacasa sí. Cal dir que es va analitzar l'activitat proteolítica del medi extracel·lular del cultiu i no es va observar activitat de manera que la desactivació de l'enzim ha de venir donada per alguna altra causa.

Per altra banda, en el cas de la glucosa, es pot veure que l'augment de l'activitat és progressiu i s'assoleixen nivells d'activitat superiors als que s'havien assolit en el procés en discontinu. En tots els casos la utilització de glucosa no és millor que la de mannitol ja que tots els paràmetres calculats donen valors inferiors. No obstant, en aquest cas sí que s'observa un augment de l'activitat amb les addicions de substrat que van lligades amb l'aparició de la lacasa extracel·lular.

Així doncs, tenint en compte els resultats comentats en aquest capítol queda palès que la utilització del mannitol dona lloc a més producció i que, tal com havia passat amb l'agarosa, una addició de mannitol implica un augment de la producció tot i que en el cas de la lacasa es produeix una desactivació de l'enzim que s'hauria d'estudiar per tal de veure a què és degut.



### 6.7. Conclusions finals del capítol III

- S'han construït les tres soques productores de lacasa: *S. lividans* TK21pFD-laccase, *S. lividans*  $\Delta sipYpIJ$ -laccase i *S. lividans*  $\Delta siYpFD$ -DagAp-laccase.
- només ha estat exitosa quan el gen d'aquesta proteïna estava regulat pel promotor de l'agarasa.
- La producció de lacasa s'ha pogut avaluar utilitzant mannitol o glucosa com a font de carboni i en discontinu i discontinu alimentat. S'ha obtingut una major producció en discontinu utilitzant mannitol com font de carboni.
- A diferència del cas de l'agarasa, el procés en discontinu alimentat en mannitol no va suposar un gran augment en l'activitat lacasa. Malgrat això sembla haver un augment de la lacasa secretada en el medi (detectada per SDS-PAGE) que fa pensar en una possible desactivació.
- La utilització de glucosa com a font de carboni en discontinu alimentat sí que va suposar un increment en la producció de lacasa però eren necessàries dues addicions de substrat per a assolir els mateixos nivells de producció que en el cas del mannitol amb una addició.

6. Resultats III: Clonació i expressió en plasmidis multicòpia de la lacasa pròpia en *Streptomyces lividans*

---

## 7. Conclusions finals

- La soca *Streptomyces lividans*  $\Delta sipY$  és adequada per a la producció de proteïnes en bioreactor. S'ha aconseguit produir dues proteïnes que se secreten per la via Tat: agarasa i lacasa.
- La producció d'agarasa en un procés en discontinu alimentat amb una addició puntual de substrat ha incrementat la producció notablement podent establir aquesta metodologia com a una possible estratègia per a la producció de proteïnes recombinants que se secretin per la via Tat.
- La producció de lacasa va ser exitosa quan es trobava sota el control del promotor de l'agarasa, podent-se estendre aquest sistema d'expressió per a altres proteïnes.
- La producció de proteïnes en *Streptomyces* té una sèrie de limitacions quan es compara amb l'hoste més àmpliament utilitzat (*E. coli*):
  - En la majoria dels sistemes d'expressió establerts per a *Streptomyces* els promotors són constitutius cosa que impossibilita, en la majoria dels casos, poder desacoblar la fase de creixement amb la fase de producció.
  - No s'ha aconseguit creixement en un medi definit que permetés programar l'addició de substrat limitant en cultius discontinus alimentat. L'operació en discontinu alimentat en medi semicomplex no ha conduït a altes densitats cel·lulars.
  - La morfologia del microorganisme canvia en funció de les modificacions genètiques. El creixement en forma de pèl·lets, l'adhesió a les parets del bioreactor per algunes construccions i l'alta viscositat dels cultius condueix a unes propietats reològiques que dificulten la reproductibilitat.



