



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**"Inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308: caracterización, clonado,
sobreexpresión, y aplicación en procesos biotecnológicos"**

Tesista: Lic. Mariana Chesini

Director: Dr. Sebastián Cavalitto

Co-Director: Dra. Natalia Lorena Rojas

Año: 2020

El presente trabajo de tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas fue realizado en el Centro de Investigaciones y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, con el financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a todas las personas que me han acompañado estos años y a las que debo, por distintas razones importantes, haber conseguido llevar a cabo esta tesis.

A mis directores, Sebastián Cavalitto y Lorena Rojas, por darme su confianza desde el principio y ejemplo, día tras día. Por ofrecerme la oportunidad de trabajar con ellos, y haber encontrado siempre tiempo para ayudarme.

A Roque Hours que me permitió ingresar al CINDEFI e iniciarme en la investigación.

A Ivana Cavello por su respaldo incondicional y permanente. Por todo el trabajo y artículos compartidos.

A Pablo Ghiringhelli y Diego Baruque, por su rigor y generosidad en la colaboración, sin la que gran parte de esta tesis no habría existido.

A Carolina y Marina que me ayudaron en la última etapa de esta tesis, cuando volvía de trabajar.

A todos mis compañeros del CINDEFI que estuvieron compartiendo muchas horas conmigo.

A la empresa BIOSIDUS y a mis compañeros de trabajo.

A mi familia por quererme y apoyarme siempre.

A Carlitos y Amadeo porque sin ellos nada sería importante.

Por fin!!!! Gracias a todos

Parte de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral han sido publicados en las siguientes revistas científicas:

- (2018) Mariana Chesini, Evelyn Wagner, Diego Baruque, Carolina Vita, Sebastián Cavalitto, Pablo Ghiringhelli, Natalia Rojas. High level production of a recombinant acid stable exoinulinase from *Aspergillus kawachii*. Protein Expression and Purification. 147:29-37

- (2013) Mariana Chesini, Lorena Neila, Dante Fratebianchi de la Parra, Natalia Rojas, Juan Carlos Contreras Esquivel, Sebastián Cavalitto, Pablo Ghiringhelli, Roque Hours. *Aspergillus kawachii* produces an inulinase in cultures with yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as substrate. Electronic Journal of Biotechnology, Vol 16, Número 3.

Además, se ha presentado una patente "Proceso de hidrólisis enzimática de fructanos mediante el uso de una β -fructofuranosidasa o inulinasa del hongo *Aspergillus kawachii*" (2016). Folio: MX/E/2016/091039. Co-inventor.

"Todo parece imposible hasta que se hace"

Nelson Mandela

Índice de contenidos

Índice de contenidos	4
Abreviaturas	15
RESUMEN	17
INTRODUCCIÓN	20
1. Generalidades	20
2. Fructanos	21
3. Inulina	22
4. Fructooligosacáridos	24
5. Inulinasas	25
5.1. Actividad invertasa	27
5.2. Actividad fructosiltransferasa	27
5.3. Aplicaciones	29
6. Microorganismos que producen inulina	30
6.1. Inulinasas de levaduras	30
6.2. Inulinasas de bacterias	31
6.3. Inulinasas de hongos filamentosos	32
6.4. Caracterización molecular de genes de inulinasas	32
7. <i>Aspergillus kawachii</i>	33
8. Procesos de producción de inulinasas	34
8.1. Sustratos para la producción de inulinasas	35
9. Purificación de inulinasas	38
10. Propiedades bioquímicas	39
11. Clonado y expresión de genes	41
12. Sistema de expresión: <i>Pichia pastoris</i>	42
12.1. Vectores de expresión en <i>Pichia pastoris</i>	44
13. Cultivo de <i>Pichia pastoris</i> recombinante	46
14. Inmovilización de enzimas	47
OBJETIVOS	50
Objetivo general	50
Objetivos específicos	50
MATERIALES Y MÉTODOS	51
1. Cepas microbianas	51
2. Vectores de clonado y expresión	51

3. Medios de cultivo, sales traza y buffers	54
4. Producción de inulinasa silvestre	55
4.1. Propagación del inóculo <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	55
4.2. Ensayo cualitativo de la producción de inulinasa	56
4.3. Preparación del sustrato	56
4.3.1. Determinación de azúcares totales solubles	57
4.3.2. Determinación de azúcares reductores	57
4.4. Cultivo de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308 en medio líquido	57
4.4.1. Efecto de fuentes de carbono y energía	58
4.4.2. Efecto de la naturaleza de las fuentes de nitrógeno	59
4.4.3. Efecto de la temperatura	59
4.4.4. Efecto del pH	59
4.4.5. Efecto de la variación del inóculo	59
4.4.6. Cultivo en matraces <i>Erlenmeyer</i> en las condiciones mejoradas	60
4.4.7. Cultivo en biorreactor en las condiciones mejoradas	60
4.5. Caracterización bioquímica del extracto enzimático	60
4.5.1. Estabilidad térmica	61
4.5.2. Estabilidad frente a diferentes pH	61
4.5.3. Estudio del pH óptimo	61
4.5.4. Efecto de los iones metálicos y agentes estabilizantes	61
4.5.5. Modo de acción de la enzima frente a la hidrólisis de inulina	62
5. Producción de inulinasa recombinante	62
5.1. Métodos generales	62
5.1.1. Electroforesis en gel de agarosa	63
5.1.2. Preparación de células de <i>E. coli</i> DH5 α competentes	63
5.1.3. Preparación de <i>E. coli</i> TOP10 electrocompetentes	63
5.1.4. Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina	64
5.1.5. Preparación de células competentes de <i>Pichia pastoris</i>	64
5.2. Estrategias de clonado del gen inulinasa	65
5.2.1. Estrategia de clonado del gen inulinasa a partir de ARN	65
5.2.1.1. Extracción de ARN de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	66
5.2.1.2. Síntesis del ADN complementario	66
5.2.1.3. Amplificación del gen correspondiente a la inulinasa	67
5.2.2. Estrategia de clonado del gen inulinasa a partir de ADN	68
5.2.2.1. Extracción del ADN genómico de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	69
5.2.2.2. Amplificación del gen inulinasa sin péptido señal	69

5.2.2.3. Clonado del gen inulinasa con intrón en pPIC9	70
5.2.2.3.1. Transformación y selección de clones positivos <i>E. coli</i> DH5 α	72
5.2.2.3.2. Confirmación del marco abierto de lectura	72
5.2.2.3.3. Transformación de células de <i>Pichia pastoris</i> GS115	72
5.2.2.3.4. Cultivo de <i>Pichia pastoris</i> en matraces <i>Erlenmeyer</i>	73
5.2.2.3.5. Análisis del cultivo de <i>Pichia pastoris</i>	73
5.2.2.3.6. Análisis bioinformático del corte y empalme	74
5.2.2.4. Estrategia de clonado del gen inulinasa sin intrón en pPICZ α A	74
5.2.2.4.1. Diseño de primer para eliminar el intrón del gen inulinasa	74
5.2.2.4.2. Clonado del gen inulinasa sin intrón en el plásmido pPICZ α A	75
5.2.2.4.3. Transformación en <i>Pichia pastoris</i> GS115 y X-33	77
5.2.2.4.5. Verificación de la expresión de la inulinasa y selección del clon	78
5.3. Cultivo de alta densidad celular	78
5.4. Purificación de la inulinasa recombinante	80
5.5. Caracterización de la inulinasa recombinante	81
5.5.1. Determinación del punto isoeléctrico	82
5.5.2. Determinación de parámetros cinéticos K_M y $V_{m\acute{a}x}$	82
5.6. Ensayos para aplicaciones de la inulinasa recombinante	82
5.6.1. Evaluación de la actividad fructosiltransferasa	82
5.6.2. Hidrólisis de fructanos de agave	83
5.6.3. Inmovilización de la inulinasa recombinante	83
5.6.3.1. Preparación y activación de esferas de quitosán	83
5.6.3.2. Inmovilización de la enzima inulinasa	84
5.6.3.3. Efecto del tiempo de inmovilización	85
5.6.3.4. Efecto de la carga de la enzima	85
5.6.3.5. Efecto del pH óptimo y termoestabilidad de la enzima inmovilizada	85
5.6.3.6. Reutilización de la enzima inmovilizada	86
5.6.3.7. Hidrólisis de la inulina con la inulinasa recombinante inmovilizada	86
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
CAPÍTULO 1: OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE INULINASA SILVESTRE	88
1. Caracterización del extracto y bagazo de yacón	89
2. Ensayo cualitativo de la producción de inulinasa	89
3. Evaluación de las condiciones de crecimiento de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308 en medio líquido	90
3.1. Efecto de las FCE	90

3.1.1. Evaluación de la concentración óptima de extracto de yacón	92
3.1.2. Efecto de las FCE combinadas con extracto de yacón	93
3.2. Efecto de las FN	94
3.2.1. Evaluación de la concentración óptima de extracto de levadura	95
3.3. Efecto de la temperatura y el pH	96
3.4. Efecto del tamaño del inóculo en la producción enzimática	97
3.5. Cultivo en matraces <i>Erlenmeyer</i> en las condiciones mejoradas	98
3.6. Cultivo en biorreactor en las condiciones mejoradas	99
4. Caracterización bioquímica del extracto enzimático	101
4.1. Efecto del pH y la temperatura	102
4.2. Estudio del pH óptimo	104
4.3. Efecto de los iones metálicos sobre la estabilidad de la inulinasa	105
4.4. Efecto de agentes estabilizantes en la producción enzimática	106
4.5. Modo de acción de la enzima en la hidrólisis de inulina	107
Conclusiones del capítulo	108
CAPÍTULO 2. CLONADO DEL GEN INULINASA DE <i>ASPERGILLUS KAWACHII</i> IFO 4308 EN <i>PICHIA PASTORIS</i>	110
1. Búsqueda bioinformática	111
1.1. Estrategia de clonado a partir de ARN	113
1.1.1. Extracción de ARN total	113
1.1.2. Síntesis de ADNc	114
1.2. Clonado del gen inulinasa a partir de ADN	114
1.2.1. Extracción del ADN genómico de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	114
1.2.2. Amplificación del gen inulinasa	115
1.2.3. Amplificación del gen inulinasa sin péptido señal	117
1.2.4. Clonado del gen inulinasa con intrón en el vector de expresión pPIC9	118
1.2.5. Clonado del gen inulinasa sin intrón en pPIC α A	125
1.2.6 Transformación de <i>Pichia pastoris</i> con el gen inulinasa de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	130
1.2.7. Selección del clon	131
Conclusiones del capítulo	133
CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE LA INULINASA EN CULTIVOS DE ALTA DENSIDAD, INMOVILIZACION Y POSIBLES APLICACIONES	135
1. Cultivo en biorreactor	136
2. Purificación de la inulinasa recombinante	142
3. Caracterización de la inulinasa recombinante	145
4. Ensayos para aplicaciones de la inulinasa recombinante	149

4.1 Actividad fructosiltransferasa	149
4.2 Hidrólisis de fructanos de agave	152
4.3. Inmovilización de la enzima inulinasa en esferas de quitosán	154
4.3.1. Activación de esferas de quitosán	154
4.3.2. Efecto del tiempo en la inmovilización enzimática	158
4.3.3. Efecto de la carga enzimática en la inmovilización	158
4.3.4. Hidrólisis de inulina	163
Conclusiones del capítulo	164
CONCLUSIONES GENERALES	166
BIBLIOGRAFÍA	168
APÉNDICES	183
APENDICE 1 (Capítulo II)	183
1. Alineamiento de secuencia de gen inulinasa de <i>A. kawachii</i> y <i>A. awamori</i>	183
2. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de <i>A. kawachii</i> IFO 4308 y secuencias aminoacídicas de hongos cercanos filogenéticamente	187
APÉNDICE 2 (Capítulo II)	189
Informes de los resultados del análisis de las proteínas expresadas en <i>Pichia pastoris</i> por Mapeo peptídico realizados en el Instituto Pasteur de Montevideo	189
APÉNDICE 3 (Capítulo III)	196
Cultivo de <i>Pichia pastoris</i> en biorreactor de 5 l. Resultados de las mediciones realizadas	196

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química del levano (A) y la inulina (B)	22
Figura 2. Exo y endoinulinasas (A) Sitios activos y (B) productos de reacción.....	26
Figura 3. Presentación esquemática de la producción de FOS a partir de inulina por endoinulinasas y a partir de sacarosa por β -fructofuranosidasa.....	27
Figura 4. Estructura química de los más importantes FOS	28
Figura 5. Diagrama esquemático que muestra las aplicaciones de las inulinasas	29
Figura 6. Fotografía de plantas y raíces del yacón	36
Figura 7. Vía metabólica para la oxidación del metanol en levaduras.....	43
Figura 8. Integración en el genoma de <i>Pichia pastoris</i> , mediante (A, B) inserción de genes y (C) reemplazo de genes	46
Figura 9. Métodos reversibles de inmovilización enzimática	48
Figura 10. Métodos irreversibles de inmovilización enzimática	48
Figura 11. Esquema del vector de expresión pPIC9	52
Figura 12. Esquema del vector de expresión pPICZ α A.....	53
Figura 13. Esquema del vector de clonación pGEM [®] -T Easy	54
Figura 14. Las imágenes muestran el procedimiento de extracción del extracto del yacón, su aspecto y el sólido remanente (bagazo) luego del procedimiento	56
Figura 15. Diagrama de flujo de estrategias de clonado del gen inulinasa de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308.....	65
Figura 16. Imagen macroscópica del crecimiento de <i>Aspergillus kawachii</i> en medio APD e imágenes obtenidas de la observación microscópica con objetivo de 10X y 40X.....	90
Figura 17. Imagen de actividad inulinasa en placa de medio APD más inulina	90
Figura 18. Efecto de la actividad inulinasa en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono y energía.....	91
Figura 19. Concentración óptima de yacón para la producción de inulinasa de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	93
Figura 20. Evaluación de la producción de inulinasa en FCE combinadas con extracto de yacón....	93
Figura 21. Efecto de diferentes FN en la producción de inulinasa de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	94
Figura 22. Concentración óptima de extracto de levadura.....	95
Figura 23. Perfil de cultivo de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308 en matraces <i>Erlenmeyer</i> en condiciones mejoradas por metodología de una variable a la vez	99

Figura 24. Perfil de cultivo de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308 en biorreactor en condiciones óptimas por la metodología de una variable a la vez	100
Figura 25. Perfil de actividad inulinasa de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308 en diferentes escalas de cultivo	101
Figura 26. Estabilidad de la inulinasa de <i>Aspergillus kawachii</i> frente a diferentes valores de pH .	102
Figura 27. Estabilidad de la enzima inulinasa frente a diferentes temperaturas	103
Figura 28. Actividad de la enzima inulinasa a diferentes valores de pH	104
Figura 29. Efecto de los iones metálicos sobre la actividad de la inulinasa	105
Figura 30. Estabilidad de la inulinasa a 65 °C y frente a agentes estabilizantes	106
Figura 31. Cromatograma de los productos de hidrólisis de inulina	108
Figura 32. Secuencia aminoacídica de la secuencia de la inulinasa <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	111
Figura 33. Localización del sitio de clivaje del péptido señal en la secuencia del gen inulinasa de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308.....	112
Figura 34. Esquema del gen que codifica para la enzima inulinasa de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	112
Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa 1 % del ARN extraído del cultivo de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	113
Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa 1% del ADN genómico extraído de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	115
Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la amplificación del gen inulinasa de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	116
Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de la digestión del gen inulinasa con la enzima <i>BsrDI</i> y gel simulado con el programa <i>Snappgene</i>	117
Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa 1 % a diferentes condiciones de temperatura de apareamiento y concentración de ADN genómico.	118
Figura 40. Esquema de clonado del gen inulinasa amplificado con los primers P3 y P2 en pPIC9 generando el plásmido pPIC9: inuAKΔPS	119
Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de los productos de digestión del plásmido pPIC9 y del gen de inulinasa con las enzimas <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i>	119
Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de los productos de amplificación del gen inulinasa en 16 clones de <i>E. coli</i> pPIC9: inuAKΔPS	120
Figura 43. Esquema de integración del plásmido linealizado en el genoma de <i>Pichia pastoris</i>	121
Figura 44. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por colony-PCR de los clones de <i>Pichia pastoris</i> Ppic9: inuAKΔPS	122

Figura 45. SDS- PAGE de las proteínas producidas por cada uno de los clones de <i>Pichia pastoris</i> Ppic9: inuAKΔPS a las 24 y 48 hs de cultivo respectivamente	123
Figura 46. Esquema de clonado del exón I amplificado con los primers P3 y P4 en pGEM®-T Easy generando el plásmido pGEM®-T Easy: exón I	126
Figura 47. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos obtenidos por colony-PCR de los clones <i>E. coli</i> pGEM®-T Easy: exón I, utilizando los primers P2 y P4.....	127
Figura 48. Electroforesis en gel de agarosa 1,5 % (A) de la digestión de la construcción pGEM®-T Easy: exón I y gel simulado con el programa Snappgene.....	127
Figura 49. Esquema de clonado del gen inulinasa sin intrón en pPICzαA. A: Obtención del exón I mediante digestión del plásmido pPIC9: inuAKΔPS con las enzimas <i>XhoI</i> y <i>BsrDI</i> . B: Obtención del exón II mediante digestión del plásmido pGEM T Easy: Exón 1 con las enzimas <i>BsrDI</i> y <i>NotI</i> . C: clonado de exón I y exón II en pPICzαA generando el plásmido recombinante pPICzαA: inuAKΔPSΔI	128
Figura 50. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la digestión de la construcción pPIC9: inuAKΔPS con las enzimas <i>BsrDI</i> y <i>NotI</i>	129
Figura 51. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de productos de Colony PCR de clones de <i>E. coli</i> TOP 10F': pPICZαA: inuAKΔPSΔI	130
Figura 52. Colony-PCR de <i>Pichia pastoris</i> conteniendo el gen de Inulinasa de <i>Aspergillus kawachii</i>	131
Figura 53. Perfil de consumo de O ₂ y generación de CO ₂ en función del tiempo del cultivo de <i>Pichia pastoris</i> recombinante en biorreactor	138
Figura 54. Perfil de fermentación en función del tiempo del cultivo de <i>Pichia pastoris</i> recombinante en biorreactor	138
Figura 55. Electroforesis SDS-PAGE de la inulinasa recombinante producida por <i>Pichia pastoris</i> en biorreactor	139
Figura 56. Actividad inulinasa recombinante en función del tiempo de inducción	140
Figura 57. Perfil de elución en resina Q Sepharose HP con gradiente salino	143
Figura 58. Electroforesis SDS-PAGE de la inulinasa recombinante purificada de <i>Aspergillus kawachii</i> producida en <i>Pichia pastoris</i>	144
Figura 59. Isoelectroenfoco de la inulinasa recombinante purificada de <i>Aspergillus kawachii</i> producida en <i>Pichia pastoris</i>	145
Figura 60. (A) Estabilidad de la inulinasa recombinante purificada de <i>Aspergillus kawachii</i> producida en <i>Pichia pastoris</i> (B) Influencia del pH en la actividad de la enzima recombinante purificada	146
Figura 61. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la inulinasa recombinante purificada de <i>Aspergillus kawachii</i> producida en <i>Pichia pastoris</i>	147

Figura 62. Gráfico de Lineweaver-Burk para estimar los parámetros cinéticos de la inulinasa recombinante usando inulina como sustrato	149
Figura 63. Perfil de HPLC obtenido del producto de la actividad fructosiltransferasa a partir de sacarosa.....	150
Figura 64. Esquema del sistema de inmovilización utilizado	154
Figura 65. Superficie de respuesta para la inmovilización de enzimas en función de la concentración de glutaraldehído y el tiempo de activación para la inmovilización de inulinasa de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308 producida en <i>Pichia pastoris</i> , en esferas de quitosán	157
Figura 66. Efecto del tiempo en la inmovilización de la inulinasa recombinante.....	158
Figura 67. Efecto de la carga enzimática sobre la actividad inulinasa recombinante inmovilizada y el porcentaje de inmovilización	159
Figura 68. Actividad enzimática residual de la enzima inulinasa recombinante libre e inmovilizada	160
Figura 69. Reutilización de inulinasa recombinante inmovilizada en esferas de quitosán.....	162
Figura 70. Porcentaje de hidrólisis utilizando inulina como sustrato, de inulinasa recombinante libre e inmovilizada en esferas de quitosán	163

