

tuada que en los geles de fermentación, así como que el número total de spots expresados es menor que en el caso de fermentación.

Se ha comprobado que las proteínas en ambos geles bidimensionales pertenecen fundamentalmente a la glicolisis, gluconeogénesis y biosíntesis de glicerol. Por otro lado, se han encontrado proteínas expresadas en medio oxidativo que no están presentes en medio de fermentación. Estas proteínas se relacionan con el estrés oxidativo y actualmente están siendo estudiadas. La mayoría de las proteínas cuantificadas se encuentran en la base de datos de SwissProt de *Saccharomyces cerevisiae* ([www.expasy.ch/sprot](http://www.expasy.ch/sprot)).

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA) proyecto RTA2008-00056-C02-02 y FEDER.

## Estudio proteómico comparativo de células de *Saccharomyces cerevisiae* libres y bioinmovilizadas

Teresa García-Martínez, Juan Carlos Mauricio

Departamento de Microbiología. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edificio Severo Ochoa

Tradicionalmente, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha usado en alimentación, principalmente por su producción de etanol en bebidas alcohólicas durante miles de años. La avanzada biotecnología de las células inmovilizadas en procesos fermentativos de interés aporta una serie de ventajas técnicas y económicas frente a los sistemas convencionales de células libres [1]. Nuestro grupo de investigación ha puesto a punto un sistema de bioinmovilización que consiste en una co-inmovilización espontánea de un hongo filamentoso (*Penicillium chrysogenum* H3) y una levadura (*Saccharomyces cerevisiae* G1), en ausencia de compuestos químicos de unión y de soportes externos, mediante la creación artificialmente de condiciones adecuadas para favorecer una simbiosis [2]. Al inmovilizado creado, que son esferas huecas de ambos microorganismos, lo hemos denominado "biocápsulas de levadura", y éstas pueden ser aplicadas a diversos procesos fermentativos. El objetivo

### Referencias

- [1] Cheng JS, Qiao B, Yuan YJ. Comparative proteome analysis of robust *Saccharomyces cerevisiae* insights into industrial continuous and batch fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 81:327-338.
- [2] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- [3] Kolkman A, Slijper M, J.R. Heck A. Development and application of proteomics technologies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in Biotechnol* 2005; 23:12.
- [4] Mathesius U, Keijzers S, Natera HA, Weinman JJ, Djordjevic MA, Rolfe BG. Establishment of a root proteoma reference map for the model legume *Medicago trunculata* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 2001;1:1424-1440.

de este trabajo ha sido realizar un estudio proteómico comparativo entre las células de levadura en forma libre y en forma bioinmovilizada en el medio de formación de las biocápsulas de levadura.

Los microorganismos usados en este estudio han sido una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis* G1, aislada de un vino bajo crianza biológica de la D.O. Montilla-Moriles y un hongo, *Penicillium chrysogenum* H3, aislado del ambiente. El medio de cultivo y las condiciones en las que se produjo la bioinmovilización fueron: medio YNB que contiene ácido glucónico como fuente de carbono, amonio como fuente de nitrógeno y tamponado a pH 7. Dos matraces Erlenmeyer de 250 mL con 150 mL de medio de formación de biocápsulas se inocularon con  $4 \times 10^6$  células de G1/mL y un asa de siembra del hongo H3. Se incubaron a 28°C en un agitador orbital a 200 rpm durante 7 días, formándose durante este