## 8. Bibliografia

- Anderson, A.S. & Wellington, E.M.H., 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), pp.797–814.
- Angert, E.R., 2005. Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3, pp.214–224.
- Anné, J. et al., 2014. Protein secretion biotechnology in Gram-positive bacteria with special emphasis on *Streptomyces lividans*. *Biochimica et biophysica acta*, 1843(8), pp.1750–1761.
- Anné, J. et al., 2012. Recombinant protein production and streptomycetes. *Journal of biotechnology*, 158(4), pp.159–67.
- Antelmann, H. et al., 2003. The extracellular proteome of *Bacillus subtilis* under secretion stress conditions. *Molecular Microbiology*, 49(1), pp.143–156.
- Antelmann, H., Scharf, C. & Hecker, M., 2000. Phosphate Starvation-Inducible Proteins of *Bacillus subtilis*: Proteomics and Transcriptional Analysis. *Jour*, 182(16).
- Avignone Rossa, C. et al., 2002. Carbon flux distribution in antibiotic-producing chemostat cultures of *Streptomyces lividans*. *Metabolic engineering*, 4(2), pp.138–50.
- Ayadi, D.Z. et al., 2007. Expression by *streptomyces lividans* of the rat alpha integrin CD11b A-domain as a secreted and soluble recombinant protein. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2007(1), p.54327.
- Baneyx, F. & Mujacic, M., 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*, 22(11), pp.1399–408.
- Barbe, V. et al., 2011. Complete genome sequence of *Streptomyces cattleya* NRRL 8057, a producer of antibiotics and fluorometabolites. *Journal of bacteriology*, 193(18), pp.5055–6.
- Bauer, C.G. et al., 1999. New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 364(1-2), pp.179–183.
- Bendtsen, J.D. et al., 2005. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC bioinformatics*, 6, p.167.
- Benfield, G. et al., 1964. Studies of fungal and plant laccases. *Phytochemistry*, 3, pp.79–88.
- Bentley, S.D. et al., 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 3(2), pp.141–147.
- Berks, B.C., Palmer, T. & Sargent, F., 2005. Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Current opinion in microbiology*, 8(2), pp.174–81.
- Bertrand, G., 1896. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Seances Acad Sci*, 123, pp.463–465.
- Bibb, M.J., 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current opinion in microbiology*, 8(2), pp.208–15.

- Bibb, M.J. et al., 1987. The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): affinity purification and characterization of the cloned gene product. *Journal of General Microbiology*, 133, pp.2089–2096.
- Bibb, M.J., Janssen, G.R. & Ward, J.M., 1985. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene*, 38(1-3), pp.215–26.
- Bignell, D.R.D. et al., 2010. *Streptomyces scabies* 87-22 contains a coronafacic acid-like biosynthetic cluster that contributes to plant-microbe interactions. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 23(2), pp.161–75.
- Biswas, L. et al., 2009. Role of the twin-arginine translocation pathway in *Staphylococcus*. *Journal of bacteriology*, 191(19), pp.5921–9.
- Blázquez, P. et al., 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water research*, 38(8), pp.2166–72.
- Borodina, I. et al., 2008. Antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3 2 mediated by phosphofructokinase deletion. *The Journal of biological chemistry*, 283(37), pp.25186–99.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp.248–254.
- Breslauer, K.J. et al., 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(11), pp.3746–50.
- Bubnis, W.A. & Ofner, III, C.M., 1992. The determination of ε-amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry*, 207, pp.129 – 33.
- Buttner, M.J., Fearnley, I.M. & Bibb, M.J., 1987. The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): nucleotide sequence and transcriptional analysis. *Molecular and General Genetics*, 209(1), pp.101–109.
- Buttner, M.J., Smith, A.M. & Bibb, M.J., 1988. At least three different RNA polymerase holoenzymes direct transcription of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Cell*, 52(4), pp.599–607.
- Cesare, S. Di et al., 2013. High-Yield Production of PASylated Human Growth Hormone Using Secretary. *BioProcess Technical*, 11(4), pp.30–38.
- Chater, K.F., 2006. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 361(1469), pp.761–8.
- Claus, H., 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35(1-2), pp.93–96.
- Cruz-Morales, P. et al., 2013. The genome sequence of *Streptomyces lividans* 66 reveals a novel tRNA-dependent peptide biosynthetic system within a metal-related genomic island. *Genome biology and evolution*, 5(6), pp.1165–75.
- D’Huys, P.-J. et al., 2011. Amino acid uptake profiling of wild type and recombinant *Streptomyces lividans* TK24 batch fermentations. *Journal of biotechnology*, 152(4), pp.132–43.