Índice de tablas

Tabla 1. Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales	23
Tabla 2. Composición nutricional del yacón en base a materia seca.....	37
Tabla 3. Muestra reacción, control enzima y control sustrato	58
Tabla 4. Proporciones de componentes de la mezcla de reacción para RT-PCR	67
Tabla 5. Primers y sitios de reconocimiento introducidos por clonado.....	67
Tabla 6. Proporciones de componentes en la mezcla de reacción de PCR para un volumen de reacción de 50 µl	68
Tabla 7. Secuencia del primer P3	69
Tabla 8. Proporciones de componentes en la mezcla de reacción de PCR.....	70
Tabla 9. Relaciones molares vector: inserto para la reacción de ligación	71
Tabla 10. Secuencia del primer P4 para eliminar el intrón	75
Tabla 11. Proporciones de componentes en la mezcla de reacción de PCR.....	75
Tabla 12. Relaciones molares vector: inserto ensayadas para la reacción de ligación.....	76
Tabla 13. Datos cuantitativos de los factores y la respuesta utilizados.....	84
Tabla 14. Valor de pH y composición de azúcares totales y reductores en extracto y bagazo de yacón	89
Tabla 15. Actividad inulinasa a diferentes temperaturas	96
Tabla 16. Actividad inulinasa a diferentes valores de pH	97
Tabla 17. Actividad inulinasa a diferentes concentraciones de inóculos.....	98
Tabla 18. Vida media y K_d de la inulinasa de <i>Aspergillus kawachii</i> en presencia de termoestabilizantes.....	107
Tabla 19. Identificación por espectrometría de masa de las proteínas producidas por los clones de <i>Pichia pastoris</i> Ppic9: inuAKΔPS	123
Tabla 20. Análisis bioinformático de corte y empalme en <i>Aspergillus</i> spp.....	124
Tabla 21. Análisis bioinformático de corte y empalme en levaduras	124
Tabla 22. Evaluación de la producción de inulinasa recombinante en matraces <i>Erlenmeyer</i> a las 48 h de inducción	132
Tabla 23. Ejemplos exitosos de producción de inulinasas recombinantes	141
Tabla 24. Análisis de los pasos implicados en la purificación de la inulinasa recombinante	143
Tabla 25. Efecto de los cationes metálicos a una concentración de 1 mM en la actividad de la inulinasa recombinante de <i>Aspergillus kawachii</i>	148
Tabla 26. Análisis de hidrólisis de fructanos de agave en función del tiempo.....	152

Tabla 27. Máximos porcentajes de hidrólisis en jugos de agave crudos para inulinasa de <i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308 producida en <i>Pichia pastoris</i> y células permeabilizadas de <i>K. marxianus</i> NRRL Y-5088.....	153
Tabla 28. Diseño central compuesto del porcentaje de inmovilización de la enzima recombinante	155

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
AOX	Alcohol oxidasa
APD	Agar papa dextrosa
BCP	Buffer citrato fosfato
BMGY	Medio complejo con glicerol amortiguado
BMMY	Medio complejo con metanol amortiguado
BSA	Albúmina de suero Bovino
DEPC	Dietil pirocarbonato
DO _{600 nm}	Densidad óptica a 600 nm
DP	Grado de polimerización
DNS	Acido 3,5-dinitrosalisílico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilendiaminotetra-acético
EI	Enzima inmovilizada
FCE	Fuente de carbono y energía
FN	Fuente de nitrógeno
FOS	Fructooligosácaridos
Fw	Forward
GF	Oligómeros de fructanos
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
IE	Inmovilización enzimática
IEF	Isoelectroenfoque
K _M	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria Bertani
MD	Medio mínimo dextrosa
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Retrotranscripcion-PCR
PI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
Rv	Reverse
SDS	Dodecil sulfato de sodio

TFA	Ácido Tri-fluoroacético
TLC	Cromatografía en capa fina
USA	Estados Unidos
V_{\max}	Velocidad máxima
YPD	Levadura peptona dextrosa
YNB	Solución base de nitrógeno para levaduras

RESUMEN

El presente trabajo de tesis doctoral describe la caracterización, clonado, sobreexpresión, y aplicación en procesos biotecnológicos de una inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308.

Las inulinasas son enzimas que actúan sobre los enlaces β -(2→1) fructano en la inulina presentes en muchos vegetales. Es por ello, que el aprovechamiento de la actividad catalítica de estas enzimas es de gran interés en numerosas aplicaciones biotecnológicas como la producción de fructosa, de fructooligosacáridos, bioetanol, 2,3-butanodiol, ácido láctico, jarabe de sorbitol, ácido glucónico, manitol, entre otros. Los microorganismos son las mejores fuentes para la producción de inulinasas debido a su fácil cultivo y alta producción de enzima, en comparación con los vegetales. El género *Aspergillus* ha sido reportado como uno de los mayores productores de inulinasa. En general, estos microorganismos que producen enzimas de interés industrial lo hacen en niveles muy bajos, por lo tanto, se hace necesario incrementar estos rendimientos para lograr una mayor rentabilidad de los procesos. Una forma de mejorar el rendimiento es mediante la optimización del medio de cultivo y de las condiciones de operación, pero esto está limitado por la capacidad de síntesis máxima del producto deseado que tiene el organismo. Otra posibilidad es la producción de la enzima en sistemas recombinantes para lograr la obtención de altas cantidades requeridas en la industria. El sistema de expresión de *Pichia pastoris* ha mostrado gran eficiencia en la producción de enzimas y fue el utilizado en este trabajo de tesis.

La presencia de inulina en los tubérculos de yacón despertó el interés por utilizar esta raíz andina, cultivada en el norte argentino, como sustrato para la producción de la enzima, como alternativa a las materias primas comerciales actuales y en el horizonte de revalorar la producción regional de este producto. Se comenzó con el estudio de la producción de inulinasa utilizando la cepa *Aspergillus kawachii* IFO 4308. Para aumentar la producción de la enzima se estudió el efecto de diferentes fuentes de carbono y energía individualmente o en combinación con yacón, fuentes de nitrógeno, así como los parámetros del proceso: concentración de inóculo, temperatura y pH inicial. Se utilizó una

estrategia de optimización del medio de cultivo de una variable a la vez, así se logró duplicar la actividad enzimática, que alcanzó un valor de $92,3 \pm 0,5$ mU/ml a las 72 h de cultivo (productividad = $1,28$ U/l/h). En escala de biorreactor la actividad inulinasa fue de $124,1 \pm 2,1$ mU/ml a las 48 h de cultivo (productividad = $2,58$ U/l/h), en las mismas condiciones, lo que significó un incremento de 1,3 veces con respecto al cultivo en matraz *Erlenmeyer*. La inulinasa producida por *Aspergillus kawachii* IFO 4308 presentó pH óptimo de 3 y resultó ser estable a una temperatura de 65 °C por 180 minutos, donde retuvo el 20 % de la actividad residual.

Estas características plantearon la posibilidad de estudiar su aplicación en procesos industriales, sin embargo, la baja productividad del proceso completo llevó a considerar una estrategia de clonado y la sobreexpresión para hacer este proceso más adecuado para sus potenciales demandas y aplicaciones industriales. Se llevaron adelante tres estrategias de clonado, una a partir de ARN y dos a partir de ADN, una utilizando el gen inulinasa con intrón en pPIC9 y la otra utilizando el gen inulinasa sin intrón, eliminado *in vitro*, en pPICZαA. Con esta última estrategia se logró expresar la inulinasa genéticamente modificada que se produjo con éxito en fermentaciones en biorreactor, alcanzando $622,4$ U/ml y una productividad de $25933,3$ U/l/h después de 69 h un cultivo. Resultó funcional con niveles de producción de actividad enzimática 5000 veces más a los reportados por el organismo silvestre. La enzima recombinante resultó una exoinulinasa con actividad fructosiltransferasa y presentó las mismas propiedades bioquímicas que la enzima nativa.

Con la finalidad de mejorar tanto las propiedades de la enzima, como la productividad del proceso, se estudió la inmovilización covalente de la inulinasa recombinante en esferas de quitosán optimizando la concentración de un agente entrecruzante, glutaraldehído, y el tiempo de activación de las esferas mediante un diseño factorial. Se consiguió aumentar la estabilidad operacional de la enzima que retuvo 40 % actividad residual a 65 °C durante 180 minutos, lo que posibilita una ventaja adicional en su campo de acción. El enlace formado entre la inulinasa recombinante y el quitosán resultó ser lo suficientemente estable para evitar desprendimientos de la enzima y con ello mantener la eficiencia catalítica del sistema durante 12 ciclos de uso.

Finalmente, se estudiaron las condiciones de aplicación, la producción de FOS partir de sacarosa y la hidrólisis de fructano de agave a partir de subproductos de la industria. Se obtuvieron altos rendimientos de hidrólisis en jugos de agave.

La combinación de estrategias adecuadas de ingeniería genética, los estudios de producción en escala de biorreactor, los procesos de purificación y los ensayos de inmovilización junto con las características bioquímicas que presentó la enzima, permitieron generar cantidades suficientes de una enzima de aplicación industrial. Estos estudios son la base para un futuro desarrollo de procesos tecnológicos respecto a la obtención de fructooligosacáridos y jarabe de fructosa utilizando una tecnología amigable con el ambiente. Posteriores estudios de optimización, producción a mayor escala y estimación de los costos del proceso completo serán necesarios para la implementación de estos procesos en la industria.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades

En las últimas décadas, la biocatálisis se ha convertido en un dominio cada vez más atractivo para la ciencia y la industria.

El valor de mercado global de enzimas industriales es alrededor de US\$ 5,5 mil millones y se espera que alcance US\$ 7,0 mil millones para 2023. Este incremento se sostiene en la alta prevalencia de enfermedades crónicas y la necesidad de desarrollar productos farmacéuticos basados en enzimas y técnicas de ingeniería de proteínas. El mercado de enzimas alimentarias, también en expansión, se proyecta que alcance US\$ 2,94 mil millones en 2021. Actualmente, existen más de 500 productos disponibles en el mercado que son obtenidos utilizando enzimas, como bioetanol, productos farmacéuticos, pulpa de papel, jarabe de maíz de alta fructosa, pan, queso y jugos de frutas. El número de las enzimas industriales para el procesamiento de alimentos aumenta continuamente según las investigaciones y esfuerzos de desarrollo (I + D) para descubrir nuevos biocatalizadores (Sutay Kocabaş & Grumet, 2019).

Con los avances de la biotecnología, especialmente en las áreas de genética molecular e ingeniería de proteínas, las enzimas han encontrado nuevos campos de aplicación en procesos industriales debido a su elevada eficiencia catalítica, a que su uso no daña el ambiente y a su rentabilidad económica.

Por este motivo es importante generar conocimiento para poder sustituir los procesos productivos convencionales por procesos biotecnológicos en los que estén involucrados microorganismos o enzimas microbianas tales como pectinasas, xilanasas, celulasas, mananasas, amilasas, inulinasas, levanasas, ligninasas; los cuales no sólo proporcionan alternativas económicas viables, sino que además permiten el desarrollo de tecnologías amigables con el ambiente (Kannaujia *et al.*, 2015).

Cuando se detectan enzimas con nuevas características bioquímicas se purifican para estudiar sus propiedades más relevantes, se determinan los factores que controlan su eficiencia y, si resultan prometedoras, se deben producir en cantidades necesarias para la aplicación deseada.

Las enzimas se pueden producir tal cual existen en la naturaleza (silvestre o *wild type*) o a partir de microorganismos genéticamente modificados. Cuando los microorganismos producen bajas concentraciones de proteínas, como es el caso de enzimas extracelulares de algunos hongos filamentosos, puede recurrirse a sobreexpresarlas en sistemas heterólogos. Esto proporciona dos ventajas: primero, es posible obtener enzimas con propiedades mejoradas; y segundo, es posible expresar las enzimas en un huésped microbiano con mayor rendimiento, menores tiempos y en procesos con menor costo (Sutay Kocabaş & Grumet, 2019).

Las inulinasas microbianas son enzimas que se utilizan para la producción de jarabe de alta fructosa, oligofructosacáridos y etanol a partir de inulina, tanto de las especies vegetales como de sus residuos industriales. Estos productos son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y alimentaria (jarabes fructosados, bebidas, helados, entre otros) (Singh & Singh, 2019).

Para una mejor comprensión del presente trabajo titulado "Inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308: caracterización, clonado, sobreexpresión, y aplicación en procesos biotecnológicos", a continuación, se describen los sustratos y productos de las reacciones catalizadas por las inulinasas, sus aplicaciones, los organismos silvestres productores y la producción de inulinasas en sistemas heterólogos.

2. Fructanos

Los fructanos son carbohidratos naturales de reserva de los vegetales que se diferencian del almidón porque están formados por unidades de fructosa.

Después del almidón, los fructanos son los polisacáridos no estructurales más abundantes en la naturaleza, presentes en muchas especies de plantas, en hongos del género *Aspergillus* y en bacterias, en las cuales prevalece el levano.

La mayoría de las plantas que sintetizan fructanos no almacenan almidón (Vijayaraghavan *et al.*, 2009). Los fructanos son sintetizados a partir de sacarosa (Valluru & Van den Ende, 2008). Son solubles en agua lo que le otorga importantes implicancias biológicas a nivel de la dinámica celular de las plantas. Son sintetizados y almacenados preferentemente en vacuolas y proveen a la planta de mayor tolerancia al frío y a las sequías (Chacón Villalobos, 2006).

El término fructano comprende polisacáridos y oligosacáridos y se clasifican según el número de unidades de monómeros o grado de polimerización (DP) y el enlace predominante. Se denominan oligosacáridos los que, por hidrólisis, generan de dos a nueve unidades de monosacáridos y polisacáridos cuando generan más de diez unidades monosacáridicas. Según el enlace dominante se nombran: inulina cuando contienen principal o exclusivamente enlaces β -(2→1) fructosil-fructosa y levano cuando contiene enlaces β -(2→6) fructosil-fructosa (Vargas, 2009), como se observa en la figura 1.

Por otro lado, se encuentran los fructanos ramificados, presentes en plantas de la familia *Agavaceae* (*Agaváceas*) (Arrizon *et al.*, 2012).

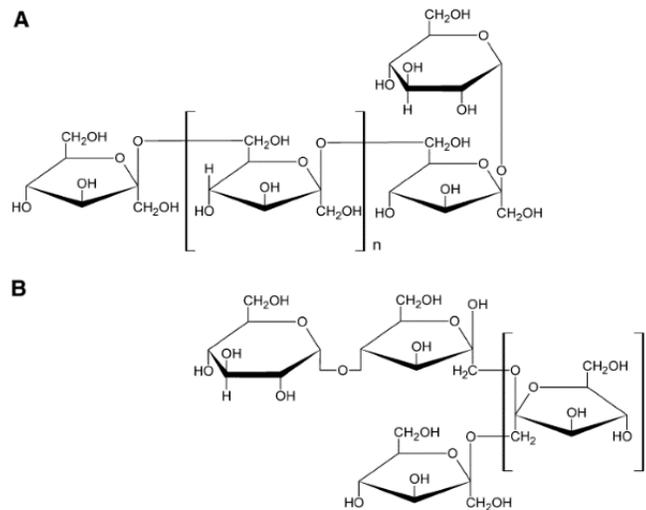


Figura 1. Estructura química del levano (A) y la inulina (B)

Enlace β -(2→6) fructosil-fructosa en el levano y β -(2→1) fructosil-fructosa en la inulina

Fuente: Kulminkaya *et al.*, 2003

3. Inulina

La inulina es un carbohidrato de reserva energética en Asteráceas y Gramíneas, no digerible, presente en más de 36000 especies de plantas, aislada por primera vez en 1804, a partir de la especie *Inula helenium*, por el científico alemán Valentin Rose. En 1818, Thomson, científico británico, le dio el nombre actual (Madrigal & Sangronis, 2007).

En su composición química presenta hasta 70 unidades de fructosa unidas a una glucosa o fructosa terminal, lo que significa que es una mezcla de oligosacáridos y polisacáridos (Ricca *et al.*, 2007).

Es necesario aclarar que no hay un completo acuerdo en la literatura acerca de la definición de la inulina a partir de la cantidad de unidades monoméricas que la componen. En este trabajo se usará la definición de Ricca *et al.* (2007) "un polifrufructano con un grado de polimerización de al menos 30".

La inulina extraída de las plantas, por lo general, contiene hasta un 10 % de mono y disacáridos, principalmente fructosa y sacarosa, y una serie de oligosacáridos donde se incluyen los fructooligosacáridos con DP de 9 o menos unidades y que constituyen un 30 % del total (Chacón Villalobos, 2006).

Estos polímeros son poco solubles en agua lo que constituye un factor limitante para su uso. Leite *et al.* (2007) informan valores de solubilidad de 6 % (p/v) a 10 °C y 35 % (p/v) a 90 °C.

En la tabla 1 se presentan los contenidos aproximados de inulina en especies vegetales comestibles (Madrigal & Sangronis, 2007).

Tabla 1. Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales

Especie vegetal	Inulina (g/100 g de base seca)
Topinambur (<i>Helianthus tuberosus</i>)	89
Achicoria (<i>Cichorium intybus</i>)	79
Raíz de Dalia (<i>Dahlia spp.</i>)	59
Cebolla (<i>Allium cepa</i> L.)	48
Ajo porro (<i>Allium porrum</i> L.)	37
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	29
Yacón (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)	27
Espárrago (<i>Asparagus officinalis</i> L.)	4
Centeno (<i>Secale cereale</i>)	1

En este estudio la fuente de inulina seleccionada fue el yacón, planta que se cultiva en la región andina con posibilidades de cultivo a gran escala dado que fue incorporado al Codex Alimentarius, Norma regional para el yacón, CXS 324R-2017. Esto posibilitará el crecimiento de las zonas cultivadas debido a su

uso como alimento o como ingrediente alimentario tanto para consumo interno como para la exportación.

4. Fructooligosacáridos

Los fructooligosacáridos (FOS) son oligosacáridos que consisten en una cadena de unidades de fructosa con una unidad de glucosa terminal unidas por enlace glucosídico β 2-1, que estimulan selectivamente el crecimiento de bacterias beneficiosas como bifidobacterias y lactobacilos en el colon, confiriendo una variedad de efectos para la salud de un individuo, característica que los define como prebióticos (Singh & Singh, 2010).

Los FOS están disponibles naturalmente en varios alimentos, como yacón, plátano, cebolla, ajo, espárragos, miel, puerro, topinambur, achicoria, cebada, centeno, azúcar moreno, manzanas, cerveza y lechuga (Kumar *et al.*, 2018).

En forma sintética, estos compuestos pueden obtenerse de dos maneras: a partir de la hidrólisis enzimática parcial de la inulina utilizando endoinulinasas, o mediante reacción de transfructosilación a partir de sacarosa.

Los principales productos de la primera reacción son inulotriosa, inulotetraosa, inulopentosa y los de la segunda son FOS de cadena corta, mezcla de 1-cestosa, nistosa y 1-fructofuranosil nistosa.

Actualmente los principales productores de FOS son empresas japonesas como *Meiji Food Materia Co., Ltd.* que comercializan productos denominados "*Meioligo FOS-P y CR*", la empresa *Beghin Say*, Francia, que elabora "*Actilight*" y la empresa *DGTC Nutrition* en Estados Unidos, que produce "*NutraFlora*", ambas en colaboración con la empresa japonesa. En los Países Bajos la empresa *Cosun* comercializa "*Raftilose*", entre otras. Los componentes principales de estos productos son cestosa, nistosa, fructofuranosil nistosa, bifurcosa, inulobiosa, inulotriosa e inulotetraosa (Jacob & Prapulla, 2012).

En nuestro país no se producen industrialmente los FOS, siendo el mercado nacional netamente dependiente de la importación.

Se espera que el mercado de FOS alcance un valor de US\$ 3,52 mil millones para 2024 según ha informado *Grand View Research, Inc.*, San Francisco, California, USA, 2016.

5. Inulinasas

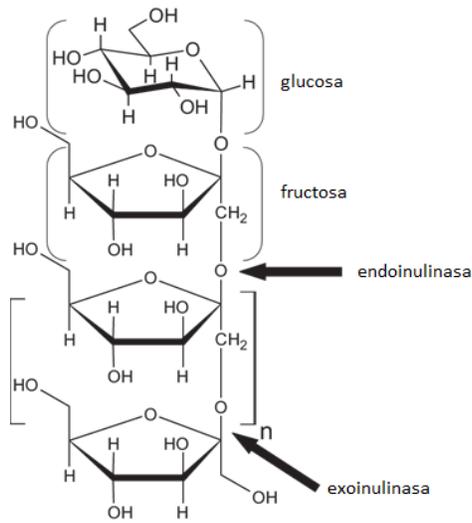
Las inulinasas son enzimas que, recientemente, han ganado gran atención por sus múltiples aplicaciones en las alimentarias industriales (Das *et al.*, 2019). Estas enzimas pertenecen a la familia 32 glicosil-hidrolasas que actúan sobre los enlaces β -(2→1) fructano en la inulina (Kumar *et al.*, 2018).

Pueden clasificarse en exo y endoinulinasas. Las exoinulinasas (β -D-fructan fructanohidrolasas, EC 3.2.1.8) hidrolizan los enlaces β (2→1) de la molécula de inulina y separan sucesivamente unidades de fructosa a partir del extremo terminal de la molécula, produciendo una mezcla de glucosa y fructosa libres, dado que esta enzima hidroliza el enlace glucosídico α (1→2) que une la glucosa a la cadena principal de la inulina. Las endoinulinasas (2,1- β -D-fructan fructanohidrolasa, EC 3.2.1.7); hidrolizan los enlaces internos β (2→1) de la molécula de inulina y dan como producto final una mezcla de inulotriosa, inulotetraosa, e inulopentosas como principales productos (Chi *et al.*, 2009).