tiempo las biocápsulas de levadura. Para el estudio de las células de levadura libres se procedió de la misma manera sin la inoculación del hongo filamentoso. Las células de levadura inmovilizadas se extrajeron del inmovilizado por rotura mecánica y agitación vigorosa en una solución de NaCl 100 mM, posteriormente las células de levadura se separaron de las hifas por dos filtraciones sucesivas (primero por un filtro Millipore de 180  $\mu\text{m}$  y después por otro de 30 $\mu\text{m}$ ). Ambos tipos de células de levadura se recogieron por centrifugación a 3000  $\times g$  a 4° C durante 10 minutos. La lisis celular tanto de las células de levadura libres como las procedentes del inmovilizado se realizó en un Vórtex- Genie2 con DTT, bolas de vidrio, y los tampones 1 y 2 necesarios para la extracción de las proteínas. Tampón 1: SDS (5%); TRIS-HCl (0.5 M); pH 7.5 y tampón 2: Thiourea (2 M); urea (7 M); CHAPS (4 %); DTT (1%); Pharmalite 3-10 (2 %) [3]. La precipitación de proteínas se hizo con Tricloroacético (TCA) al 10% diluido en acetona fría. La concentración de proteínas de los extractos celulares se determinó mediante el método descrito por Bradford [4]. Se realizó una electroforesis bidimensional: para la primera dimensión se utilizaron tiras IPG de 17 cm, con gradiente de pH no lineal +N3-10 (Bio-Rad) fueron rehidratadas con 150  $\mu\text{g}$  de proteína en 300  $\mu\text{L}$  de tampón de solubilización. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en un PROTEAN IEF CELL (Bio-Rad) a una corriente constante de 50  $\mu\text{A}$  *per* tira hasta 40 000 Vh. Para la segunda dimensión (SDS-PAGE), las proteínas se separaron en geles al 13% de poliacrilamida en un PROTEAN II CELL. Los geles corrieron a una corriente constante a 60 mA *per* gel. Los geles preparativos fueron teñidos con CBB G-250 [5] (Merck, Germany). La identificación de las proteínas se realizó en la Unidad de Proteómica, de la UCO, miembro de ProteoRed, usando MALDI-TOF para su identificar en la Base de Datos de Swiss-Prot y Trembl del Proteoma de Levaduras de *S.cerevisiae*, ([www.expasy.ch/sprot](http://www.expasy.ch/sprot)). Los geles se analizaron mediante el programa PD-Quest 8.0.1 (Bio-Rad).

Después de 7 días, la levadura libre en el medio de formación de biocápsulas solamente se dividió una vez (una generación), lo que era de esperar puesto que este medio no es fermentativo para la levadura. Sin embargo, la levadura inmovilizada creció algo más, seguramente a expensas del hongo filamentoso.

El número de spots encontrados en los geles de las células libres de levadura fue aproximadamente del doble de los observados en los geles de las células de levadura inmovilizadas. Esta gran disminución

en el nivel de proteínas de las células inmovilizadas puede ser debido a que la levadura reduzca su síntesis porque vive a expensas del hongo filamentoso en forma de simbiosis. La totalidad de las proteínas cuantificadas se encuentran en la base de datos de SwissProt de *Saccharomyces cerevisiae* y en ambos casos abundan las proteínas de la glicolisis. En células bioinmovilizadas, se observa una disminución de proteínas básicas de bajo peso molecular. En la actualidad, se está continuando con el análisis de proteínas de estos geles en estas dos condiciones ensayadas.

En conclusión, el análisis proteómico de ambos geles bidimensionales muestra una disminución importante del número de spots en las células de levadura co-inmovilizadas con el hongo filamentoso. La mayor disminución corresponde a proteínas básicas de bajo peso molecular.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA) proyecto RTA2008-00056-C02-02 y FEDER.

## Referencias

- [1] Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas AA. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol* 2004;21:377-397.
- [2] Peinado RA, Moreno JJ, Villalba JM, González-Reyes JA, Ortega JM, Mauricio JC. Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enz Microb Technol* 2006;40:79-84.
- [3] Khoudoli GA, Porter IM, Blow JJ, Swedlow, R. Optimisation of the two-dimensional gel electrophoresis protocol using the Taguchi approach. *Proteome Sci* 2004;2:6.
- [4] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- [5] Mathesius U, Keijzers S, Natera HA, Weinman JJ, Djordjevic MA, Rolfe BG. Establishment of a root proteoma reference map for the model legume *Medicago trunculata* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 2001;1:1424-1440.