- Daleke, M.H. et al., 2012. General secretion signal for the mycobacterial type VII secretion pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(28), pp.11342–7.
- Denis, F. & Brzezinski, R., 1992. A versatile shuttle cosmid vector for use in *Escherichia coli* and actinomycetes. *Gene*, 111(1), pp.115–118.
- Diamantidis, G. et al., 2000. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, pp.919–927.
- Díaz, M. et al., 2008. High-level overproduction of *Thermus* enzymes in *Streptomyces lividans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(6), pp.1001–8.
- Díaz, M. et al., 2004. *Streptomyces lividans* and *Brevibacterium lactofermentum* as heterologous hosts for the production of X22 xylanase from *Aspergillus nidulans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(4), pp.401–6.
- Van Dijl, J.M. et al., 1992. Signal peptidase I of *Bacillus subtilis*: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases. *The EMBO journal*, 11(8), pp.2819–28.
- Dilks, K. et al., 2003. Prokaryotic Utilization of the Twin-Arginine Translocation Pathway : a Genomic Survey. *Journal of Bacteriology*, 185(4), pp.1478–1483.
- Dubé, E. et al., 2008. Decolourization of recalcitrant dyes with a laccase from *Streptomyces coelicolor* under alkaline conditions. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 35(10), pp.1123–9.
- Dubnau, D., 1984. Translational attenuation: the regulation of bacterial resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *CRC Crit Rev Biochem.*, 16(2), pp.103–32.
- Dyger, S. et al., 1965. Determination of Reducing Sugar with Improved Precision. *Analytical Biochemistry*, 13, pp.367–374.
- Ferrer-Miralles, N. et al., 2009. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial cell factories*, 8, p.17-25.
- Ferry, Y. & Leech, D., 2005. Amperometric Detection of Catecholamine Neurotransmitters Using Electrocatalytic Substrate Recycling at a Laccase Electrode. *Electroanalysis*, 17(2), pp.113–119.
- Flärdh, K. & Buttner, M.J., 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature reviews. Microbiology*, 7(1), pp.36–49.
- Geueke, B. & Hummel, W., 2003. Heterologous expression of *Rhodococcus opacus* l-amino acid oxidase in *Streptomyces lividans*. *Protein Expression and Purification*, 28(2), pp.303–309.
- Giardina, P. et al., 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(3), pp.369–85.
- Gilbert, M. et al., 1995. Production and secretion of proteins by streptomycetes. *Critical reviews in biotechnology*, 15(1), pp.13–39.

- Golz-Berner, K. et al., 2004. Cosmetic and dermatological preparation containing copper-binding proteins for skin lightening. (Patent)
- Gullón, S. et al., 2012. Translocase and major signal peptidase malfunctions affect aerial mycelium formation in *Streptomyces lividans*. *Journal of biotechnology*, 160(3-4), pp.112–22.
- Gust, B. et al., 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), pp.1541–6.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J., 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in biotechnology*, 22(7), pp.346–53.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), pp.557–580.
- Hatakeyama, T., Kohzaki, H. & Yamasaki, N., 1992. A microassay for proteases using succinylcasein as a substrate. *Analytical Biochemistry*, 204(1), pp.181–184.
- Hatanaka, T. et al., 2008. pTONA5: a hyperexpression vector in *Streptomyces*. *Protein expression and purification*, 62(2), pp.244–8.
- Heady, R.E., 1978. Preparation of high fructose syrups from sucrose. (Patent)
- Hege-Treskatis, D. et al., 1991. Nutritional control of nikkomycin and juglomycin production by *Streptomyces tendae* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, pp.440–445.
- Herai, S. et al., 2004. Hyper-inducible expression system for streptomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39), pp.14031–5.
- Hodgson, D.A., 1982. Glucose Repression of Carbon Source Uptake and Metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its Perturbation in Mutants Resistant to 2-Deoxyglucose. *Journal of General Microbiology*, 128(10), pp.2417–2430.
- Hodgson, D.A. & Charter, F., 1981. A Chromosomal Locus Controlling Extracellular Agarase Production by *Streptomyces coelicolor* A3(2), and its Inactivation by Chromosomal Integration of Plasmid SCP1. *Journal of Ge*, 124, pp.339–348.
- Hopwood, D.A. et al., 1983. Plasmids, Recombination and Chromosome Mapping in *Streptomyces lividans* 66. *Journal of General Microbiology*, 129(7), pp.2257–2269.
- Ikeda, H. et al., 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature biotechnology*, 21(5), pp.526–31.
- Jarosz-Wilkolazka, A., Ruzgas, T. & Gorton, L., 2004. Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), pp.238–241.
- Jayapal, K.P. et al., 2007. Comparative genomic hybridizations reveal absence of large *Streptomyces coelicolor* genomic islands in *Streptomyces lividans*. *BMC genomics*, 8, p.229.