Estas enzimas no son capaces de clivar el enlace α (1→2) que une la glucosa a la cadena principal de la inulina (Nakamura *et al.*, 1995, Kang *et al.*, 1998).

En la figura 2 (A) se presentan los sitios de acción de las enzimas y en (B), los productos de reacción.

A



B

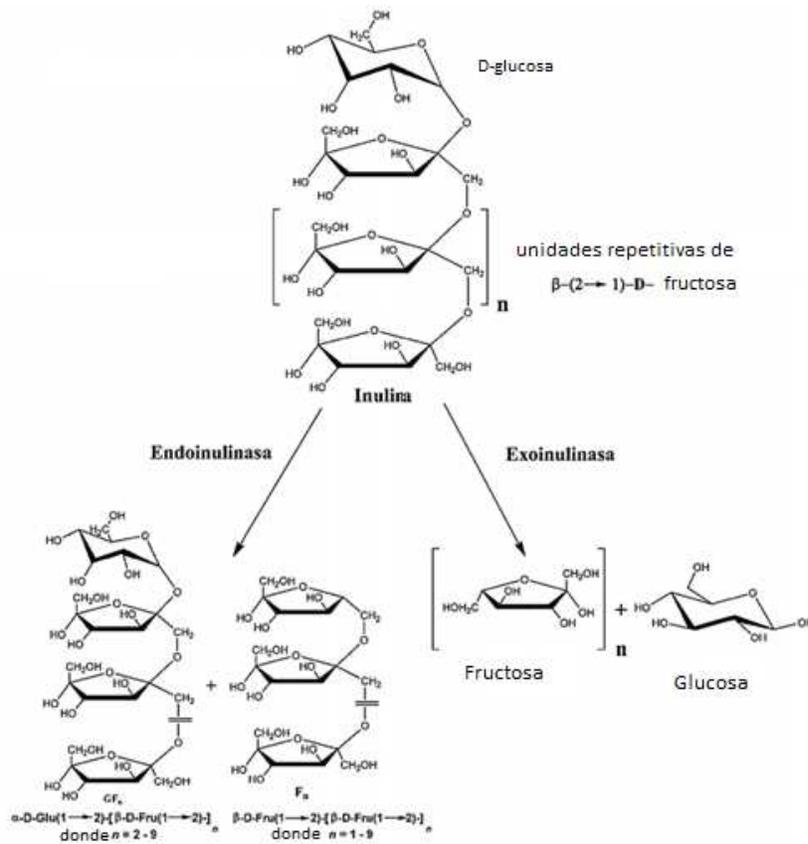


Figura 2. Exo y endoinulinasas (A) Sitios activos y (B) productos de reacción

Fuente: Singh & Singh, 2010 y 2017

5.1. Actividad invertasa

Las exoinulinasas pueden presentar actividad invertasa hacia enlaces β 2,6-fructano, lo que significa que pueden hidrolizar sacarosa en fructosa y glucosa. Por lo tanto, su actividad catalítica se describe en términos de relación de actividad hidrolítica inulina/sacarosa (I/S). En general se acepta que esta relación I/S caracteriza a las enzimas: para inulinasa la proporción es superior a 10^{-2} mientras que para la invertasa es inferior a 10^{-4} (Sharma *et al.*, 2006).

Claramente, es deseable una actividad invertasa en la inulinasa para hidrolizar el enlace final entre los residuos de glucosa y fructosa que resultan de la hidrólisis de inulina.

5.2. Actividad fructosiltransferasa

La actividad fructosiltransferasa de la inulinasa se refiere a la capacidad de esta enzima de catalizar, bajo condiciones de reacción apropiadas, la transferencia de un grupo fructosil de una molécula de sacarosa a diferentes aceptores (FOS o sacarosa), para formar fructanos de diferentes pesos moleculares, de acuerdo con la especificidad de la enzima, como se muestra en la figura 3 (proceso de elongación).

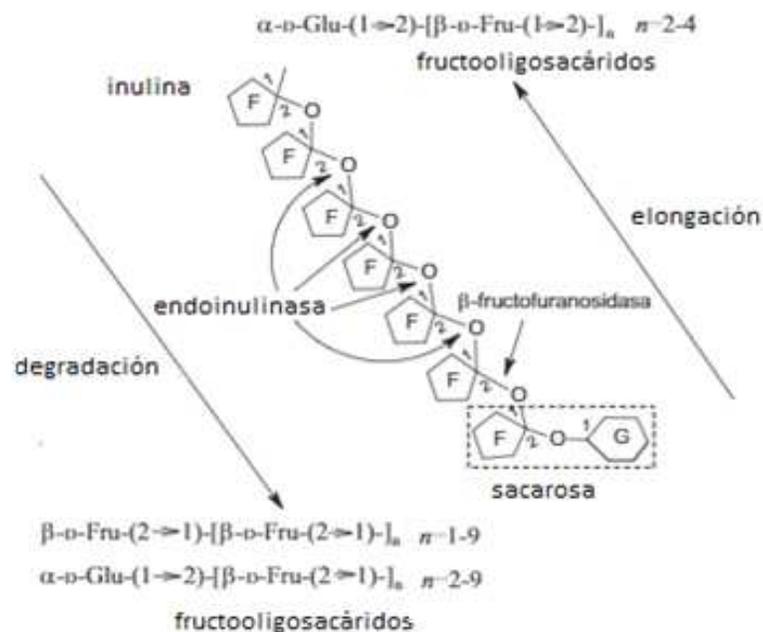


Figura 3. Presentación esquemática de la producción de FOS a partir de inulina por endoinulinasa y a partir de sacarosa por β -fructofuranosidasa

Fuente: Adaptado de Singh & Singh, 2010

En este caso, la sacarosa actúa como donador de fructosa. Los FOS producidos por este proceso contienen 2–4 unidades de fructosilo unidos por enlaces β -1,2-glicosídicos y terminados con un residuo de D-glucosa. La primera reacción de β -fructofuranosidasa en las moléculas de sacarosa conduce a 1-cestosa y glucosa. La nistosa se forma mediante la adición posterior de una molécula de fructosa, mientras que la adición de otra molécula de fructosa dará lugar a la formación de fructofuranosil-nistosa (Flores-Maltos *et al.*, 2014). La estructura química de estos compuestos se muestra en la figura 4.

Se requiere una alta concentración de sustrato para una transfructosilación eficiente (Singh & Singh, 2010).

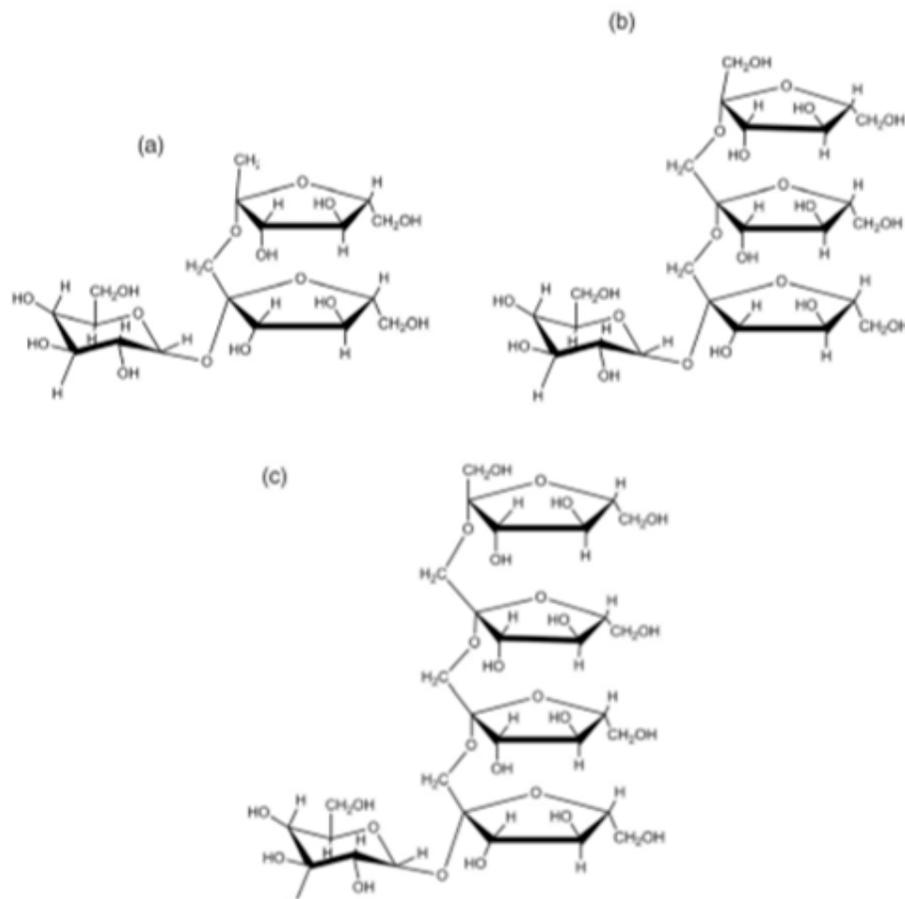


Figura 4. Estructura química de los más importantes FOS

(a) 1-cestosa, (b) nistosa y (c) 1-fructofuranosil-nistosa (Flores-Maltos *et al.*, 2014)

5.3. Aplicaciones

Las inulinasas se pueden usar en un amplio espectro de aplicaciones, como la producción de fructosa a partir de la hidrólisis de inulina, la producción enzimática de FOS, la producción de bioetanol, 2,3-butanodiol, ácido láctico, jarabe de sorbitol, ácido glucónico, manitol, entre otros. En la figura 5 se esquematizan las aplicaciones de estas enzimas.



Figura 5. Diagrama esquemático que muestra las aplicaciones de las inulinasas

Fuente: Singh & Singh (2019)

Los FOS son muy utilizados en la industria alimentaria, se utilizan como sustitutos del azúcar y la grasa debido a sus propiedades organolépticas. En varios productos alimenticios como lácteos, aderezos y productos cárnicos, se reemplaza la grasa por oligofructosa (Meyer *et al.*, 2015). La oligofructosa también reduce el punto de congelación de los postres congelados y, como el azúcar, sirve como aglutinante en barras nutricionales. También se ha demostrado que los FOS mejoran la función reológica de los productos farináceos.

Otra de las aplicaciones de las inulinasas es la producción de bioetanol. Las exoinulinasas microbianas producen fructosa y glucosa que pueden ser fácilmente fermentadas a etanol por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en un proceso de sacarificación simultánea (Chi *et al.*, 2010). Por otra parte, hay estudios que reportan la producción directa de etanol a partir de tubérculos de

alcachofa de Jerusalén, Li *et al.* (2013) informan el clonado y expresión de un gen endoinulinasa de *Arthrobacter* spp. en una cepa de *Saccharomyces* recombinante y Wang *et al.* (2014) la expresión de genes que codifican una exoinulinasa de *Penicillium janthinellum* en *Saccharomyces cerevisiae*.

Las inulinasas también se han utilizado para producir 2,3-butanodiol, ácido láctico, jarabe de sorbitol, ácido glucónico, manitol, etc. Para la producción de estos metabolitos, se requiere un cultivo mixto que produzca diferentes enzimas, primero para llevar a cabo la hidrólisis de inulina y luego la conversión del hidrolizado en el producto de interés (Singh & Singh, 2017).

6. Microorganismos que producen inulinasa

Los microorganismos son las mejores fuentes para la producción de inulinasas debido a su fácil cultivo y alta producción de enzima, en comparación con los vegetales. Sin embargo, para su aplicación a nivel industrial es necesario que sean considerados GRAS y aceptados por parte de organismos nacionales e internacionales de salud.

Los microorganismos que pueden producir inulinasas incluyen *Aspergillus* spp., *Kluyveromyces* spp., *Penicillium* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Pseudomonas* spp., *Arthrobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Xanthomonas* spp., *Cryptococcus* spp., *Pichia* spp., *Sporotrichum* spp., y *Candida* spp. (Rawat *et al.*, 2017).

La producción de enzimas y sus propiedades dependen estrictamente, no sólo del tipo de microorganismo usado sino también del tipo de fermentación llevada a cabo (Ricca *et al.*, 2007).

6.1. Inulinasas de levaduras

Las inulinasas de levaduras son enzimas extracelulares parcialmente asociadas con la pared celular y secretadas al medio externo (Gong *et al.*, 2007). Estudios publicados han reportado que las cepas de *Kluyveromyces* son las más eficientes para la producción de inulinasas (Das *et al.*, 2019).

Los siguientes, son ejemplos de trabajos publicados sobre producción de inulinasa en levaduras: Yuan & Bai (2008) observaron una actividad de inulinasa de 54 U/ml en *Kluyveromyces marxianus* Y1 en el medio que contiene

inulina (40 g/l) después de 120 h de incubación. Por su parte, Sheng *et al.* (2008) informaron una actividad de inulinasa de 85 U/ml por *Cryptococcus aureus* G7a en medio que contiene inulina (40 g/l) y 0,5 % p/v de extracto de levadura en 42 h y Singh & Bhermi (2008) utilizaron una cepa de *Kluyveromyces marxianus* YS-1, para la producción de inulinasa extracelular en un medio que contiene inulina (35 g/l) y comprobaron que fueron óptimos para la producción de 30,8 UI/ml de enzima con un tiempo de fermentación de 72 h en agitación y 55,4 UI/ml a una velocidad de agitación de 200 rpm y una aireación de 0,75 vvm en un tiempo de 60 h.

Si bien estas cepas presentaron alta productividad de la enzima, las inulinasas de levaduras no son lo suficientemente termoestables por lo que su aplicación a escala comercial es limitada (Singh & Kaur, 2006).

6.2. Inulinasas de bacterias

Los niveles de producción de inulinasas en bacterias no son comparables con los de levaduras. Sin embargo, debido a la capacidad de muchas bacterias para sobrevivir a altas temperaturas, se han desarrollado investigaciones para aislar cepas bacterianas que puedan producir grandes cantidades de inulinasa térmicamente estables (Singh & Kaur, 2006). Se ha informado que muchas cepas bacterianas como *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Xanthomonas* spp., *Clostridium* spp. etc. producen una cantidad aceptable de inulinasas con propiedades bioquímicas interesantes como resistencia a alta temperatura, a la alcalinidad, a acidez y salinidad.

Se pueden citar, a modo de ejemplo, los trabajos de: Li *et al.* (2012) que aislaron una cepa de *Marinimicrobium* spp., productora de inulinasa que mostró actividad a 55 °C y pH 9,0. Del mismo modo Gao *et al.* (2008) aislaron de una cepa de *Bacillus smithii* que produjo una endo-inulinasa estable a 70 °C y pH entre 4,0 y 8,0. Lu *et al.* (2014) reportaron que un actinomiceto marino, *Nocardiopsis* sp., produjo inulinasa alcalinotermoestable a 60 °C.

También se ha informado que producen inulinasas otras bacterias como *Xanthomonas oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermotoga marítima*, *Arthrobacter* spp., *Clostridium acetobutylicum*, entre otras (Singh y Kaur, 2006).

6.3. Inulinasas de hongos filamentosos

Son muchos los hongos filamentosos que se han aislado como productores de inulinasas, merece citarse a *Panaeolus papilionaceus*, que fue el primer basidiomiceto del cual se purificó una inulinasas que resultó altamente termoestable, con una temperatura óptima de 60-65 °C y un pH óptimo de 6 (Singh & Kaur, 2006).

El género *Aspergillus* ha sido reportado como uno de más utilizados para la producción de inulinasas (Das *et al.*, 2019), y los mejores rendimientos de actividad enzimática se han observado para *Aspergillus niger* (Ricca *et al.*, 2007). Otras especies como *A. awamori*, *A. ficuum*, *A. niveus*, *A. tamarii*, *A. terreus* y *A. tubingensis* también han sido reportadas como productoras de inulinasas, se citan, a continuación, algunos ejemplos: *Aspergillus awamori* var. 2250 produce una exoinulinasas extracelular en fermentación en sustrato sólido. El PM de la enzima es de 69±1 KDa, su PI de 4,4 y pH óptimo de 4,5. Esta enzima es capaz de hidrolizar el enlace β (2→1) en la inulina y el β (2→6) en el levano, liberando fructosa, y fue clonada y secuenciada por Arand *et al.* (2002). *Aspergillus ficuum* fue capaz de producir isoformas múltiples de exoinulinasas y endoinulinasas (Chen *et al.*, 2009). *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128 URM fue reportado como una nueva fuente de inulinasas por Souza Motta *et al.* (2005).

En el mercado existen preparaciones comerciales de inulinasas, Novo A/S, (Dinamarca) produce una enzima de *Aspergillus ficuum* de 64 kDa (Novozym 230), y *Fructozyme L* (Novozym) que consiste en 10% de endoinulinasas obtenida de *Aspergillus niger* y 90 % de exoinulinasas obtenida de *Bacillus stearothermophilus*. Por su parte, Sigma-Aldrich elabora una inulinasas comercial, *Fructozyme L™-Inulase*, que contiene exo y endo inulinasas obtenida de *Aspergillus niger*.

6.4. Caracterización molecular de genes de inulinasas

La literatura reporta que se han caracterizado muchos genes que codifican exo y endo inulinasas tanto en bacterias como en levaduras y hongos filamentosos. Todas las inulinasas presentan secuencias conservadas tales como WMND (E) PNGL, RPD, EC (V) P, SVEVF, Q Y FS (T) las cuales juegan un rol

importante en la catálisis enzimática y en la unión al sustrato. Las exoinulinasas producidas por levaduras no presentan la secuencia conservada SVEVF (Liu *et al.*, 2012).

Los genes de exoinulinasas bacterianas, de levaduras y de algunos hongos filamentosos no presentan intrones en su constitución, sin embargo se han estudiado varios genes de inulinasas producidas por hongos filamentosos que presentan un intrón en la secuencia que codifica para esta enzima, entre ellos se ha citado a una exoinulinasa de *Aspergillus niger* cepa 12 (*inuE*) cuyo gen presenta un marco abierto de lectura de 1611 pb, interrumpidos por un intrón de 60 pb (Moriyama *et al.*, 2003); y otra exoinulinasa de *Aspergillus awamori* var 2250 que, coincidentemente, contiene un marco abierto de lectura de 1611 pb, interrumpidos por un intrón de 60 pb (Arand *et al.*, 2002). Posteriormente se ha estudiado una exoinulinasa de *Penicillium janthinellum* cepa B01 que posee un marco abierto de lectura de 2115 bp y es interrumpido por un intrón de 67 bp (Wang *et al.*, 2011).

7. *Aspergillus kawachii*

Dentro del género *Aspergillus*, la especie *kawachii* presenta micelio de color blanquecino, es altamente aeróbico y capaz de utilizar fuentes de carbono muy variadas desde monosacáridos (glucosa) hasta polisacáridos complejos como sustancias pécticas. Es productor de ácido cítrico (Contreras Esquivel & Voget, 2004).

Hace unos años se determinó la secuencia genómica completa de la cepa IFO 4308, utilizada en este estudio, y el análisis confirmó que este hongo filamentosos es un importante productor de hidrolasas de polisacáridos (Futagami *et al.*, 2011). Este hongo filamentosos es uno de los que se ha utilizado durante la preparación de la tradicional bebida alcohólica japonesa, *shochu-koji*, en la etapa de degradación enzimática de los polisacáridos del grano de arroz o cebada. Debido a la capacidad de crecer en un ambiente de pH (2,0-3,5) del proceso de fermentación, el hongo filamentosos secreta al medio gran cantidad de hidrolasas estables en esta condición de acidez (Contreras Esquivel & Voget, 2004).

Varios reportes informaron caracterización de enzimas de *Aspergillus kawachii* que resultaron estables a pH ácidos: Mikami *et al.* (1989) aislaron amilasas estables entre pH 2,5-6,0; Fushinobu *et al.* (1998) purificaron una endoxilanasas estable a pH 2,0-3,0, Qui *et al.* (2016) estudiaron una xilanasas estable a pH 3,0-4,0; Byrne *et al.* (2017) purificaron y caracterizaron una exopoligalacturonasa que presentó máxima estabilidad en un rango de pH 4,0-5,0.

Estas características bioquímicas son las que hacen a estas enzimas interesantes para ser estudiadas. Por este motivo es que se decidió a avanzar en el conocimiento de las enzimas de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 involucradas en la actividad inulinasa.

8. Procesos de producción de inulinasas

Las inulinasas se pueden obtener por fermentación en sustrato sólido o en cultivo sumergido.

La fermentación en sustrato sólido posee ventajas, como el uso de biorreactores de pequeño tamaño, el menor consumo de energía para la aireación y la transferencia de gases, el procesamiento posterior más fácil, menor volumen de efluentes producidos, además de tener menos posibilidades de contaminación debido a la baja disponibilidad de agua. La incapacidad de eliminar el exceso de calor generado por el metabolismo microbiano durante la fermentación, la dificultad para mezclar y el manejo de sólidos a gran escala se consideran las principales desventajas de este proceso para aplicaciones industriales (Manpreet *et al.*, 2005).

