

*B) Proteómica de Hongos***Análisis comparativo del proteoma de una cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* en dos condiciones de cultivo**

Carlos Luna¹, Teresa García-Martínez¹, Miguel Curto², Juan Carlos Mauricio¹

¹Departamento de Microbiología. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edificio Severo Ochoa

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los organismos modelo utilizados en Biología Molecular, y además es un organismo que tiene un gran valor comercial. La mayoría de los estudios sobre proteómica de levadura se ha realizado sobre cepas de laboratorio, y existen pocos datos sobre levaduras de interés industrial. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo anaerobio facultativo. Durante el proceso de fermentación, la levadura se adapta fisiológicamente a distintos estreses, como son elevada presión osmótica, agotamiento de la fuente de carbono como la glucosa y la aparición de etanol, que le es tóxico. Durante la fermentación alcohólica, Cheng y colaboradores [1] han identificado enzimas implicadas en las rutas de las pentosas fosfato, glicolisis, gluconeogénesis, biosíntesis del glicerol y también proteínas de choque térmico. El objetivo de este estudio ha sido comparar el perfil proteómico de una levadura industrial en dos medios de cultivo: medio fermentativo con glucosa y medio oxidativo con glicerol y etanol.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* G1, aislada de un vino de la D.O Montilla-Moriles, creció en dos condiciones: en un medio fermentativo, medio completo YPD compuesto por 17% de glucosa, 1% de extracto de levadura, 2% peptona bacteriológica; y en un medio oxidativo formado por 0.67% de YNB, ácido glutámico 10mM, 1% de glicerol y 15% de etanol. Finalizado el experimento, las células de levadura se recogieron por centrifugación a 3.000 x g a 4° C durante 10 minutos. Posteriormente, se realizó una lisis física con bolas de vidrio y una lisis química con 20 ml totales de tampón de extracción compuesto por tampón Tris 100 mM, a pH 8,0, PMSF 1mM, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, y un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche). El extracto de proteínas se precipitó con TCA-Acetona-DTT 0.07% durante 24 horas a -20°C. Se resuspendió en tampón de solubilización (Urea 8M, 2% CHAPS

y DTT 20mM). La cuantificación de proteínas se determinó mediante el método Bradford [2]. IEF-2D: Se utilizaron tiras con gradientes de pH inmovilizados (IPG) de 17 cm, de gradiente no lineal 3-10, (Bio-Rad). Se rehidrataron pasivamente durante 2 horas con 500 µg de proteína en 300 µL de tampón de solubilización (Urea 8M; 2% CHAPS; 0,5% tampón IPG 5-8, 3-10, 30 mM DTT, y azul de bromofenol 0.01%) [3]. Las tiras se cargaron en IEF CELL (Bio-Rad) para ser enfocadas por su punto isoeléctrico con un programa específico. Los geles de poliacrilamida al 13% fueron sometidos a electroforesis en PROTEAN II CELL. Los geles fueron teñidos con azul de coomassie G-250 durante 24 h por el método descrito por Mathesius y colaboradores [4]. Las imágenes fueron adquiridas con un densitómetro GS-800 calibrado y se analizaron con el software PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad). Se calcularon los puntos isoeléctricos según la distribución de las tiras, y los pesos moleculares según el patrón de pesos obtenidos y reflejados en los geles con los marcadores correspondientes. Ciertos spots obtenidos tanto en fermentación como en medio oxidativo están secuenciados mediante MALDI-TOF/TOF en el Centro de Genómica y Proteómica - Unidad de Proteómica - Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid-Parque Científico de Madrid (UCM-PCM).

Hemos obtenidos 477±20 spots en geles de fermentación. En el caso geles de medio oxidativo se han cuantificado 337±20 spots totales.

Se han identificado 281±20 spots que están presentes tanto en los geles correspondientes al medio de fermentación como en los geles pertenecientes al medio oxidativo, éstos son los spots comunes.

Se ha observado que la expresión de los spots en geles de medio oxidativo está mucho menos acen-

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).

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 4×10^6 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