- Jeon, J.-R. et al., 2010. Laccase-catalysed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colourations driven by homo- or heteropolymer synthesis. *Microbial biotechnology*, 3(3), pp.324–35.
- Joshi, M. V et al., 2010. The twin arginine protein transport pathway exports multiple virulence proteins in the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *Molecular microbiology*, 77(1), pp.252–71.
- De Keersmaecker, S. et al., 2007. The Tat pathway in *Streptomyces lividans*: interaction of Tat subunits and their role in translocation. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 4), pp.1087–94.
- Keiser, T. et al., 2000. *Practical Streptomyces Genetics*, Norwich, NR4 7UH, England: The John Innes Foundation.
- Kendall, K. & Cullum, J., 1984. Cloning and expression of an extracellular-agarase gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) in *Streptomyces lividans* 66. *Gene*, 29(3), pp.315–321.
- Kramer, K.J. et al., 2001. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron*, 57, pp.385–392.
- Kunamneni, A. et al., 2008. Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial cell factories*, 7, p.32.
- Kuznetsov, B.A. et al., 2001. On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. *Biosensors & bioelectronics*, 16(1-2), pp.73–84.
- Lammertyn, E. et al., 1997. Evaluation of a novel subtilisin inhibitor gene and mutant derivatives for the expression and secretion of mouse tumor necrosis factor alpha by *Streptomyces lividans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), pp.1808–1813.
- Lammertyn, E. & Anné, J., 1998. Modifications of *Streptomyces* signal peptides and their effects on protein production and secretion. *FEMS microbiology letters*, 160, pp.1–10.
- Lara, M. et al., 2004. Expression, Secretion, and Glycosylation of the 45- and 47-kDa Glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), pp.1–8.
- Lewis, R. a et al., 2010. Metabolic and evolutionary insights into the closely-related species *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* deduced from high-resolution comparative genomic hybridization. *BMC genomics*, 11(1), p.682.
- Li, J.-X. et al., 2013. High-level overproduction of Thermobifida enzyme in *Streptomyces lividans* using a novel expression vector. *International journal of molecular sciences*, 14(9), pp.18629–39.
- Lin, S.-J. et al., 2008. Characterization and large-scale production of recombinant *Streptoverticillium platensis* transglutaminase. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 35(9), pp.981–90.
- Lin, Y.-S. et al., 2006. Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Process Biochemistry*, 41(3), pp.519–524.

- Lohr, D., Buschulte, T. & Gilles, E.-D., 1989. Continuous cultivation of *Streptomyces tendae* in different media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, pp.274–279.
- Lycklama A Nijeholt, J. a & Driessen, A.J.M., 2012. The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1592), pp.1016–28.
- Maarten van Dijl, J. et al., 1991. Signal peptidase I overproduction results in increased efficiencies of export and maturation of hybrid secretory proteins in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*, 227(1), pp.40–48.
- Machczynski, M.C. et al., 2004. Characterization of SLAC : A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Science*, 13, pp.2388–2397.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J., 1999. Microbiología industrial. In *Brock. Biología de los microorganismos*. pp. 430–472.
- Majumdar, S. et al., 2014. Roles of Small Laccases from *Streptomyces* in Lignin Degradation. *Biochemistry*.
- Malten, M. et al., 2005. Coexpression of the type I signal peptidase gene sipM increases recombinant protein production and export in *Bacillus megaterium* MS941. *Biotechnology and bioengineering*, 91(5), pp.616–21.
- Martín, J.F., 2004. Phosphate Control of the Biosynthesis of Antibiotics and Other Secondary Metabolites Is Mediated by the PhoR-PhoP System: an Unfinished Story. *Journal of bacteriology*, 186(16), pp.5197–5201.
- Mayer, A.M. & Harel, E., 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18, pp.193–215.
- Meilleur, C. et al., 2009. Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(6), pp.853–61.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M. & Durán, N., 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13, pp.205–216.
- Morosoli, R., Shareck, F. & Kluepfel, D., 1997. Protein secretion in streptomycetes. *FEMS microbiology letters*, 146(2), pp.167–74.
- Motoki, M. & Seguro, K., 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), pp.204–210.
- Moya, R. et al., 2011. Reactivity of bacterial and fungal laccases with lignin under alkaline conditions. *Bioresource technology*, 102, pp.10006–10012.
- Mulder, K.C.L., Bandola, J. & Schumann, W., 2013. Construction of an artificial secYEG operon allowing high level secretion of  $\alpha$ -amylase. *Protein expression and purification*, 89(1), pp.92–6.
- Murakami, T., Holt, T.G. & Thompson, C.J., 1989. Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *Journal of bacteriology*, 171(3), pp.1459–66.
- Nakashima, N., Mitani, Y. & Tamura, T., 2005. Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins. *Microbial cell factories*, 4(1), p.7.