La fermentación en cultivo líquido es un proceso que consiste en el cultivo de células microbianas en condiciones controladas en biorreactores, que permite que los sustratos, disueltos en el medio, estén asequibles para los microorganismos. El uso de sensores en línea y la posibilidad de tomar muestra, permite el control de los parámetros del proceso.

Generalmente, la producción industrial de enzimas se realiza utilizando esta tecnología (Mazutti *et al.*, 2007) sin embargo, el costo de la producción es uno de los principales factores que limita su aplicación en escala industrial. La composición apropiada del medio de cultivo es un factor importante que puede

afectar significativamente el rendimiento del producto (Chen *et al.*, 2011). Las mejoras en la productividad del proceso de fermentación pueden lograrse modificando parámetros fisicoquímicos, nutricionales y ambientales a los que el organismo está expuesto.

La formulación de los medios con nutrientes complejos es adecuada para las fermentaciones a gran escala, ya que conduce al desarrollo de procesos rentables que respaldan el rendimiento máximo del producto. En general, la inulina pura puede usarse como sustrato para la producción de inulinasa, pero no es rentable (Singh & Bhermi, 2008) por lo que, en algunos reportes se han sugerido que se puede lograr una reducción significativa en el costo con el uso de sustratos obtenidos de plantas ricas en inulina (Kango, 2008).

La producción de inulasas microbianas se realiza en cultivo líquido sumergido desde hace muchos años. Pessoni *et al.* (1999) han producido inulasas extracelulares (0,5 U/ml) de *Penicillium janczewski* en medios con 1 % de inulina, a 28 °C; Saber & Naggar, (2009) informaron 71,97 U/ml a partir de *Aspergillus tamarii* AR-IN9 usando materias primas que contienen inulina, a 30 °C, pH 4,8 y 200 rpm; Kalra & Kumari (2017) informaron una actividad inulinasa de 61 U/ml de *Aspergillus niger* utilizando piel de banana como sustrato. Esto llevó a la elección de este tipo de cultivo en el presente trabajo.

8.1 Sustratos para la producción de inulasas

La inulina es el sustrato más comúnmente utilizado para la producción de inulasas. Para compensar el alto costo de la inulina en estado puro se han utilizado una gran variedad de sustratos vegetales ricos en inulina y de bajo costo, como se expresó anteriormente. A continuación, se describe el yacón (*Smallanthus sonchifolius*) dado que fue el sustrato elegido para la producción de inulinasa en este trabajo de tesis doctoral.

El yacón es una planta nativa de la región Andina que pertenece a la familia *Compositae* (*Asteraceae*). Se ha cultivado tradicionalmente en el territorio comprendido entre Colombia y el noroeste argentino (NOA) principalmente en las provincias de Salta y Jujuy.

Las raíces de esta planta tienen una larga historia de uso en América del Sur y otras regiones, dado sus propiedades potenciales promotoras de la salud, incluidos los efectos prebióticos, antidiabéticos, antioxidantes y antimicrobianos

(Ojansivu *et al.*, 2011), fueron utilizadas por la cultura Inca para la hidratación y nutrición.

La forma y el tamaño de los tubérculos de yacón varían de formas redondeadas a alargadas con formas contorsionadas que dificultan el pelado y el costo de procesamiento. Poseen una cáscara delgada y muy adherida a la pulpa con tonalidades cremosas, desde amarillas hasta morado. Los tejidos internos son blandos debido a la cantidad de agua acumulada, característica que los hace frágiles frente a la cosecha, embalaje y transporte (Manrique *et al.*, 2004).

El peso de la raíz es variable entre 50 a 1000 g, aunque en general oscilan 200 a 500 g. Normalmente una planta produce entre 2 a 3 kg de tubérculos y es posible que pueda superar los 5 kg si se aplican prácticas de cultivo adecuadas (Cunja, 2006).

En la figura 6 se muestra una fotografía de las plantas y raíces del yacón.



Figura 6. Fotografía de plantas y raíces del yacón

Fuente: Manrique *et al.* (2004)

Los tubérculos de yacón tienen un alto contenido de agua, que generalmente excede el 70 % del peso fresco. Debido a este alto contenido de agua, el valor de la energía de la raíz es bajo. Contienen 0,3-3,7 % de proteína, 0,1-1,5 % de lípidos, 0,3 -3,4 % de fibra, 20 % de sacáridos y 0,2-3,5 % de minerales (potasio, fósforo, calcio, magnesio, sodio y hierro), así mismo

vitaminas B1, B2, C, β -caroteno y polifenoles (Lachman *et al.*, 2003). La composición de sacáridos en base a materia seca se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Composición nutricional del yacón en base a materia seca

Sacáridos	Contenido (mg/g de materia seca)
Fructosa	350,1 \pm 42,0
Glucosa	158,3 \pm 28,6
Sacarosa	74,5 \pm 19,0
GF2	60,1 \pm 12,6
GF3	47,4 \pm 8,2
GF4	33,6 \pm 9,3
GF5	20,6 \pm 5,2
GF6	15,8 \pm 4,0
GF7	12,7 \pm 4,0
GF8	9,6 \pm 7,2
GF9	6,6 \pm 2,3
Inulina	13,5 \pm 0,4

GF: oligómeros de fructanos
Fuente: Lachman *et al.*, 2003

La presencia de inulina y FOS en tubérculos de yacón motivó el interés por el estudio de este material vegetal como sustrato potencial para el crecimiento de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 además de desarrollar un proceso de producción sostenible y económico.

La selección de un sustrato de carbono apropiado para la producción de la enzima es importante ya que ciertos sustratos pueden promover la inducción o causar represión por catabolitos de la síntesis enzimática.

La optimización del medio de cultivo es un paso crucial en cualquier proceso de producción de enzimas y un medio de cultivo formulado adecuadamente permite obtener alta producción de enzimas e incluso reducir los costos. Se ha encontrado que diferentes parámetros nutricionales y físicos afectan significativamente la síntesis de inulinasa (Grumezescu & Holban, 2018).

9. Purificación de inulinasas

Una vez seleccionado el medio de cultivo óptimo para la producción de la enzima es necesario proceder a su purificación para, posteriormente, realizar los estudios bioquímicos, moleculares y biotecnológicos.

Las proteínas se purifican mediante procedimientos de fraccionamiento en una serie de etapas independientes, donde se aprovechan las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de interés para separarlas progresivamente de otras proteínas y/o de las demás sustancias.

Como las enzimas fúngicas son en su mayoría extracelulares, se recuperan del medio de cultivo mediante ultrafiltración, extracción con solvente, precipitación, diálisis, o una combinación de estas técnicas. Luego se aplican sucesivas técnicas cromatográficas, en general se utilizan: intercambio iónico (DEAE Sepharose, Q Sepharose, SP Sepharose, CM Sepharose, entre otras), interacción hidrofóbica (Phenyl Sepharose, Butyl Sepharose, Octyl Sepharose, entre otras), cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S100, Sephacryl S200) y de afinidad (con Metal Inmovilizado, IMAC Sepharose). Posteriormente se realiza el análisis por técnicas analíticas (Singh & Singh, 2017).

Actualmente existen en el mercado numerosas resinas cromatográficas que pueden utilizarse en purificación de proteínas, el desafío es encontrar las más adecuadas para lograr enzimas activas, estables y con una pureza adecuada para su aplicación.

Son numerosos los estudios publicados sobre purificación de inulinasas, a modo de ejemplo se citan: Kaur Gill *et al.*, (2006) que purificaron, para caracterizar e inmovilizar, una exo inulinasa de *Aspergillus fumigatus* mediante precipitación con sulfato de amonio, seguida de sucesivas cromatografías: DEAE-sephacel, octyl-Sepharose, Sephacryl S200, ConA-CL agarosa y Sephacryl S100. La enzima fue purificada 75 veces con un rendimiento de recuperación del 3,2 % a partir del extracto crudo y Arand *et al.*, (2002) purificaron una exoinulinasa de *Aspergillus awamori* mediante ultrafiltración, Sephadex G-50, DEAE-Sephadex, DEAE-5PW, Mono S, y Phenyl-Superose. La enzima fue purificada 38 veces con un rendimiento de recuperación del 10 %. Estos procedimientos se llevaron a cabo para caracterizar, clonar y cristalizar esta inulinasa.

10. Propiedades bioquímicas

La determinación de la temperatura y pH óptimos, estabilidad, parámetros cinéticos y otras propiedades fisicoquímicas son particularmente esenciales en procesos enzimáticos para definir su aplicación industrial adecuada.

Se conoce que el pH es uno de los factores más importantes para la actividad enzimática, por eso surge la necesidad de conocer la estabilidad de la enzima frente a diferentes valores, no solo para determinar el óptimo para que la enzima actúe sobre un determinado sustrato, sino que, además para establecer las condiciones necesarias para llevar a cabo el proceso en el que interviene.

La mayoría de las inulinasas tienen un pH óptimo entre 4,0 y 6,0 (Flores Gallegos *et al.*, 2018) y ha sido informado por varios investigadores, correspondiendo citar a Sharma *et al.* (2006) que encontraron un pH óptimo de 4,4 para *Aspergillus niger*, Gong *et al.*, (2008) un pH óptimo de 4,5 para inulinasa de *Pichia guilliermondii*, y Guimarães *et al.*, (2007) reportaron pH óptimo de 4,5 para inulinasa de *Aspergillus ochraceus*.

Con respecto al rango de pH donde la enzima es estable se citan, entre otros, a Laowklom *et al.* (2012) quienes encontraron una inulinasa de *Streptomyces* sp. CP 01 estable entre pH 5,5 y 9,0 donde la enzima retuvo el 80 % de la actividad máxima y Liu *et al.* (2010) que reportaron un rango de pH de estabilidad de la enzima de 3 a 7 para una inulinasa de *Yarrowia lipolytica*.

Siguiendo con los parámetros físicos, la termoestabilidad es una de las características más deseables de las inulinasas. Los procesos industriales para producción de fructosa y FOS se llevan a cabo a temperaturas próximas a 60 °C. La mayoría de las inulinasas reportadas pierden su actividad después de algunas horas a temperaturas superiores a 60 °C (Das *et al.*, 2019). Esta falta de termoestabilidad puede generar inconvenientes en aplicaciones industriales donde las inulinasas se usan para la producción de fructosa ya que, la inulina tiene una solubilidad limitada y el riesgo de contaminación microbiana es alto a temperatura ambiente.

Las inulinasas de levaduras, hongos filamentosos y bacterias han sido reportadas con temperaturas óptimas entre 40 y 60 °C, incluso superiores (Singh *et al.*, 2006). Entre los hongos filamentosos se han informado tres inulinasas de *Penicillium* sp. que presentan temperaturas óptimas entre 45 °C y 50 °C, una de *Aspergillus niger* 12 con actividad residual del 54 % a 60 °C durante 30 min e inulinasas termoestables de *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* que muestran una actividad óptima a 60 °C. Se ha informado que las inulinasas de la mayoría de las especies de levaduras presentan una actividad óptima entre 50 °C y 55 °C (Kango & Jain, 2011).

Tanto las condiciones óptimas de actividad como la estabilidad enzimática son tópicos que se encuentran directamente relacionados con la aplicación de las enzimas. Son varios los fenómenos que pueden desencadenar la inactivación enzimática incluyendo la autólisis, la agregación y/o la desnaturalización proteica. Relacionado con los fenómenos de inactivación enzimática se ha investigado el uso de agentes termoestabilizantes tales como polioles, que tienen la capacidad de proteger a las enzimas ejerciendo acción sobre las interacciones hidrofóbicas presentes entre los aminoácidos no polares y también en las uniones hidrofílicas de las moléculas de agua que rodean a las moléculas de enzimas (Cavello, 2013).

Por otra parte, los iones metálicos como Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ag^+ , Mn^{2+} , Hg^+ entre otros, tienen diversas maneras para afectar la estabilidad y flexibilidad de las enzimas. Estimulan o inhiben la catálisis enzimática al hacer cambios en su organización molecular. Se informó que Zn^{2+} , Fe^{2+} y Mg^{2+} tienen un efecto estimulante, mientras que Co^{2+} , Cu^{2+} y Ni^{2+} tienen un efecto inhibitorio sobre la inulinasa recombinante purificada de *Paenibacillus polymyxa*. También se ha demostrado que el Ca^{2+} actúa como estabilizador de la exoinulinasa de *Streptomyces griseus*, mientras que Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} y Mn^{2+} la inhiben (Singh & Singh, 2017).

En referencia a la afinidad por los sustratos, las inulinasas expresan afinidad hacia varios de ellos. El peso molecular (PM), la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la velocidad máxima (V_{max}) son propiedades bioquímicas importantes de una enzima. Mientras que el PM ayuda a comprender la estructura heteromérica y cualquier alteración conformacional, el K_M y V_{max} son

importantes para comprender la afinidad por el sustrato y la cinética de las enzimas.

Las inulinasas fúngicas tienen un peso molecular promedio de más de 50 kDa. Guimarães *et al.* (2007) purificaron y caracterizaron inulinasas de *Aspergillus ochraceus* que tenían un peso molecular estimado de 79 kDa, Chi *et al.* (2009) aislaron inulinasas de *Penicillium* spp. con un peso molecular de 68 kDa y Kochhar *et al.* (1997) a partir de *Aspergillus versicolor* aislaron una enzima de 250 kDa. Las cepas bacterianas y de levadura producen inulinasas de peso molecular similar (Holyavka *et al.*, 2016).

11. Clonado y expresión de genes

La expresión de proteínas recombinantes se refiere a la síntesis de una proteína, producto de la expresión de un gen exógeno en una célula hospedadora, lo cual involucra técnicas de manipulación genética.

A finales del siglo XX, se comenzaron a producir las primeras proteínas recombinantes para uso industrial. Desde entonces, este tema se ha investigado continuamente para mejorar su rentabilidad y avanzar en la optimización de los bioprocesos.

La tecnología de ADN recombinante ofrece, hoy en día, una amplia variedad de alternativas en la producción de proteínas con nuevas y mejores propiedades. Por otra parte, la bacteria Gram negativa, *Escherichia coli* y las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, entre otras, han demostrado ser hospedadores eficientes para la expresión de este tipo de proteínas y se han convertido en importantes alternativas para la producción a gran escala (Singh *et al.*, 2017, Baghban *et al.*, 2019).

La elección del hospedador, sea procariota o eucariota, es la resultante de diversos factores que abarcan desde la complejidad de la molécula a producir hasta la economía y eficiencia del proceso de fermentación o cultivo celular.

La ventaja del uso de microorganismos para la obtención de enzimas recombinantes es que estos se reproducen a un ritmo acelerado, son fáciles de manipular genéticamente, crecen en un amplio rango de condiciones ambientales y tienen una gran variedad de vías metabólicas, haciendo que el

proceso de obtención de enzimas sea más económico (Demain & Vaishnan, 2009).

Escherichia coli se ha utilizado ampliamente como hospedadora para la expresión de proteínas recombinantes en las últimas décadas ya que se cuenta con un amplio conocimiento de su genética, crece rápidamente y su cultivo es económico. Dado que esta bacteria carece de la maquinaria intracelular para realizar modificaciones postraduccionales, es una limitante la aplicación de este sistema para proteínas eucariotas. Por lo tanto, la expresión exitosa en *E. coli* depende de la secuencia de la proteína, el pliegue secundario y terciario, y las características funcionales de la proteína recombinante (Singh *et al.*, 2017).

Dentro de las levaduras, la más comúnmente utilizada ha sido *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, en el último tiempo han aumentado notoriamente los estudios que utilizan *Pichia pastoris* como sistema de expresión. La mayor ventaja de *Pichia pastoris* respecto de *S. cerevisiae* es que realiza modificaciones post-traduccionales, como por ejemplo la glicosilación, más similares a las que realizan los organismos eucariotas superiores (Hamilton & Gerngross, 2007).

12. Sistema de expresión: *Pichia pastoris*

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica perteneciente al grupo de los Ascomicetes que se reproduce por gemación homotética y cuya dotación genómica permanece haploide (Cereghino & Cregg, 2000). Posee ciertas propiedades que justifican el éxito de su utilización como sistema eucariota de expresión de proteínas heterólogas y entre estas se destaca un promotor de elevado nivel de transcripción e inducible en presencia de metanol.

Su capacidad de crecer en metanol como única fuente de carbono se debe a que posee un sistema enzimático capaz de metabolizar por una ruta que involucra a las enzimas alcohol oxidasa (AOX), catalasa y formaldehído deshidrogenasa, entre otras, como se observa en la figura 7.

Existen dos genes en *Pichia pastoris* que codifican para la AOX, los genes *AOX1* y *AOX2*. Las proteínas producto de ambos genes tienen una similitud del 97 % y poseen aproximadamente la misma actividad específica. Sin embargo, la gran mayoría de los transcriptos provienen del gen *AOX1*. Por lo tanto, la

Por otro lado, las modificaciones postraduccionales se asemejan más a la de los organismos eucariotas superiores que las expresadas, por ejemplo, por *S. cerevisiae* (Hamilton & Gerngross, 2007).

Pichia pastoris secreta bajos niveles de proteínas nativas. Esto combinado con la capacidad de crecer en medios mínimos facilita la recuperación y la purificación de las proteínas heterólogas.

Además, se ha incorporado la señal de secreción nativa de *S. cerevisiae* (α -factor) al vector de expresión, lo que implica la secreción de proteínas heterólogas de manera eficiente simplificando la purificación de la proteína producida. Todas estas características hacen de *Pichia pastoris* una muy buena opción como hospedador de proteínas heterólogas para su expresión a escala de fermentador (Cregg *et al.*, 1993; Scorer *et al.*, 1993; Cereghino *et al.*, 2002).

Las técnicas de manipulación de esta levadura son muy sencillas y similares a las desarrolladas en *S. cerevisiae*. Son microorganismos fácilmente cultivables en medios sintéticos, poseen rendimientos celulares elevados y producen altas concentraciones de la proteína de interés (Cregg *et al.*, 1993).

Pichia pastoris posee un sistema de respiración aerobia que facilita su cultivo dado que se evita la generación de subproductos indeseables típicos de procesos fermentativos y se obtienen elevadas densidades celulares (> 100 g de peso seco/l) (Manual Invitrogen *Pichia pastoris*, 2014). Puede producir hasta 20 g/l de proteína heteróloga luego de la inducción y se han reportado cultivos en reactores de hasta 10.000 l de capacidad (Chen *et al.*, 1997).

Además, este sistema de expresión está disponible en un kit comercial (Cereghino & Cregg, 2000; Freigassner *et al.*, 2009).

12.1. Vectores de expresión en *Pichia pastoris*

La estructura general de los vectores de expresión de *Pichia pastoris* se compone de un promotor de transcripción, un sitio de clonado múltiple, una secuencia terminadora 3' que asegura una transcripción correcta del gen, un marcador de selección para la levadura, así como una secuencia de replicación y selección propias de *E. coli*.

Estos vectores, en su mayoría, son integrativos, es decir recombinan con zonas homólogas del genoma de la célula asegurando una mayor estabilidad. En

los vectores, las secuencias homólogas pueden ser una región del gen *AOX1* o el gen *his4* que codifica para la histidinol deshidrogenasa (Cregg *et al.*, 1993).

Cuando la recombinación se produce en el gen *his4*, como se representa en la figura 8, implica la incorporación del mismo en el genoma de la levadura pudiendo efectuar la reversión de auxotrofia (selección de los clones transformados His⁺, en cepas originalmente His⁻). Cuando la recombinación se da entre la zona 3' del gen *AOX1* del vector y del genoma esto puede generar la delección del gen *AOX*. Esto lleva a desproveer a la célula del 90 % de la enzima alcohol oxidasa, quedando tan solo el gen *AOX2* funcional.

Este tipo de células metabolizan muy lentamente el metanol debido a la baja concentración de la enzima alcohol oxidasa sintetizada y se conocen como Mut^s. Se denominan cepas Mut⁺ a aquellas que la recombinación e inserción del casete de expresión no implica la interrupción del gen *AOX1*, la síntesis de la enzima no se ve afectada y la velocidad de crecimiento en presencia de metanol como única fuente de carbono es superior que en las Mut^s (Schotte *et al.*, 2016). El fenotipo Mut^s es el más utilizado para la producción de proteínas recombinantes ya que con él se reducen los problemas operativos observados en cepas Mut⁺ con respecto a los requerimientos mayores de metanol y oxígeno disuelto. Adicionalmente, las cepas con fenotipo Mut^s alcanzan mayores niveles de expresión de la proteína que los observados con cepas Mut⁺, y son menos sensibles que las cepas Mut⁺ a concentraciones de metanol. Sin embargo, las cepas Mut^s presentan tiempos prolongados de inducción para lograr el máximo de producción y bajas tasas de crecimiento (Serrano Rivero *et al.*, 2016).

Según como se realice la linealización del plásmido se originan uno o dos extremos homólogos al gen *AOX1*, de manera que se favorece la recombinación simple o doble (Cregg *et al.*, 1993). Cuando se produce la recombinación simple la inserción del gen foráneo se obtiene sin afectar al gen *AOX1* cromosómico. Por el contrario, cuando se produce la recombinación doble, la incorporación del vector se da por sustitución y por lo tanto la pérdida del gen *AOX1* (Manual Invitrogen, 2014).