- Noda, S. et al., 2010. Over-production of various secretory-form proteins in *Streptomyces lividans*. *Protein expression and purification*, 73(2), pp.198–202.
- Nolan, R.A., 1971. Amino acids and growth factors in vitamin-free casamino acids. *Mycologia*, 63(6), pp.1231–1234.
- Ogino, C. et al., 2004. Over-expression system for secretory phospholipase D by *Streptomyces lividans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(6), pp.823–8.
- Ohnishi, Y. et al., 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of bacteriology*, 190(11), pp.4050–60.
- Olano, C., Méndez, C. & Salas, J. a, 2009. Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Marine drugs*, 7(2), pp.210–48.
- Overton, T.W., 2014. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug discovery today*, 19(5), pp.590–601.
- Palacin, A. et al., 2003. *Streptomyces lividans* contains a minimal functional signal recognition particle that is involved in protein secretion. *Microbiology*, 149(9), pp.2435–2442.
- Palacín, A. et al., 2002. SipY Is the *Streptomyces lividans* Type I Signal Peptidase Exerting a Major Effect on Protein Secretion. *Journal of Bacteriology*, 184(17), pp.4875–4880.
- Palmer, T. & Berks, B.C., 2012. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nature reviews. Microbiology*, 10(7), pp.483–96.
- Palmer, T., Sargent, F. & Berks, B.C., 2010. The Tat protein export pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*. In A. et al. Böck, ed. *Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology Press.
- Parro, V. et al., 1999. Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK21. *Microbiology (Reading, England)*, 145 ( Pt 9, pp.2255–63.
- Parro, V. et al., 1997. Overproduction and purification of an agarase of bacterial origin. *Journal of biotechnology*, 58(1), pp.59–66.
- Parro, V. & Mellado, R.P., 1994. Effect of glucose on agarase overproduction by *Streptomyces*. *Gene*, 145(1), pp.49–55.
- Parro, V. & Mellado, R.P., 1993. Heterologous recognition in vivo of promoter sequences from the *Streptomyces coelicolor* *dagA* gene. *FEMS microbiology letters*, 106(3), pp.347–56.
- Parro, V., Mellado, R.P. & Y, C.R.H., 1998. Effects of phosphate limitation on agarase production by *Streptomyces lividans* TK21. , 158, pp.107–113.
- Pimienta, E. et al., 2007. Recombinant production of *Streptococcus equisimilis* streptokinase by *Streptomyces lividans*. *Microbial cell factories*, 6, p.20.
- Pointing, S.B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2), pp.20–33.
- Pozidis, C. et al., 2001. Protein secretion biotechnology using *Streptomyces lividans*: large-scale production of functional trimeric tumor necrosis factor alpha. *Biotechnology and bioengineering*, 72(6), pp.611–619.