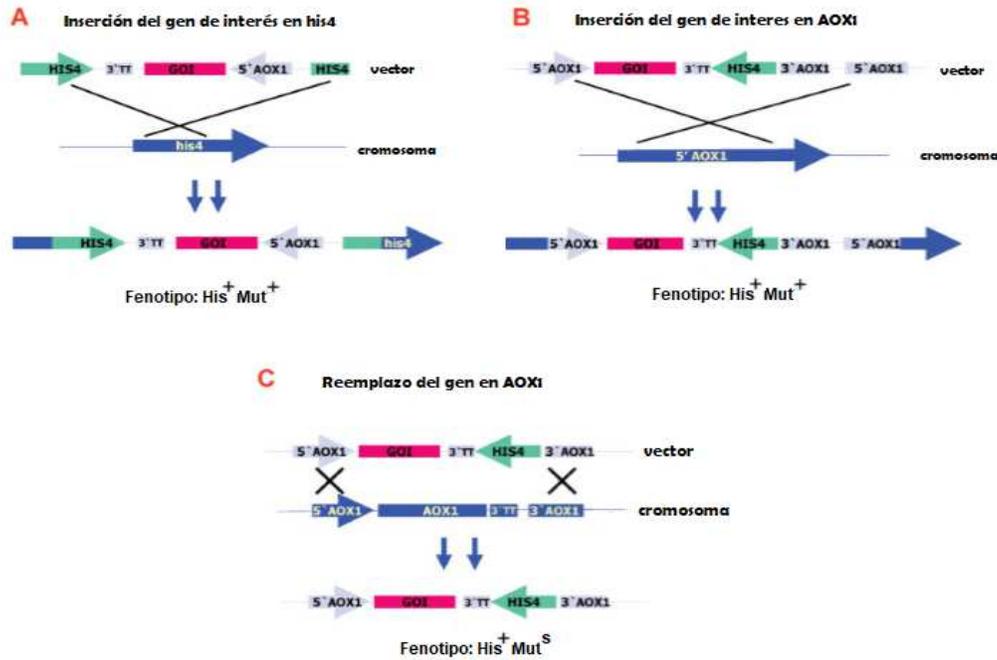


Figura 8. Integración en el genoma de *Pichia pastoris*, mediante (A, B) inserción de genes y (C) reemplazo de genes

Adaptado de Daly & Hearn (2005)

13. Cultivo de *Pichia pastoris* recombinante

Los cultivos con cepas recombinantes de *Pichia pastoris* se llevan a cabo en tres fases. La primera fase consiste en un cultivo *batch* donde se utiliza glicerol como FCE, la segunda fase consiste en un cultivo *batch* alimentado donde se produce la desrepresión del promotor pAOX1 y se busca el aumento de masa celular. En esta etapa no se observa la producción de la proteína recombinante debido a que el promotor que dirige la síntesis se encuentra reprimido por la presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables. En la tercera fase, de inducción, se reemplaza la fuente de carbono y energía por metanol, se activa el promotor del gen *AOX1* y se produce la síntesis de la proteína recombinante.

Pichia pastoris se ha consolidado como un sistema de expresión eficaz para la producción de proteínas heterólogas con diferentes propiedades y características. El número de publicaciones crece de forma exponencial y pueden citarse, entre otros: Zhang *et al.* (2008) reportaron el clonado y la expresión de una inulinasa de *Pichia guilliermondii* en el sistema de expresión de *Pichia*

pastoris X-33 obteniendo una actividad máxima de $8,7 \pm 0,12$ U/ml; He *et al.* (2013) clonaron el gen optimizado de una endoinulinasa de *Aspergillus niger* CICIM F0620 que expresaron en *Pichia pastoris* alcanzando una actividad de 1349 U/ml, 4 veces más que la observada utilizando el gen nativo; Chen *et al.* (2015) clonaron y sobreexpresaron el gen de una endoinulinasa de *Aspergillus fumigatus* en *Pichia pastoris* con una actividad máxima de 3860 U/ml.

Estos son los motivos por los cuales se eligió este sistema de expresión para desarrollar este trabajo.

14. Inmovilización de enzimas

Se entiende por inmovilización al proceso por el cual se confina una enzima en un espacio definido, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser re-utilizadas. También puede definirse como el proceso por el cual se restringe, completa o parcialmente, el movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte.

La inmovilización es una herramienta muy poderosa para mejorar las propiedades de una enzima, como la estabilidad, la actividad, la especificidad, la selectividad, así como disponer de mayores aplicaciones.

Cuando una enzima tiene interés industrial para una determinada reacción, su aplicación está normalmente limitada por la falta de una estabilidad operacional en las condiciones del proceso y también por la dificultad de recuperar y reciclar el biocatalizador. Una vez el catalizador está inmovilizado pasa de ser un catalizador soluble a presentar las siguientes ventajas: reutilización o uso continuado, fácil separación de la mezcla de reacción, posibilidad de modular las propiedades catalíticas, prevención de la contaminación del producto con proteínas, prevención de una contaminación microbiana, posible estabilización de la estructura tridimensional de la enzima (Cavello, 2013).

Las enzimas se pueden unir al soporte a través de procesos reversibles o irreversibles. La inmovilización reversible hace referencia a que las enzimas inmovilizadas pueden ser separadas del soporte. Los métodos utilizados son la adsorción, la interacción iónica, la inmovilización por afinidad, la quelación y la mediada por puentes disulfuro como se muestra en la figura 9.

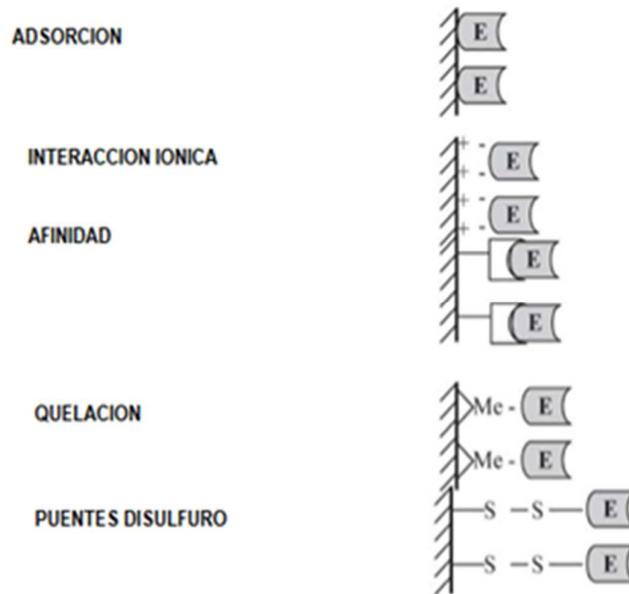


Figura 9. Métodos reversibles de inmovilización enzimática

Adaptado de Brena & Viera, 2006

Los métodos más comunes de inmovilización irreversible de enzimas son la unión covalente, el entrapamiento, la micro-encapsulación, y el reticulado (cross-linking), como se observa en la figura 10.

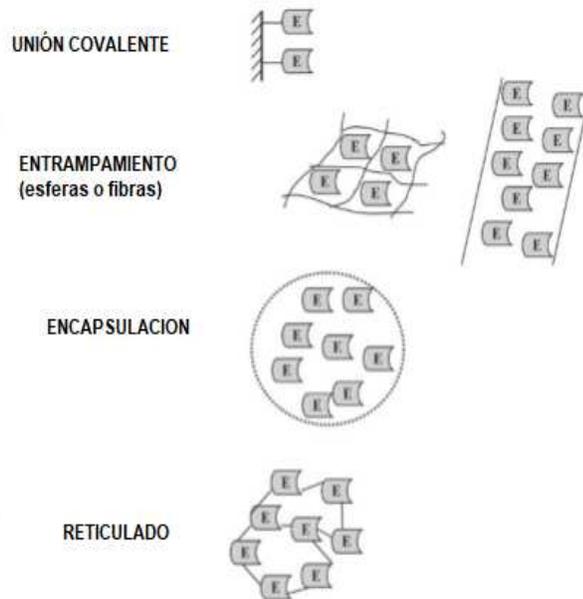


Figura 10. Métodos irreversibles de inmovilización enzimática

Adaptado de Brena & Viera, 2006

El método de unión covalente supone la unión irreversible entre enzima y el soporte, los enlaces que se forman son fuertes y estables, impidiendo que la enzima se libere al medio de reacción. Para obtener elevada eficiencia de inmovilización, es importante que los aminoácidos esenciales para la catálisis no estén involucrados en la unión covalente. Existen muchos soportes, que incluyen esferas de alginato, sustancias poliméricas naturales como la quitina y el quitosán, así como resinas de intercambio iónico, utilizadas para la inmovilización de inulinasas (Brena & Viera, 2006).

El quitosán se ha considerado como una matriz ideal para la inmovilización de enzimas, ya que puede usarse en forma de gel, perla, membrana o polvo. Además, los grupos amino y los grupos hidroxilo presentes en su estructura favorecen la adsorción o la unión covalente de la enzima para la inmovilización. Estas propiedades y el hecho de ser biocompatible, biodegradable y no tóxico son las razones de su elección en procesos de inmovilización (Singh *et al.*, 2017).

Un gran número de informes sobre la producción de fructosa a partir de inulina y materiales vegetales ricos en inulina mediante inulinasas inmovilizadas en sistemas discontinuos y continuos están disponibles en la literatura. Se pueden citar, entre otros, los trabajos de Yewale *et al.* (2013) que inmovilizaron en esferas de quitosán una exoinulinasa de *Aspergillus niger* consiguiendo una buena productividad en una columna de lecho empaquetado; Trivedi *et al.* (2015) inmovilizaron una exo inulinasa de *Aspergillus tubingensis* en esferas de quitosán logrando incrementar la estabilidad térmica de la enzima y a ciertos iones metálicos.

En función de lo antedicho se decidió estudiar, en el marco del presente trabajo de tesis, el clonado y la expresión en forma recombinante de la enzima inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en la levadura *Pichia pastoris* con la finalidad que pueda ser aplicada en procesos biotecnológicos. Para ello se establecieron los objetivos que se expresan a continuación.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general del trabajo es producir, purificar, caracterizar, y clonar una inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en cultivos líquidos sumergidos y en cantidades para satisfacer su demanda en procesos industriales.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos propuestos para el desarrollo de este trabajo son los siguientes:

- Estudiar la producción de inulinasas silvestres de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en fermentaciones líquidas, sus características bioquímicas utilizando yacón como FCE.
- Clonar y sobreexpresar la inulinasa producida por *Aspergillus kawachii* IFO 4308 que resulte de interés para su aplicación posterior.
- Estudiar el efecto del sistema de cultivo sobre la producción heteróloga de las inulinasas recombinantes, inicialmente en cultivos batch y luego en cultivos de alta densidad (batch alimentado). Sentar las bases para la optimización del proceso de producción a escala.
- Caracterizar la inulinasa recombinante producida a nivel molecular y bioquímico y compararla con la inulinasa silvestre.
- Estudiar la inmovilización y las posibles aplicaciones de la inulinasa recombinante, particularmente, la hidrólisis de fructanos y producción de FOS.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas microbianas

A continuación, se numeran las cepas microbianas utilizadas en este trabajo.

- *Aspergillus kawachii* IFO 4308 provista por el Institute of Fermentation de Osaka, Japón y que pertenece a la colección de microorganismos del CINDEFI (Universidad Nacional de la Plata, Argentina).

- *E. coli* TOP10F' (Invitrogen Co. Ltd., USA): F' {proAB, lacI q, lacZΔM15, Tn10 (TetR)} mcrA, Δ (mrrhsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, λ - araD139, Δ (ara-leu) 7697, galU, galK, rpsL (StrR), endA1, nupG.

- *E. coli* DH5a (Invitrogen Co. Ltd., USA): F- φ80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF)169 recA1 endA1 hsdR17(rK-K+)phoA supE44λ-thi-gyrA96 relA1

- *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen Co. Ltd., USA): genotipo *his4* fenotipo His⁻ Mut⁺

- *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen Co. Ltd., USA): Genotipo *wild type*, fenotipo Mut⁺

2. Vectores de clonado y expresión

En este trabajo se utilizaron los vectores de expresión pPIC9, pPICZαA y pGEM®-T Easy, que se representan esquemáticamente en la figura 9, 10 y 11.

- Vector pPIC9 (Invitrogen Co. Ltd., USA): es un plásmido integrativo para el genoma de *Pichia pastoris* que contiene 8023 pb. Posee un sitio de origen de replicación *pBR322* y un gen de resistencia a ampicilina que permiten obtener un alto número de copias en *E. coli* y seleccionar las células transformadas respectivamente; la secuencia del péptido señal del factor α de *S. cerevisiae* que permite la secreción de la proteína de interés al exterior celular; el gen *his4* que codifica para la enzima histidinol deshidrogenasa necesaria para la síntesis de histidina y permite la selección de recombinantes en *Pichia pastoris*; un sitio de clonado múltiple que contiene sitios únicos de reconocimiento para las enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII*, entre otras; la secuencia pAOX1

que corresponde al promotor inducible con metanol, como puede observarse el esquema presentado en la figura 11 realizado con el programa *Snappene* (GSL Biotech LLC, USA).

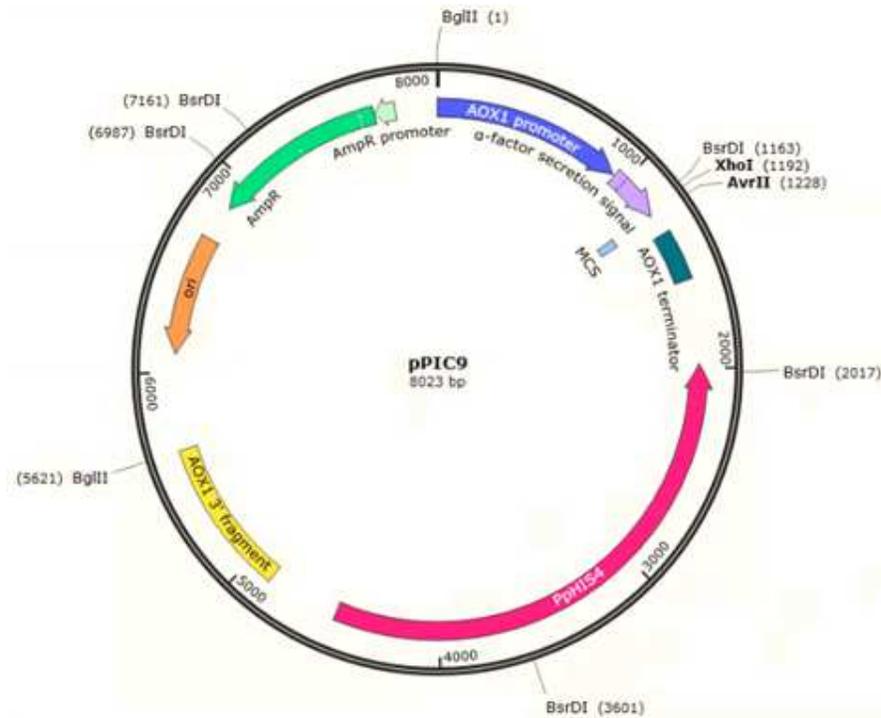


Figura 11. Esquema del vector de expresión pPIC9

- Vector pPICZαA (Invitrogen Co. Ltd., USA): es un plásmido integrativo en el genoma de *Pichia pastoris* que contiene 3393 pb. Posee un origen de replicación pUC que permite la replicación y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*; un gen de resistencia a zeocina para la selección de clones que presenten múltiples copias del gen de interés integrado en el genoma (esto lo diferencia del vector pPIC9 que solo presenta una única copia); el péptido señal del factor α de *S. cerevisiae* que permite la secreción de la proteína de interés al exterior celular; un sitio de clonado múltiple que contiene sitios únicos de reconocimiento para las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI*, entre otras; la secuencia pAOX1 que corresponde al promotor inducible con metanol; la secuencia C-terminal de polihistidina, que codifica para seis moléculas de histidina que se fusionan a la proteína de interés y facilita la purificación de la proteína recombinante; entre otras secuencias que pueden observarse en el esquema presentado en la figura 12 y realizado con el programa

Snappgene (GSL Biotech LLC, USA).

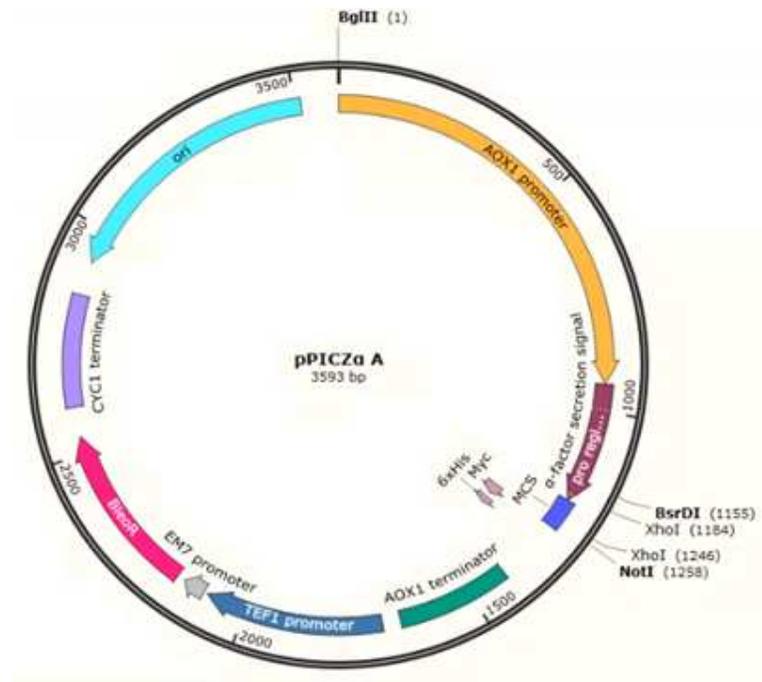


Figura 12. Esquema del vector de expresión pPICZαA

- Vector pGEM[®]-T Easy (Promega, Corporation, Madison, WI, USA): es un plásmido de 3015 pb adecuado para clonar productos de PCR. Este vector, en su forma lineal, posee un nucleótido de timina en sus extremos 3', los cuales actúan como extremos cohesivos con los fragmentos de ADN amplificados por PCR, cuando son generados con un nucleótido de adenina en los extremos 3' y también impiden la recircularización aumentando la eficiencia del proceso de ligación.

Para seleccionar los clones positivos, el sitio de clonado múltiple del vector interrumpe la secuencia codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa que hidroliza el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-gal), generando un producto de color azul. Así, proporcionando este sustrato al medio de cultivo LB, las colonias que adquieren este color se identifican como negativas, y las blancas como positivas. El vector posee otras secuencias que pueden observarse en el esquema presentado en la figura 13, realizado con el programa *Snappgene* (GSL Biotech LLC, USA).

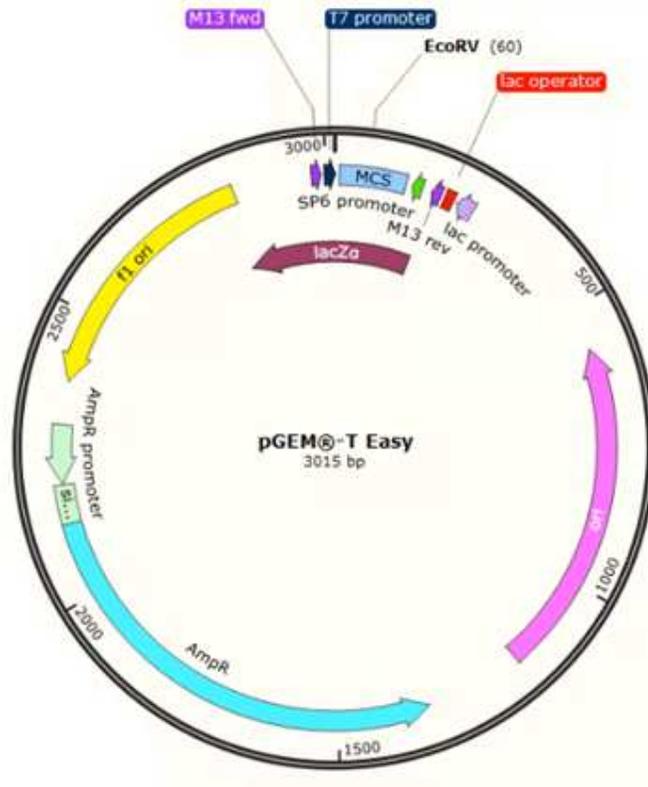


Figura 13. Esquema del vector de clonación pGEM®-T Easy

3. Medios de cultivo, sales traza y buffers

- Medio de cultivo Luria Bertani (LB): 1 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura y 1 % de NaCl, ajustado a pH 7,5 con NaOH.
- Medio de cultivo LB con baja concentración de NaCl: 1 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura y 0,5 % de NaCl, ajustado a pH 7,5 con NaOH.
- Agar LB: medio líquido más 1,5 % de agar-agar.
- Medio de cultivo Levadura peptona dextrosa (YPD): 1 % extracto de levadura, 2 % peptona y 2 % dextrosa (glucosa) pH 6,0.
- Medio de cultivo Mínimo Dextrosa (MD): 1,34 % solución base de nitrógeno para levaduras (YNB), 4×10^{-5} % biotina y 2 % dextrosa.
- Medio buffer glicerol complejo (BMGY): 1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 1,34 % YNB, 4×10^{-5} % biotina, 1 % glicerol y 100 mM fosfato de potasio, pH 6,0.
- Medio buffer metanol complejo (BMMY): 1% extracto de levadura, 2% peptona, 1,34 % YNB, 4×10^{-5} % biotina, 0,5 % metanol y 100 mM

fosfato de potasio, pH 6,0.

- Medio de cultivo salino basal (BSM) 0,5X: 0,92 % de K_2SO_4 ; 0,21 % de KOH; 1,36 % de H_3PO_4 (85 % (v/v)); 0,75 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,46 % de $Ca_2SO_4 \cdot 2H_2O$; 2,6 % de glicerol (99 % (v/v)) y cantidad necesaria de NH_4OH para ajustar el pH a un valor de 5,0.
- Medio de cultivo agar papa dextrosa: 20 % de hojuelas de papa, 2 % de dextrosa y 1,5 % de agar.
- Medio SOC: 2 % de bacto triptona, 0,5 % extracto de levadura, 0,05% de NaCl, 0,018 % KCl, 0,19 % $MgCl_2$, 3,6 % glucosa, pH 7,0.
- Sales traza (PTM): 0,2 % de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,7 % de $ZnCl_2$; 0,008 % de NaI; 2,20 % de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,3 % de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,02 % de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0,002 % de ácido bórico; 0,05 % $CoCl_2$ y 0,2 % H_2SO_4 .

4. Producción de inulinasa silvestre

4.1. Propagación del inóculo *Aspergillus kawachii* IFO 4308

La cepa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 fue provista por el Instituto de Fermentaciones, Osaka, Japón y pertenece a la colección de microorganismos del CINDEFI (Universidad Nacional de la Plata, Argentina).

Los esporos liofilizados de este hongo filamentoso se resuspendieron en Tween 80 al 0,01 % p/v y luego se propagaron a 28 °C en tubos con medio agar papa dextrosa (APD). Una vez obtenidos los conidios, el agar fue cubierto por glicerol esterilizado al 10 % p/v. Finalmente, los tubos se mantuvieron a 4 °C a fin de conservar las cepas como cultivo stock.

Para la producción de conidios, se tomó una muestra del cultivo stock y se sembró en medio APD (30 ml de medio en matraces *Erlenmeyer* de 125 ml). Después de 7 días de incubación a 28 °C, los conidios se resuspendieron en 20 ml de solución estéril de Tween 80 al 0,01 % v/v. La concentración de conidios se determinó mediante recuento directo al microscopio de contraste de fases utilizando una Cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania), y se utilizaron como inóculo en los cultivos líquidos (Contreras Esquivel *et al.*, 2003).

El desarrollo del moho se observó tanto en el crecimiento en placa como al microscopio óptico (Olympus Life Science, Japón) utilizando objetivos de 10 X y 40 X.

4.2. Ensayo cualitativo de la producción de inulinasa

Para comprobar la actividad inulinasa de *Aspergillus kawachii* se realizó un cultivo en placa con agar papa dextrosa (APD) suplementado con 1 % p/v de inulina. Después de la incubación (28 °C durante 5 días), el medio se tiñó con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 0,1 % p/v en 0,5 M de NaOH por 20 minutos en oscuridad. Se retiró el exceso de colorante y la zona de hidrolisis de inulina se confirmó por la presencia de color rojo. Se utilizó como control negativo un cultivo *Paecilomyces lilacinus* LPS 876 del que se sabe que no produce enzimas con actividad inulinasa.

4.3. Preparación del sustrato

Las muestras de tubérculos de yacón fueron provistas por el Prof. Alfredo Grau, Instituto de Ecología Regional de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. Para la obtención del extracto de yacón, los tubérculos fueron lavados, pelados, cortados en rodajas y prensados manualmente. Este producto y la pulpa remanente (bagazo o pomaza) se conservaron en freezer a -20 °C hasta su utilización.

El extracto obtenido del prensado de los tubérculos presentó color verde, como se muestra en la figura 14, que cambió a un color más oscuro a medida que fue tomando contacto con el oxígeno. Este extracto se esterilizó por filtración utilizando filtros de membrana de acetato de celulosa de 47 mm de diámetro con un tamaño de poro 0,22 µm (Sartorius, Alemania) y luego se conservó en freezer a -20 °C hasta su utilización.



Figura 14. Las imágenes muestran el procedimiento de extracción del extracto del yacón, su aspecto y el sólido remanente (bagazo) luego del procedimiento

Fuente: Manrique *et al.*, 2004

Por otro lado, el bagazo de yacón se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

El extracto y el bagazo de yacón se caracterizaron evaluando el contenido de azúcares totales y azúcares reductores. La extracción de azúcares en el bagazo se llevó a cabo calentando la muestra 1 h a 80 °C previo agregado de agua en una relación 2:1 (peso de agua/peso de pulpa) (Brites & Zapata Noreña, 2016).

4.3.1. Determinación de azúcares totales solubles

Se utilizó la técnica de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Para esto a 40 µl de muestra se adicionaron 160 µl de agua, 200 µl de fenol al 5 % (p/v) y 1 ml de H₂SO₄ al 96 %. Se incubó 20 minutos a 25 °C. Posteriormente se leyó la absorbancia a 490 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando como patrón fructosa 0,1 % (p/v).

4.3.2. Determinación de azúcares reductores

Se utilizó el método de Somogyi-Nelson (Herber *et al.*, 1971). Para esto, se adicionaron 200 µl del reactivo de Somogyi a igual volumen de muestra, y la solución se llevó a ebullición por 10 minutos. Luego, cada tubo de reacción se dejó enfriar durante 10 minutos y se agregaron 200 µl del reactivo de Nelson. La mezcla resultante se agitó en vortex, se dejó reposar durante 30 minutos y se agregó 1,80 ml de agua destilada. Finalmente, se leyó la absorbancia a 660 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando como patrón fructosa en una concentración de 0,1 % (p/v).

4.4. Cultivo de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en medio líquido

Se realizaron cultivos de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en medio líquido a los efectos de estudiar la producción de inulinasas en este sistema de cultivo. La composición del medio de cultivo base, en porcentaje p/v, fue la siguiente: NaNO₃, 0,2; K₂HPO₄ 0,1; KCl, 0,05; MgSO₄·7H₂O, 0,05; FeSO₄·6H₂O, 0,001. Todos los componentes del medio se esterilizaron durante 15 minutos, con excepción del extracto de yacón. Las FCE y los fosfatos fueron esterilizados por separado del resto del medio. El pH se ajustó a 5,0 con solución de H₃PO₄ 1 N.

Se inocularon matraces *Erlenmeyer* (1000 ml), por duplicado, que contenían 200 ml de medio con 6 log esporas/ml y se incubaron a 30 °C en un agitador orbital (New Brunswick Scientific, USA) a 250 rpm durante hasta 7 días. Se tomaron muestras de 20 ml a intervalos de 6 h. El micelio se separó por filtración (Whatman # 41) para la determinación de biomasa. En el filtrado se determinó actividad inulinasa, para lo cual se prepararon duplicados de la muestra reacción, así como un control de enzima y un control de sustrato como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Muestra reacción, control enzima y control sustrato

Muestra reacción	Control enzima	Control sustrato
180 µl sustrato (inulina)	180 µl de agua	180 µl sustrato (inulina)
20 µl de muestra	20 µl de muestra	20 µl de agua

Los tubos de la muestra reacción, control enzima y control sustrato se incubaron por 120 minutos a 37 °C. Luego, se determinó la concentración de azúcares reductores, liberados por hidrólisis de la inulina, siguiendo la metodología de Somogyi-Nelson descrita en inciso 4.3.2. Como sustrato se utilizó inulina con una concentración de 0,05 % (p/v) disuelta en buffer citrato fosfato (BCP: 50 mM de ácido cítrico, 25 mM de Na₂HPO₄) ajustado a pH 5,0 con NaOH. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que genera un µmol de producto por minuto en las condiciones de reacción establecidas.

4.4.1. Efecto de fuentes de carbono y energía

El efecto de las diferentes fuentes de carbono (1 % p/v), sacarosa, glucosa, fructosa, inulina, bagazo de yacón y extracto de yacón individualmente y en combinación con yacón (0,5 % p/v, como inductor) se estudió en el medio basal de producción.

Para determinar la concentración óptima de extracto de yacón se formularon medios de cultivo con distintas concentraciones entre 0,2 y 1,2 % p/v de azúcares totales. También se evaluó el efecto de diferentes fuentes de carbono (1 % p/v) combinadas con extracto de yacón (0,7 % p/v).

4.4.2. Efecto de la naturaleza de las fuentes de nitrógeno

Se determinó la FN que produjo mayor actividad enzimática. Para esto se estudió el efecto de la suplementación al medio base de distintas fuentes de nitrógeno (FN), utilizando como FCE extracto de yacón a una concentración de 0,7 % de azúcares totales. Se utilizaron FN orgánicas (extracto de levadura, urea, triptona) e inorgánicas ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y NaNO_3 como control) en una concentración 0,2 % (p/v).

Finalmente, se determinó la concentración óptima de extracto de levadura desde 0,1 % a 0,5 % en las mismas condiciones de cultivo.

4.4.3. Efecto de la temperatura

Se estudió el efecto de tres temperaturas diferentes de trabajo (20, 28 y 37 °C) a pH 5. El medio de cultivo base, descrito en el inciso 4.4, se suplementó con extracto de yacón (0,7 % de azúcares totales).

4.4.4. Efecto del pH

Se estudió el efecto de seis valores de pH iniciales (3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0; 7,0) a 28 °C en el medio de cultivo base, descrito en el inciso 4.4, suplementado con extracto de yacón (0,7 % de azúcares totales).

4.4.5. Efecto de la variación del inóculo

El inóculo se preparó resuspendiendo esporas de un cultivo de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en APD, luego de 7 días de incubación a 28 °C, en agua destilada con 0,01 % de tween 80. Los esporos se contaron utilizando una cámara de Neubauer. El tamaño del inóculo se optimizó inoculando al medio 5, 6 y 7 log conidios/ml que corresponden a un inóculo de 0,1; 1 y 10 % conidios/ml, respectivamente, partiendo de un inóculo inicial de 8 log.

Los datos obtenidos en cada experiencia (incisos 4.4.1. a 4.4.5) se analizaron mediante un análisis de varianza (*one way-ANOVA*) utilizando el test de Tukey HSD para la comparación entre las medias, con un nivel de significancia de $p < 0,05$ utilizando el programa Infostat 2.0. Los resultados se presentan como la media de tres determinaciones \pm DS.

4.4.6. Cultivo en matraces Erlenmeyer en las condiciones mejoradas

Teniendo en cuenta las condiciones óptimas obtenidas de los ensayos del efecto de las FCE, fuente de N, pH, temperatura y concentración de inóculo se realizó un cultivo con las condiciones óptimas determinadas en matraces *Erlenmeyer* (1000 ml) conteniendo 200 ml de medio en un agitador orbital (250 rpm) durante 7 días. Se tomaron muestras de 15 ml a diferentes intervalos. Los extractos crudos se analizaron en términos de actividad de inulinasa extracelular, pH, azúcares totales y biomasa fúngica. Esta última determinación se realizó mediante la medición del peso seco, para lo cual la muestra se filtró utilizando filtros de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0,65 μm y se secó en estufa a 105 °C hasta peso constante. Se determinaron los parámetros de la curva de crecimiento tales como la fase lag y la velocidad específica en fase exponencial.

4.4.7. Cultivo en biorreactor en las condiciones mejoradas

El medio de cultivo optimizado se empleó para crecer *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en biorreactor de tipo tanque agitado a fin de verificar si los rendimientos en actividad inulinasa son reproducibles en las condiciones ambientales de un fermentador.

Los cultivos en batch se llevaron a cabo en 4 litros de medio de cultivo en un fermentador de 5 l (LH 210, Inceltech, Francia), utilizando el extracto de yacón como FCE, a 30 °C, con aireación (1,0 vvm) y agitación (450 rpm). El pH del cultivo se midió con un electrodo de vidrio (Mettler-Toledo, USA). El oxígeno disuelto se midió con un electrodo de tipo polarográfico (Mettler-Toledo, USA).

Se tomaron muestras de 15 ml a diferentes intervalos. El micelio se separó por filtración (*Whatman* # 41). Los extractos crudos se analizaron en términos de actividad de inulinasa extracelular, pH, azúcares totales y biomasa fúngica.

4.5. Caracterización bioquímica del extracto enzimático

Con la finalidad de caracterizar bioquímicamente el extracto enzimático obtenido en biorreactor se estudió el efecto de la temperatura, el pH y la acción de los iones metálicos, propilenglicol, etilenglicol sobre la estabilidad y actividad de la inulinasa, según se detalla a continuación.

4.5.1. Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de la inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 se midió en términos de actividad residual después de la incubación de una muestra de filtrado de cultivo en CPB (pH 5) a diferentes temperaturas (37 °C, 45 °C, 55 °C y 65 °C) durante 180 minutos.

Para estudiar la vida media de la enzima se asumió una cinética de inactivación de primer orden por lo que, a partir de los datos obtenidos, se realizaron los cálculos a partir de las siguientes ecuaciones:

$$A_t/A_o = e^{-k_d t}$$

donde A_t es la actividad enzimática luego de transcurrido un tiempo t , A_o es la actividad enzimática inicial, k_d es la constante de inactivación de primer orden y t es el tiempo.

El tiempo de vida media del extracto enzimático se determinó a partir de la ecuación anterior y es igual a:

$$t_{(1/2)} = \ln(2)/k_d$$

4.5.2. Estabilidad frente a diferentes pH

La estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH se determinó midiendo la actividad residual después de la incubación de una muestra de filtrado de cultivo a 37 °C durante 180 minutos en una mezcla de buffers (Tris-HCl, MES y glicina, 20 mM cada uno), ajustados a diferentes valores de pH entre 3 a 13, variando de a una unidad.

4.5.3. Estudio del pH óptimo

El efecto del pH sobre la actividad de inulinasa se determinó incubando 20 μ l de muestra de filtrado de cultivo diluida adecuadamente en 180 μ l de solución de inulina (0,05 % p/v) midiendo actividad enzimática en una mezcla de buffers (Tris-HCl, MES y Glicina, 20 mM cada uno) ajustado a diferentes valores de pH entre 3 a 13.

4.5.4. Efecto de los iones metálicos y agentes estabilizantes

El efecto de diferentes iones metálicos (K^+ , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{3+}) sobre la actividad de inulinasa se estudió a una concentración de 1 mM, preincubando una muestra de filtrado de cultivo con soluciones de sales

metálicas durante 1 hora a temperatura ambiente. La actividad inulinasa se determinó y expresó como un porcentaje de la actividad residual relativa a un control (100 %) sin tratamiento. Los datos obtenidos en cada experiencia se analizaron mediante un análisis de varianza mediante el test de Tukey HSD para la comparación entre las medias, con un nivel de significancia de $p < 0,05$ utilizando el programa Infostat 2.0. Los resultados se presentan como la media de tres determinaciones \pm DS.

La acción de diferentes estabilizantes térmicos se probó en la actividad inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 incubando el extracto enzimático con cada uno de los siguientes agentes: propilenglicol, glicerol y manitol al 10 %, a una temperatura de 65 °C por 180 minutos. La actividad inulinasa se determinó y expresó como un porcentaje de la actividad residual relativa a un control (100 %) sin tratamiento. Se calcularon la vida media de la enzima y la constante de inactivación para cada uno de los agentes estabilizantes.

4.5.5. Modo de acción de la enzima frente a la hidrólisis de inulina

Una mezcla de reacción conteniendo 1,8 ml de solución de inulina (grado alimenticio) (0,5 g/l, en BCP, pH 3,5) y 200 μ l de extracto crudo se incubó a 37 °C durante 6 horas. Se tomaron muestras cada 1 h. Los productos de hidrólisis de inulina se determinaron cualitativamente mediante cromatografía en capa fina (TLC) usando láminas de 8 cm (Merck, láminas de aluminio TLC 20 x 20 cm, gel de sílice F254). Se tomaron muestras (5 μ l) de hidrolizado. Se usó una mezcla de acetato de etilo: ácido acético: agua (3:1:1, v/v/v) como fase móvil. Las láminas se secaron al aire y los carbohidratos se tiñeron con una solución de ácido sulfúrico en metanol 50:50 (v/v). Posteriormente se pulverizaron con el reactivo de tinción y el color se desarrolló calentando durante 5 minutos a 105 °C. Mediante este procedimiento, la glucosa, la fructosa y la sacarosa (que se utilizaron como patrones) se visualizan como manchas de color marrón oscuro.

5. Producción de inulinasa recombinante

5.1. Métodos generales

Primeramente, se describen las metodologías utilizadas a lo largo de todo el proceso de clonado.

5.1.1. Electroforesis en gel de agarosa

Las preparaciones de los diferentes ácidos nucleicos utilizados en este trabajo de tesis se analizaron en geles de agarosa al 1 % y 1,5 % (p/v) en buffer Tris acetato EDTA (TAE) que contiene 0,04 M Tris-acetato y 0,001 M EDTA.

Las muestras se prepararon: 5 ul de muestra y 1 ul del buffer de siembra (glicerol 50 % (v/v), EDTA 1,0 mM y azul de bromofenol 0,25 % (p/v)). Posteriormente se llevó a cabo la electroforesis en una cuba horizontal (GE Healthcare, USA) aplicando un voltaje de 100 voltios con una fuente de alimentación EPS 301 (Amersham Pharmacy Biotech, USA).

Para visualizar los fragmentos de los ácidos nucleicos en los geles de agarosa se utilizó una solución de bromuro de etidio (Sigma, USA) 0,75 µg/ml en H₂O destilada durante 15 min, observándose posteriormente mediante iluminación con luz ultravioleta en un transiluminador Modelo TM-26 (Labnet International, USA).

Se utilizaron los marcadores de peso molecular de 100 pb y 400 pb PB-L (Productos bio-lógicos S.A. Ladder Precisión, Argentina).

5.1.2 Preparación de células de *E. coli* DH5α competentes

Para la preparación de células competentes se partió de 5 ml de un cultivo de células de *E. coli* DH5α crecidas durante 16 horas a 37 °C e inoculadas en 50 ml de medio LB. El cultivo se incubó a 37 °C con una agitación de 200 rpm hasta que llegó a la fase exponencial de crecimiento ($DO_{600nm} = 0,5 - 0,6$) y se incubó durante 10 minutos en agua hielo. Se separaron las células por centrifugación a 4000 x g durante 10 minutos a 4 °C, el *pellet* se resuspendió en 100 ml de CaCl₂ 100 mM y se incubó durante 30 minutos en agua hielo.

Transcurrido este tiempo, las células se volvieron a separar por centrifugación a 4000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 100 ml de MgCl₂ 100mM. Se incubaron durante 30 minutos en agua hielo, se centrifugaron a 4000 x g durante 10 minutos a 4 °C y el *pellet* se resuspendió en 1 ml de solución de CaCl₂ 100mM, MgCl₂ 100mM y glicerol 30% (v/v). Se fraccionaron alícuotas de 100 µl. Se conservaron a -80° C hasta su utilización.

5.1.3. Preparación de *E. coli* TOP10 electrocompetentes

Para la preparación de estas células de *E. coli* se procedió a inocular 5 ml

de medio LB con bacterias TOP10, cultivar a 37 °C con agitación vigorosa (190-200 rpm) hasta alcanzar saturación (16 h). Luego se diluyó 1/100 el cultivo saturado en 500 ml de medio fresco, a 37 °C con agitación vigorosa (200 rpm) hasta alcanzar una DO_{600 nm} de 0,5 -0,7. Se centrifugó a 4000 x g durante 20 minutos a 4 °C descartando el sobrenadante. Secuencialmente, se utilizaron los volúmenes de 250 ml, 20 ml y 1 ml de la solución de glicerol al 10 % (v/v).

5.1.4. Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina

Para realizar las extracciones de ADN plasmídico, se realizó un cultivo por 16 h a 37 °C y 100 rpm, en 5 ml de medio líquido LB, se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el *pellet* de bacterias en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM (pH 8,0), Tris HCl 25 mM (pH 8,0). Luego de añadir 200 µl de la solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1% (p/v)) y mezclar suavemente por inversión (4 o 5 veces), la mezcla resultante fue incubada en hielo durante 5 minutos.

A continuación, se añadieron 150 µl de la solución III (Acetato de potasio 3M + ácido acético, pH 4,8), se agitó por inversión y se mantuvo otros 5 minutos en hielo. Posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos a 17000 x g y 4 °C, y aproximadamente 400 µl del sobrenadante se transfirieron a un tubo limpio en el que se añadió 1 ml etanol absoluto (frío).