- Procópio, R.E.D.L. et al., 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 16(5), pp.466–71.
- Qi, X. et al., 2008. Expression, purification, and characterization of C-terminal amidated glucagon in *Streptomyces lividans*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(6), pp.1076–80.
- Rodríguez Couto, S. & Toca Herrera, J.L., 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology advances*, 24(5), pp.500–13.
- Van Roosmalen, M.L. et al., 2004. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochimica et biophysica acta*, 1694(1-3), pp.279–97.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sarrà Adroguer, M., 1994. *Producció d'un antibiòtic híbrid per fermentació amb cèl·lules lliures i immobilitzades de Streptomyces lividans TK21*. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Sarvas, M. et al., 2004. Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. *Biochimica et biophysica acta*, 1694(1-3), pp.311–27.
- Schaerlaekens, K. et al., 2004. Comparison of the Sec and Tat secretion pathways for heterologous protein production by *Streptomyces lividans*. *Journal of biotechnology*, 112(3), pp.279–88.
- Schaerlaekens, K., 2004. The importance of the Tat-dependent protein secretion pathway in *Streptomyces* as revealed by phenotypic changes in *tat* deletion mutants and genome analysis. *Microbiology*, 150(1), pp.21–31.
- Schaerlaekens, K. et al., 2001. Twin-Arginine Translocation Pathway in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, 183(23), pp.6727–6732.
- Selinheimo, E. et al., 2006. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, 43(2), pp.152–159.
- Servín-González, L. et al., 1994. Transcriptional regulation of the four promoters of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology (Reading, England)*, 140 ( Pt 1(1 994)), pp.2555–65.
- Sevillano, L. et al., 2012. Identification of the first functional toxin-antitoxin system in *Streptomyces*. *PLoS one*, 7(3), p.e32977.
- Sianidis, G. et al., 2006. Functional large-scale production of a novel *Jonesia* sp. xyloglucanase by heterologous secretion from *Streptomyces lividans*. *Journal of biotechnology*, 121(4), pp.498–507.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M. & Machonkin, T.E., 1996. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical reviews*, 96(7), pp.2563–2606.
- Stanier, R.Y., 1942. Agar-Decomposing Strains of the *Actinomyces coelicolor* species-group. *Journal of bacteriology*, 44(5), pp.555–570.
- Subramaniyan, S. & Prema, P., 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical reviews in biotechnology*, 22(1), pp.33–64.

- Takano, E. & Bibb, M.J., 1994. The stringent response, ppGpp and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Actinomycetologica*, 8(1), pp.1–16.
- Thompson, C.J., Fink, D. & Nguyen, L.D., 2002. Principles of microbial alchemy : insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biology*, 3(7), pp.1–4.
- Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, pp.19–26.
- Tremblay, D. et al., 2002. High-level heterologous expression and secretion in *Streptomyces lividans* of two major antigenic proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(1), pp.43–48.
- Vallin, C. et al., 2006. *Streptomyces* as host for recombinant production of *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 86(3-4), pp.198–202.
- Walsh, G., 2010. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature biotechnology*, 28(9), pp.917–24.
- Walsh, G., 2012. New Biopharmaceuticals. *BioPharm International*, 25(6), pp.34–38.
- Wang, X.-J. et al., 2010. Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchenggensis*. *Journal of bacteriology*, 192(17), pp.4526–7.
- Ward, J.M. et al., 1986. Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Molecular and General Genetics*, 203(3), pp.468–478.
- Widdick, D. a et al., 2008. A facile reporter system for the experimental identification of twin-arginine translocation (Tat) signal peptides from all kingdoms of life. *Journal of molecular biology*, 375(3), pp.595–603.
- Widdick, D. a et al., 2006. The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), pp.17927–32.
- Widsten, P. & Kandelbauer, A., 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(4), pp.293–307.
- Yoon, S.H., Kim, S.K. & Kim, J.F., 2010. Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Recent patents on biotechnology*, 4(1), pp.23–9.
- Yoshida, H., 1883. Chemistry of lacquer (Urushi). *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 43.
- Zeeb, B., Fischer, L. & Weiss, J., 2014. Stabilization of food dispersions by enzymes. *Food Funct.*, 5, pp.198–213.
- Zhang, Y., Wang, W.C. & Li, Y., 2004. Cloning, expression, and purification of soluble human interleukin-4 receptor in *Streptomyces*. *Protein expression and purification*, 36(1), pp.139–45.
- Zhu, Y. et al., 2011. Heterologous expression of human interleukin-6 in *Streptomyces lividans* TK24 using novel secretory expression vectors. *Biotechnology letters*, 33(2), pp.253–61.