Luego, se centrifugó durante 20 minutos a 17000 x g y 4 °C, descartándose el sobrenadante y lavando el *pellet* resultante con 500 µl de etanol al 70% (frío). El *pellet* se secó a temperatura ambiente y el ADN plasmídico obtenido fue resuspendido en 30 µl de agua bidestilada estéril.

5.1.5. Preparación de células competentes de *Pichia pastoris*

Se inocularon 5 ml de medio YPD con 100 µl de un cultivo stock de la cepa de *Pichia pastoris* correspondiente, Se incubaron a 28 °C por 16 h y 100 rpm. Posteriormente se inoculó en 500 ml de medio YPD fresco en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica a DO_{600 nm} entre 0,5 y 0,7. Se centrifugó a 3000 x g durante 5 minutos a 4 °C, descartándose el sobrenadante.

Se realizaron sucesivos lavados de las células en una solución de sorbitol 1 M estéril a 4 °C. Las células se separaron por centrifugación a 3000 x g durante 5 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Secuencialmente, se utilizaron

volúmenes de 250 ml, 10 ml y finalmente 0,5 ml de la solución de sorbitol 1 M.

5.2. Estrategias de clonado del gen inulinasa

En la figura 15 se esquematizan las estrategias de clonado del gen inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308, una a partir de ARN y dos a partir de ADN, una utilizando el gen inulinasa con intrón en pPIC9 y la otra utilizando el gen inulinasa sin intrón, eliminado in vitro, en pPICZαA.

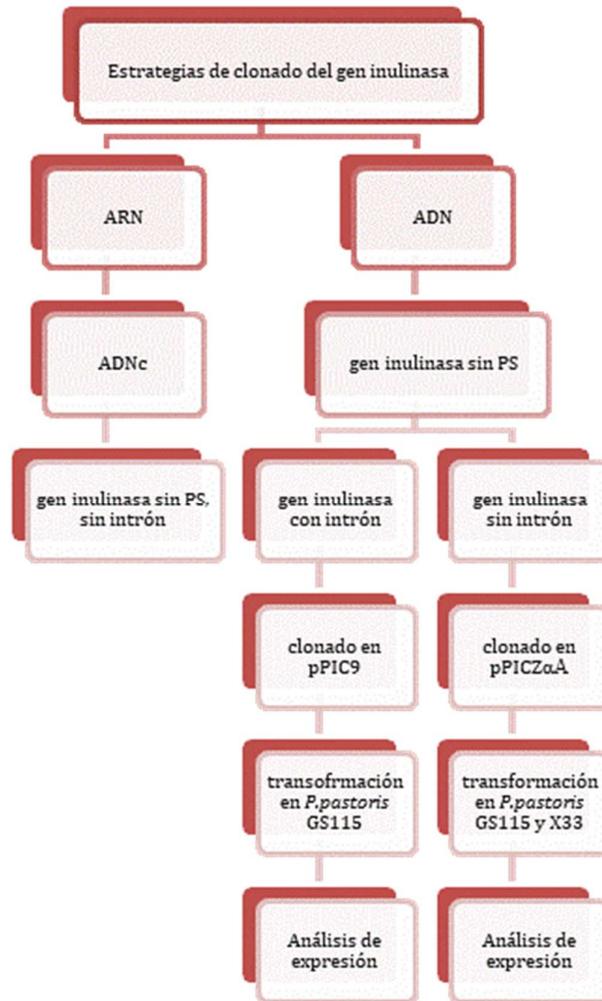


Figura 15. Diagrama de flujo de estrategias de clonado del gen inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308

5.2.1. Estrategia de clonado del gen inulinasa a partir de ARN

Se realizó un cultivo de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en las condiciones óptimas y se tomaron muestras de micelio a las 24, 48 y 72 h.

5.2.1.1. Extracción de ARN de *Aspergillus kawachii* IFO 4308

Para la extracción del ARN de *Aspergillus kawachii*, se utilizó TRI® Reagent (Sigma, USA) según el siguiente protocolo: Se homogeneizaron las muestras, según la relación 100 mg de micelio: 1 ml de TRI® Reagent. Se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente de forma manual durante 15 segundos. Luego se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente y, finalmente, se centrifugó 15 minutos a 12000 x g a 4 °C.

Luego de esta etapa, se observó una separación en la mezcla de dos fases, una inferior orgánica y de color rojo y otra superior, acuosa e incolora, de donde se recuperó el ARN. Se transfirió la fase superior a otro tubo y a ésta se le agregó 500 µl de alcohol isopropílico. Luego de agitar, se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos, a 4 °C y se descartó el sobrenadante (el ARN precipita en el fondo del tubo). Se lavó exhaustivamente el precipitado con etanol 75 % y se agitó con vortex durante 2 minutos. Se centrifugó a 11000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante.

El ARN se resuspendió en agua tratada con DEPC (Dietil pirocarbonato, para la inactivación de ARNasas) y su integridad se analizó mediante un gel de agarosa 1 % (p/v).

Para evaluar la pureza del ARN extraído se tomó una muestra y se determinó la relación A_{260}/A_{230} . Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Micro-UV vis NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA).

5.2.1.2. Síntesis del ADN complementario

A fin de sintetizar ADN complementario (ADNc), el ARN total obtenido fue cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 260 nm en equipo Micro-UV vis NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA).

La obtención de ADNc se realizó mediante una RT-PCR (Reverse Transcription PCR). Esta técnica es una variación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional en la que se obtienen múltiples copias de ADNc a partir de ARN mensajero, usando una transcriptasa reversa y amplificando el producto de la retrotranscripción mediante PCR.

Una característica importante de este tipo de PCR es que el ADNc generado no lleva los intrones que tendría el ADN original. El protocolo seguido para la RT-PCR y los volúmenes añadidos para un total de reacción de 50 µl quedan reflejados en la Tabla 4. La reacción se realizó con 3 µg de ARN. Tras realizar, el ADNc sintetizado se almacenó a - 20 °C.

Tabla 4. Proporciones de componentes de la mezcla de reacción para RT-PCR

Componentes	Cantidad
Buffer 5X (Tris-HCl, KCl, MgCl ₂ , DTT)	10,0 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
Hexámeros (2 µg / µl)	0,3 µl
ARN	3,0 µg
Inhibidor de ARNasas	2,0 µl
H ₂ O DEPC	22,5 µl
MMLV (retrotranscriptasa del Virus de la Leucemia Murina, MMLV, Promega) (200 unidades /µl)	2,5 µl
VOLUMEN FINAL	50,0 µl

5.2.1.3. Amplificación del gen correspondiente a la inulinasa

Con el objetivo de sintetizar ADN in vitro, se utilizó la técnica de PCR siguiendo la metodología descrita por Sambrook, (1989).

El diseño de *primers* se realizó en base a la secuencia aminoacídica N-terminal de la inulinasa purificada de *Aspergillus awamori* y la secuencia aminoacídica consenso VEVFGGQGE, la cual es común entre la fructosiltransferasa de *Aspergillus foetidus* y las inulinasas A y B de *Aspergillus niger* y cercana al C- terminal de estas enzimas. Los diseños de *primers* se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Primers y sitios de reconocimiento introducidos por clonado

Primer P ₁	INU fw	5' TAGTATCTCTCGAGAAGAGAGCTCCCCTCTGTCAAG 3
Primer P ₂	INU rv	5' TACTCTCCTAGGTCAATCCACGTCAAG3'

Tal como se indica, estos *primers* tienen incorporados los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII*, respectivamente (subrayado). Además, el *primer* P₁ tiene el sitio de reconocimiento para la proteasa KEX2 (cursiva y azul).

Para la reacción de PCR se utilizó una taq polimerasa (Promega, USA), como molde, ADN genómico purificado de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 y los *primers* P₁ y P₂ diseñados específicamente para amplificar el gen de la inulinasa. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler pro-S (Eppendorf, Alemania). Las condiciones de reacción fueron: 95 °C 180 segundos, 30 x (95 °C 60 segundos, 55 °C 30 segundos, 72 °C 60 segundos), 72 °C 300 segundos.

La mezcla de reacción para la PCR se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Proporciones de componentes en la mezcla de reacción de PCR para un volumen de reacción de 50 µl

Componentes	Cantidad
Buffer Taq 5X	10 µl
dNTPs 10 Mm	0,4 µl
<i>Primer</i> P ₁ 79 µM	0,5 µl
<i>Primer</i> P ₂ 49 µM	0,5 µl
Taq polimerasa 5 U/µl	0,5 µl
ADN molde	5 ng
Agua bidestilada	c.s.p. 50µl

El producto de PCR se analizó mediante la evaluación de su perfil de restricción mediante la digestión con la enzima de restricción *BsrDI* para corroborar que el gen correspondía al de la inulinasa. Se utilizó esta enzima ya que se determinó, a partir de la secuencia nucleotídica, que genera un único corte en el gen. La reacción se llevó a cabo durante 4 horas a 65 °C. El producto de PCR y el producto de la digestión se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1 % (p/v).

5.2.2. Estrategia de clonado del gen inulinasa a partir de ADN

Se realizó un cultivo de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en las condiciones óptimas. A las 48 h de crecimiento, se recuperó el micelio por filtración.

5.2.2.1. Extracción del ADN genómico de *Aspergillus kawachii* IFO 4308

El ADN genómico de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 se extrajo según Rojas *et al.*, 2011. Se resuspendió el micelio en buffer de lisis compuesto por: Tris-HCl (0,2 M, pH 7,5), NaCl (0,5 M), EDTA (0,01 M), SDS (1 % p/v) y se agregaron 0,4 g de esferas de vidrio estériles (0,3-0,4 μ m) (Sigma, USA). La mezcla se agitó en vortex durante 30 segundos seguido de incubación en hielo por 1 minuto. Este último procedimiento se repitió 5 veces.

Posteriormente se adicionó una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) ml y nuevamente se agitó en vortex durante 1 minuto. Se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 x g y se recuperó la fase acuosa.

Finalmente, el ADN se precipitó por la adición de NaAc 0,3 M y dos volúmenes de etanol absoluto. Se incubó en hielo durante 2 minutos tras lo cual se centrifugó 2 minutos a 7500 x g a 4 °C y se desechó el sobrenadante. El ADN precipitado se lavó dos veces con etanol 70 % (v/v) a 4 °C y se secó a temperatura ambiente, resuspendiéndose posteriormente en 20 μ l agua bidestilada estéril.

Se analizó la integridad del ADN obtenido mediante un gel de agarosa 1 % p/v como se describe en el inciso 5.1.1 a fin de determinar la integridad del producto de PCR obtenido.

Para evaluar la pureza del ADN extraído se tomó una muestra y se determinó la relación A_{260}/A_{280} . Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Micro-UV vis NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA).

5.2.2.2. Amplificación del gen inulinasa sin péptido señal

Se diseñó el *primer* P₃ para eliminar el péptido señal del gen inulinasa debido a que los vectores de expresión pPIC9 y pPICZaA poseen la secuencia del péptido señal factor α de *S. cerevisiae*. La secuencia del *primer* se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Secuencia del primer P₃

Primer P ₃	5'-TGCAGTCGCTCGAGAGAGATTCAACTATGACCAGCCT-3'
-----------------------	---

En este *primer* la secuencia en letra cursiva y azul corresponde al sitio de

restricción de *XhoI* y la secuencia subrayada al sitio de reconocimiento de la proteasa *Kex 2*.

Para obtener el gen inulinasa sin péptido señal se realizó una PCR utilizando los primers P₃ y P₂.

Se estudiaron las condiciones óptimas de reacción utilizando diferentes cantidades de ADN genómico (5 ng y 20 ng) y siete temperaturas de apareamiento: 55 °C, 57 °C, 59 °C, 61 °C, 63 °C, 65 °C y 67 °C, para elegir la mejor condición de amplificación del gen de interés.

La mezcla de reacción para la PCR se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Proporciones de componentes en la mezcla de reacción de PCR

Componentes	Cantidad
Buffer Taq 5X	10 µl
dNTPs 10 mM	0,4 µl
Primer P ₃ 56 µM	0,5 µl
Primer P ₂ 49 µM	0,5 µl
Taq polimerasa 5 U/µl	0,5 µl
ADN molde	5 y 20 ng
Agua bidestilada	c.s.p. 50µl

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1% (p/v) y purificado mediante el sistema de *DNA Purification Kit illustra™ MicroSpin Columns* (GE Healthcare, USA).

5.2.2.3. Clonado del gen inulinasa con intrón en pPIC9

En la primera estrategia se utilizó el vector de expresión pPIC9 (Invitrogen Co. Ltd., USA.) que permite el clonado del gen que se desea expresar, en fase con el péptido señal del factor α de *S. cerevisiae*, lo que genera la secreción de la proteína heteróloga al exterior celular y facilita la purificación de la misma.

Los genes clonados se expresan bajo el control del promotor pAOX1 lo que permite la inducción para el comienzo de la síntesis de la proteína. Por otra parte, el plásmido no se replica autónomamente y sólo puede transformar a las células de la levadura *Pichia pastoris* mediante integración en el genoma de la misma.

Se realizó un cultivo de 100 ml de *E. coli* que contenía el vector de expresión pPIC9, a 37 °C durante 16 horas, en medio de cultivo LB + 100 µg/ml de ampicilina. Luego se extrajo el ADN plasmídico siguiendo el protocolo *Pure Yield™ Plasmid Midiprep System* (Promega, USA) y se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm.

El clonado del gen inulinasa en el vector de expresión se realizó de la siguiente manera: el gen inulinasa obtenido por PCR y el plásmido pPIC9 fueron digeridos con las enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII* por 4 h a 37 °C. Posteriormente se visualizó esta digestión mediante un gel de agarosa al 1% (p/v).

Para evitar la recircularización del plásmido, el ADN plasmídico pPIC9 digerido se incubó durante una hora a 37 °C con fosfatasa alcalina, (Sigma, USA). La reacción se detuvo mediante una incubación a 65 °C durante 10 minutos. A continuación, el vector se precipitó con 10 % de acetato de sodio 3 M, pH 5,2 y dos volúmenes de etanol absoluto, se incubó a -20 °C durante 30 minutos, luego se centrifugó a 20000 x g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar por 10 minutos. Por último, se resuspendió en un volumen adecuado de agua bidestilada. Posteriormente se purificó siguiendo el protocolo para *DNA Purification Kit illustra™ MicroSpin Columns* (GE Healthcare, USA).

Se ligó el gen de inulinasa al vector pPIC9 purificado mediante la ligasa del bacteriófago T4 (Promega, USA) durante 16 h a 37 °C, generando el plásmido recombinante pPIC9: inuAK. Se probaron tres relaciones molares vector: inserto (1:0; 1:1 y 1:5) como se indica en la tabla 9.

Tabla 9. Relaciones molares vector: inserto para la reacción de ligación

Relación molar			
Vector: inserto	1:0	1:1	1:5
Masa (ng)			
vector: inserto	100: 0	100: 20	100: 100

5.2.2.3.1. Transformación y selección de clones positivos *E. coli* DH5a

Una vez obtenido el plásmido recombinante pPIC9: inuAK se procedió a transformar células de *E. coli* DH5a mediante shock térmico siguiendo el protocolo descrito en el inciso 5.1.2.

Se agregaron 800 µl de medio LB y se incubó a 37 °C por 45 minutos. La mezcla se centrifugó a 10.000 x g por 10 minutos, el *pellet* se sembró en placas de Petri conteniendo medio agar LB con ampicilina (100 µl/ml).

Las placas se incubaron 16 h a 37 °C, posteriormente los clones obtenidos se repicaron en medio líquido LB con ampicilina (100 µl/ml), se incubaron durante 16 h en agitación a 37 °C y 200 rpm. Los clones se conservaron en medio LB con 15 % de glicerol a -70 °C para su posterior análisis.

5.2.2.3.2. Confirmación del marco abierto de lectura

Para corroborar el marco de lectura y analizar posibles se secuenció el ADN plasmídico de 5 clones resistentes a ampicilina. Se aislaron los plásmidos siguiendo el protocolo de la técnica de *Pure Yield™ Plasmid Miniprep System*, 2015 (Promega, USA) y se secuenciaron utilizando *primers* comerciales a partir del 3'AOX y 5'AOX (*Automatic Sequencer 3730xl*- MacroGen-Corp., Corea).

5.2.2.3.3. Transformación de células de *Pichia pastoris* GS115

Para aumentar la eficiencia de transformación en *Pichia pastoris*, el plásmido se linealizó mediante la digestión con la enzima *Bgl*II durante 4 h a 37 °C.

Se utilizaron células competentes de *Pichia pastoris* GS115 genotipo *his4* fenotipo His⁻ Mut⁺ preparadas según el protocolo descrito en el inciso 5.1.5. Esta cepa posee una mutación en el gen *his4* que codifica la enzima histidinol deshidrogenasa que hace a la célula incapaz de producir el aminoácido histidina. Los plásmidos de expresión llevan el gen *his4*, esto permite la selección de los transformantes por su habilidad de crecer en medios deficientes en histidina.

La electroporación se realizó en cubetas de 0,2 ml que contenían 80 µl y 10 µg de ADN y se incubaron 30 minutos en baño de agua/hielo en las condiciones descritas por el fabricante: 25 µF, 200 Ω, 2,5 KV (Micro Pulser

BioRad Life Sciences, USA).

Luego de la aplicación de los pulsos eléctricos se adicionó a la suspensión 1 ml de sorbitol 1M y posteriormente se sembró en placas con el medio mínimo dextrosa (MD), sin histidina, que se incubaron a 28 °C durante 48 h.

5.2.2.3.4. Cultivo de *Pichia pastoris* en matraces Erlenmeyer

Con cada una de cinco colonias transformadas crecidas en medio sólido MD se realizaron pre-inóculos mediante el cultivo de los clones (1% en YPD), en agitador orbital a 28 °C y 200 rpm por 18 h (Model 481, Forma Scientific, USA).

Se cultivaron a 28 °C y 200 rpm en 100 ml de medio BMGY hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}} = 16$. Luego de la etapa de crecimiento, se realizó la inducción utilizando metanol. El cultivo se centrifugó a 5000 x g durante 10 minutos (Gelec, Argentina). Los *pellets* obtenidos se resuspendieron en BMMY, de modo tal de obtener una $DO_{600\text{ nm}} = 60$ para cada clon. Se trasvasaron a matraces Erlenmeyer de 1 litro conteniendo 100 ml de medio BMMY, 28 °C y 200 rpm en agitador orbital.

Para inducir la producción de proteína recombinante, se añadió metanol a una concentración final de 0,05 % (v/v). Se extrajeron muestras de 5 ml a intervalos definidos (0, 24 y 48 h), que se centrifugaron a velocidad máxima durante 10 minutos a 4 °C y los sobrenadantes fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis.

5.2.2.3.5. Análisis del cultivo de *Pichia pastoris*

Se estudió la expresión de la inulinasa recombinante en *Pichia pastoris* a las 24 y 48 horas del cultivo midiendo actividad enzimática en el sobrenadante mediante el método descrito en el inciso 4.4, además se determinó la cantidad de proteínas, siguiendo el método de Bradford (1976). La expresión de la inulinasa se analizó mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes según Laemmli (1970) en un equipo *Mini- PROTEAN® Tetra Cell* (Biorad, USA). Los geles se prepararon al 12 % (p/v) de acrilamida y las muestras premezcladas con el buffer de siembra conteniendo β -mercaptoetanol se calentaron a 100 °C, antes de proceder a la siembra. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con Coomassie G-250 coloidal (Neuhoff *et al.*, 1988). Se utilizaron dos marcadores de peso molecular, (20-120 kDa; Thermo Scientific, Rockford IL,

EUA) y (14,1-97,0 kDa, Amersham Pharmacia Biotech).

Las bandas obtenidas en el gel se identificaron por mapeo peptídico en el Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay, a partir de una digestión trípica in situ de las bandas y siguiendo la siguiente metodología: los péptidos se extrajeron de los geles utilizando el 60 % de acetonitrilo en trifluoroacético (TFA) al 0,2 %, se concentró por secado al vacío y se realizó el desalado utilizando micro-columnas de C18 en fase reversa (Omix Pipette, Varian). La elución de péptidos de la micro-columna se efectuó directamente en la placa del espectrómetro de masa con 3 µl de solución de (α-ciano-4-hidroxicinámico en 60 % de acetonitrilo acuoso que contiene 0,2 % TFA). Los espectros de masas de las mezclas de digestión se analizaron en un espectrómetro MALDI-ToF/ToF 4800 (Applied Biosystems, USA) y se calibraron externamente utilizando una mezcla de péptidos estándar (Applied Biosystems, USA). Las proteínas se identificaron en la base de datos NCBIInr con los valores de m/z de los péptidos utilizando el programa MASCOT (Matrix Science). Para que los resultados sean considerados estadísticamente significativos se permitió 0,05 Da de diferencia entre el valor teórico y el valor medido de masa molecular de los péptidos monoisotrópicos.

5.2.2.3.6. Análisis bioinformático del corte y empalme

Para comprobar si *Pichia pastoris* era capaz de realizar el corte y empalme del gen, es decir eliminar el intrón y expresar una proteína madura activa, se realizó el análisis informático utilizando el programa *Splice View*, (NN-SPLICE, Splice Proximal Check y NETGENE). Con este programa se analizaron los posibles sitios donadores y aceptores en *Aspergillus sp.* y levaduras.

5.2.2.4. Estrategia de clonado del gen inulinasa sin intrón en pPICZαA

Para diseñar esta estrategia de clonado se utilizó la información existente en la literatura sobre los genes de inulinasa que poseen intrones. Se comparó la secuencia de la inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 con la información genómica de *Aspergillus awamori* var 2250 y *A. niger* cepa 12 utilizando el programa *Cluster W2* (European Bioinformatic Institute, UK)

5.2.2.4.1. Diseño de primer para eliminar el intrón del gen inulinasa

En base a esta información se diseñó el *primer* para eliminar el intrón, la

secuencia se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Secuencia del primer P4 para eliminar el intrón

Primer P ₄	5'-CGGCAATGTTTGCGCAACGGGGTAATAGGAAGTATACATGGCG-3'
-----------------------	---

Los primeros 19 nucleótidos se superponen a la región 3' del exón I y los siguientes 16 nucleótidos se superponen al extremo 5' del exón II, incluido el sitio de reconocimiento de *Bsr*DI que se indica en cursiva y rojo.

5.2.2.4.2. Clonado del gen inulinasa sin intrón en el plásmido pPICZaA

Se realizó el clonado del gen inulinasa sin intrón en el plásmido pPICZaA. Se utilizó este plásmido ya que permite el clonado de múltiples copias del gen de interés, lo que puede resultar en un aumento de los niveles de expresión.

Para obtener el gen sin intrón se obtuvieron los dos exones por separado mediante cortes con enzimas de restricción.

Para obtener el exón I, se realizó una reacción de PCR por medio del vector plasmídico pPIC9: inuAK como molde y los *primers* P₃ y P₄. En la tabla 11 se muestran las proporciones de componentes en la mezcla de reacción de PCR.

Tabla 11. Proporciones de componentes en la mezcla de reacción de PCR

Componentes	Cantidad
Buffer Taq 5X	10 µl
dNTPs 10 mM	0,4 µl
Primer P ₃ 56 µM	0,5 µl
Primer P ₄ 59 µM	0,5 µl
Taq polimerasa 5 U/µl	0,5 µl
ADN molde	5 y 20 ng
Agua bidestilada	c.s.p. 50µl

Esta reacción se realizó con 30 ciclos a 94 °C durante 60 segundos, 56 °C durante 60 segundos, y 72 °C durante 60 segundos. El producto de PCR (383 pb) se purificó en gel a través del uso de un kit de purificación de ADN Illustra™ Micro Spin Columns. Posteriormente se ligó el plásmido pGEM®-T Easy Vector

(Promega, Corporation, USA) durante 1 h a 37 °C utilizando la mezcla de reacción indicada por el fabricante.

El Vector pGEM®-T Easy es un plásmido de 3015 pb adecuado para clonar productos de PCR. Este vector, en su forma lineal, posee un nucleótido de timina en sus extremos 3', los cuales actúan como extremos cohesivos con los fragmentos de ADN amplificados por PCR, cuando son generados con un nucleótido de adenina en los extremos 3' y también impiden la recircularización aumentando la eficiencia del proceso de ligación.

Para seleccionar los clones positivos, el sitio de clonado múltiple del vector interrumpe la secuencia codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa que hidroliza el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-gal), generando un producto de color azul. Así, proporcionando este sustrato al medio de cultivo LB, las colonias que adquieren este color se identifican como negativas, y las blancas como positivas. El vector posee otras secuencias que pueden observarse en el esquema presentado en la figura 13, realizado con el programa *Snapgene* (GSL Biotech LLC, USA).

Se probaron tres relaciones molares vector: inserto (1:0; 1:1 y 1:3) en las proporciones que se indican en la tabla 12.

Tabla 12. Relaciones molares vector: inserto ensayadas para la reacción de ligación

Relación molar			
Vector: inserto	1:0	1:1	1:3
Masa (ng) vector: inserto	100: 0	100: 12	100: 36

Luego se realizó la electroporación para transformar células de *E. coli* TOP10F' (Invitrogen Co. Ltd., USA). Los vectores recombinantes aislados de los transformantes positivos se digirieron con *XhoI* (37 °C durante 4 h) y *BsrDI* (65 °C durante 4 h).

En un microtubo, se mezclaron 40 μ l de células de *E. coli* electrocompetentes con 1-2 μ l de cada una de las concentraciones vector: inserto utilizadas y se dejaron en hielo durante 1 minuto. A continuación, se

aplicó un pulso eléctrico de 25 μ F, 200 Ω , 2,2 kV utilizando un electroporador (Biorad, USA). Inmediatamente, se resuspendió suavemente la mezcla de electroporación con 1 ml de medio SOC y se incubó una hora a 37 °C y 100 rpm. Finalmente, 200 μ l de cada una de las mezclas de electroporación fueron plaqueadas en agar LB más ampicilina (100 μ l/ml) con el agregado de 2 μ l de IPTG 1M y 30 μ l de X-gal 0,2 % (p/v), e incubadas a 37 °C por 16 h. Se seleccionaron las colonias de color blanco que son las que contenían la construcción pGEM®-T Easy- exón I.

Para obtener el segundo exón, pPic9: inuAK se digirió con *BsrDI* (65 °C, 4 h) y *NotI* (37 °C, 4 h), liberando el exón II, un fragmento de ADN de 1200 pb que luego se purificó por electroforesis en gel de agarosa.

El plásmido pPicZaA se digirió con las enzimas *XhoI* (37 °C, 4 h) y *NotI* (37 °C, 4 h). Se realizó una ligación triple entre los dos exones y el vector pPicZaA mediante la ligasa T4 (37 °C, 16 h) para generar la construcción pPicZaA: inuAK Δ PS Δ I. Posteriormente se transformaron por electroporación células competentes de *E. coli* TOP10F'.

Finalmente, cinco clones se analizaron para confirmar el marco abierto de lectura utilizando *primers* diseñados a partir del 3'AOX y 5'AOX que se secuenciaron en Macrogen-Corp, Corea. Luego de verificar la secuencia, el vector de expresión se linealizó con *BglII* (37 °C, 4 h).

5.2.2.4.3. Transformación en *Pichia pastoris* GS115 y X-33

Se utilizaron dos cepas de *Pichia pastoris*: GS115 que posee una mutación en el gen *his4*, ya descrita y X-33 que no presenta ninguna mutación.

Los vectores linealizados pPicZaA: inuAK Δ PS Δ I y pPIC9 (para aportar el gen *his4*) se utilizaron para transformar células competentes de *Pichia pastoris* GS115 mientras que el vector linealizado pPicZaA: inuAK Δ PS Δ I se transformó en células competentes de *Pichia pastoris* X-33 genotipo *wild type*, fenotipo Mut⁺ (Invitrogen Co. Ltd., USA.) mediante electroporación utilizando el mismo procedimiento descrito en el inciso 5.2.2.3.3 Se utilizó como control la transformación de *Pichia pastoris* GS115 y X-33 con el vector vacío pPICZaA. Se seleccionaron los clones de levaduras transformadas que presentaron resistencia al antibiótico mediante cultivo en placas de YPD con el agregado de 0,1 mg/ml de zeocina (Zeocin™).

Se confirmó la presencia del gen de exoinulina por PCR directa de colonias (*colony*-PCR) utilizando los *primers* P₃ y P₂. Para ello se picaron cada una de las colonias seleccionadas y se resuspendieron en 50 µl de NaOH 20 mM. Luego se incubaron 10 minutos a 95°C. Se tomaron 5 µl para realizar una PCR según lo descrito en el inciso 5.2.2.2.

Los clones de *Pichia pastoris* seleccionados a partir de la *colony*-PCR se cultivaron en matraces *Erlenmeyer* de 500 ml conteniendo 50 ml de YPD. Luego de un día de incubación a 28 °C y 200 rpm en agitador orbital (Model 481, Forma Scientific, USA) los cultivos se centrifugaron a 5000 x g durante 10 minutos (Gelec, Argentina). La biomasa obtenida correspondiente a cada clon se resuspendió en 10 ml de medio YPD más glicerol 15 % (v/v) y conservó en *freezer* a -80 °C.

5.2.2.4.5. Verificación de la expresión de la inulina y selección del clon

Para seleccionar el clon que produjo mayor actividad inulina, se analizaron 13 clones de *Pichia pastoris* de X-33 y 13 clones de GS115. A partir de los pre-inóculos, se llevó adelante el procedimiento de cultivo descrito en inciso 5.2.2.3.4

Se realizaron cultivos en matraces *Erlenmeyer* y se tomaron muestras a los tiempos 0, 24 y 48 h. Se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 x g a 4 °C y se determinó actividad inulina en los sobrenadantes de acuerdo a lo descrito en el inciso 4.4. cambiando el tiempo de incubación de la enzima con el sustrato a 10 minutos.

5.3. Cultivo de alta densidad celular

Se utilizó un biorreactor tipo tanque agitado de 5 l de capacidad (Bioflo 3, New Brunswick-Scientific, USA). Se realizaron cultivos con 3 l de medio BSM 0,5X, suplementados con 5 ml/l de PTM y 10 ml/l de biotina (0,2 g/l) y 0,5 ml de antiespumante (AF 204 Sigma-Aldrich, USA). El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos, a excepción de las sales traza y la biotina que se esterilizaron previamente por filtración.

El proceso se inició mediante la adición al biorreactor de 100 ml de inóculo crecido en medio YPD, a 28 °C y 200 rpm, por 18 h. Los parámetros iniciales en

el biorreactor fueron los siguientes: velocidad de agitación 300 rpm, aireación de 1 l/min, temperatura, 28 °C y pH de 5,0. Se utilizó NH₄OH al 28 % como FN y para mantener el pH constante. El oxígeno disuelto se mantuvo por encima de 30 % de saturación mediante el ajuste automático de la velocidad de agitación.

El proceso se realizó en tres etapas bien diferenciadas: una de crecimiento en batch con glicerol como FCE, seguido de una etapa de alimentación con una mezcla de glicerol-metanol (baja concentración de inductor) y por último la etapa de inducción con metanol (alta concentración).

El primer paso de este procedimiento fue un cultivo con 3 % (v/v) de glicerol. Se tomaron muestras a tiempos irregulares hasta el consumo total de esta FCE. Luego se comenzó la segunda etapa con alimentación mixta de glicerol-metanol (glicerol 43,5 v/v %, suplementado con 10 ml/l de biotina, 10 ml/l de PTM y 50 ml/l de metanol) a un caudal de alimentación de 40 ml/h.

Una vez finalizada la alimentación se inició la etapa de inducción mediante la adición de metanol puro suplementado con 10 ml/l de PTM y 10 ml/l de biotina a un caudal inicial de 4,8 ml/l durante 24 horas.

El oxígeno disuelto en el medio de cultivo se determinó mediante un electrodo de O₂ de tipo polarográfico (Mettler Toledo, Suiza). Las medidas del contenido en O₂ y en CO₂ de los gases de salida se realizaron mediante un detector de tipo paramagnético y de un detector infrarrojo (Serie 1101, Servomex, USA. y Serie 1440, Servomex, USA.), respectivamente.

Se tomaron volúmenes de 25 ml de muestra del biorreactor para las determinaciones de biomasa, proteínas totales, actividad enzimática y glicerol.

La determinación de la biomasa se realizó midiendo el peso seco después de centrifugar 10 ml de cultivo a 5000 x g por 10 minutos y secar en estufa a 105 °C hasta peso constante y, por otro lado, midiendo la absorbancia del medio por turbidimetría (DO_{600 nm}).

Las proteínas totales se midieron utilizando el método Bradford (1976) y la actividad enzimática, diluida correctamente, siguiendo la técnica descrita en el inciso 4.4. cambiando el tiempo de incubación de la enzima con el sustrato a 10 minutos.

La determinación de glicerol se determinó utilizando kit colorimétrico TG color (Wiener lab., Argentina). Se procedió, según indicaciones del proveedor, de la siguiente manera: 1 ml de reactivo se colocó en un tubo de ensayo, luego se le adicionaron 10 μ l de la muestra (previamente diluida), se incubó a 37 °C durante 5 minutos y finalmente se midió absorbancia a una longitud de onda de 505 nm en lector de placa de ELISA (Cytation™ 5, BioTek®, USA).

La separación de las células de la levadura se realizó por centrifugación a 5000 x g durante 10 minutos y a 4 °C.

5.4. Purificación de la inulinasa recombinante

El proceso de purificación se realizó mediante el uso de un Cromatógrafo líquido de proteínas (FPLC), modelo *Äkta Basic* de GE (General Electric Company, USA).

Para purificar la enzima se tomaron 100 ml del sobrenadante del cultivo de *Pichia pastoris* y se diluyeron cinco veces mediante el agregado de agua desionizada, posteriormente se ajustó el pH a 3,0 con HCl 1N. De esta forma se lograron las condiciones de conductividad y carga necesarias para que la inulinasa pueda ser capturada en una columna de intercambio de cationes.

Se utilizó como primer paso de purificación de la inulinasa una resina de intercambio catiónico fuerte SP *Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare, USA) con un tamaño de partícula de $d_{50V} \sim 90 \mu\text{m}$, utilizando una columna XK16/60 (GE Healthcare, USA) con 20 ml de volumen de columna (VC).

El caudal de trabajo fue de 2 ml/min durante todo el proceso. La resina se equilibró con 2 VC de buffer A (citrato de sodio 20 mM, pH 3,0). Luego de la carga de 500 ml de la muestra en la columna, se realizó un lavado con 3 VC de buffer A. El producto retenido por la resina se eluyó mediante un gradiente de 20 VC de buffer B (citrato de sodio 20 mM con 0,5 M de NaCl, pH 3,0). Durante el proceso se tomaron muestras y se midió actividad inulinasa como se indicó en el inciso 4.4.

Se seleccionaron las fracciones que presentaron actividad inulinasa y se procedió a un segundo paso de purificación, donde se realizó un cambio de buffer utilizando una resina *Sephacryl G25* (GE Healthcare, USA), y una columna XK 50/30 (GE Healthcare, USA) con un VC de 500 ml en buffer de acetato de sodio

20 mM pH 5,0 y un caudal de 20 ml/min. El siguiente paso consistió en una cromatografía de intercambio aniónico utilizando una resina *Q Sepharose HP* (GE Healthcare, USA) con un menor tamaño de partícula, $d_{50v} \sim 34 \mu\text{m}$, para mejorar la eficiencia de separación. Se utilizó una columna XK 16/20 (GE Healthcare, USA) con un VC de 10 ml y un caudal de 1 ml/min. Se eluyó con buffer de acetato de sodio 20 mM pH 5,0 mediante el uso de un gradiente continuo de NaCl (0-0,5 M) en 20 volúmenes de columna. El volumen de muestra cargado en la columna fue de 330 ml.

Finalmente, las fracciones que contenían actividad inulinasa se agruparon y luego se dializaron a 4 °C durante 16 h en buffer acetato de sodio 20 mM pH 5,0. La pureza de la inulinasa así obtenida se analizó mediante SDS-PAGE y se acopló un zimograma para determinar si la enzima purificada retuvo la actividad. Este procedimiento se realizó de acuerdo a lo descrito por Heyer & Wendenburg (2001).

El *SDS-PAGE* de la preparación final se realizó en condiciones desnaturalizantes en un gel de poliacrilamida al 12 % (p/v) como se indicó en el inciso 5.2.23.5. Después de la electroforesis, el gel se lavó dos veces con una solución de Tritón X-100 al 1 % (v/v) en BCP, pH 5. El gel lavado se incubó durante 10 minutos a 37 °C en una solución de sacarosa (BCP 1 % p/v, pH 5). Finalmente, el gel se enjuagó con agua destilada y se sumergió en una solución de 2, 3, 5 cloruro de trifeniltetrazolio al 1 % (p/v) en NaOH 0,25 M. Después de una exposición de 10 minutos, se añadió ácido acético al 5 % (v/v) para detener la reacción. La actividad sacarolítica se visualizó como una banda roja resultante de la reducción del cloruro de trifeniltetrazolio.

La enzima purificada se almacenó a -20 °C y se usó para otros estudios de caracterización bioquímica.

5.5. Caracterización de la inulinasa recombinante

Para caracterizar la proteína recombinante y compararla con la inulinasa silvestre se evaluaron la estabilidad frente a la temperatura, frente a cambios de pH, la influencia de cationes y el pH óptimo siguiendo las metodologías descritas en el inciso 4.5.

5.5.1. Determinación del punto isoeléctrico

Para determinación del punto isoeléctrico (pI) se realizó isoelectroenfoque (IEF), en una unidad de electroforesis Multiphor II IEF (Pharmalyte, General Electric, USA) a 8 °C, y se prepararon geles de 5 % (p/v) de acrilamida con 2 % de anfolitos en el rango de 3-10 (Pharmalyte, General Electric, USA). Como buffer catódico y anódico se utilizaron soluciones de H₂SO₄ 0,1 M e NaOH 0,1 M, respectivamente. Las muestras se focalizaron junto con marcadores de pI (Broad Range pI Kit, General Electric, USA). Las bandas proteicas se tiñeron con Coomassie R-250 durante 2 h en agitación para su visualización posterior.

5.5.2. Determinación de parámetros cinéticos K_M y $V_{m\acute{a}x}$

Las constantes cinéticas K_M y $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima purificada se calcularon ajustando los valores de actividad inulinasa determinados en un rango de 0,5 a 5 mM de inulina ajustando los valores a una regresión lineal luego de aplicar la ecuación de Lineweaver-Burk (1934).

5.6. Ensayos para aplicaciones de la inulinasa recombinante

Para estudiar posibles aplicaciones de la inulinasa recombinante se realizaron los siguientes ensayos:

5.6.1. Evaluación de la actividad fructosiltransferasa

Para determinar la actividad fructosiltransferasa de la inulinasa recombinante se incubó una solución de sacarosa 70 % (p/v) en buffer acetato 100 mM, pH 6,0) con 100 μ l de extracto enzimático de manera de obtener una concentración de enzima de 10 unidades por gramo de sustrato en un volumen final de 1 ml. Esta mezcla se incubó a 45 °C con agitación (200 rpm) y a los 60 y 180 minutos se tomaron muestras y se las diluyó para tener una concentración menor a 1 % (p/v) de sacarosa. Luego, a cada muestra se le determinó la concentración de fructosa, glucosa y sacarosa por HPLC, utilizando una columna Animex HPX 87C (Biorad, USA) a 65 °C, aplicando una elución (Agua-acetonitrilo, 95 %/5 %) a un flujo de 0,2 ml/min durante 20 minutos. Las muestras se analizaron en un HPLC con detector electroquímico (Waters Alliance™, USA).

5.6.2. Hidrólisis de fructanos de agave

Para determinar la actividad inulinasa de la enzima recombinante sobre fructanos de agave se incubaron tres soluciones de jugo de agave crudo (20, 40 y 70 % (p/v) en buffer BCP, pH 5,0). Se añadió 1ml de extracto enzimático de manera de tener una concentración de enzima de 125 U en cada solución de jugo de agave en un volumen final de 10 ml y se las incubó a 50 °C. Se tomaron muestras de 0,5 ml a las 0, 1, 3, 4 y 24 horas por triplicado.

Por otra parte, también se estudió la hidrólisis de fructanos en dos jugos de agave crudo obtenido de dos industrias procesadoras mexicanas, de 16 °Brix y se comparó la actividad de la inulinasa recombinante con la producida por células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-5088, de acuerdo con el método protegido en la solicitud de patente MX/E/2016/014930 utilizando una temperatura de 50 °C. Se utilizaron 125 y 250 U de actividad inulinasa para comparar el poder hidrolítico de ambos catalizadores. A las 0, 6 y 24 h se tomaron muestras por triplicado.

En cada reacción se determinó el porcentaje de azúcares reductores con el método de reducción del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) (Arrizon *et al.*, 2012). Para realizar este procedimiento se tomaron tubos conteniendo 50 µl de sustrato y se incubaron durante 15 minutos a 50 °C. Luego se les adicionó 100 µl del reactivo de DNS y se los incubó 5 minutos en un baño de agua a 100 °C. Transcurrido el tiempo, se enfriaron las mezclas en agua-hielo durante 5 minutos. Finalmente, se agregó 1ml de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm. En el caso del blanco, los 50 µl de muestra fueron adicionados luego de los 100 µl del reactivo de DNS. Se realizó una curva de calibración utilizando como patrón glucosa 2 g/l. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de azúcares reductores por minuto bajo las condiciones de ensayo.

5.6.3. Inmovilización de la inulinasa recombinante

Se utilizó un stock de inulinasa recombinante purificada con una actividad de 588 U/ml y 2575 U/mg.

5.6.3.1. Preparación y activación de esferas de quitosán

Se preparó una solución de quitosán, con 85 % de grado de desacetilación (Sigma, USA) al 2 % (p/v) en ácido láctico 0,25 M. Esta solución se agitó

continuamente por un período de 1 h hasta disolución completa del quitosán y luego se sonicó durante 30 minutos para la eliminación del aire disuelto. Posteriormente se agregó por goteo a través de una jeringa de 5 ml con aguja de 0,7 mm de diámetro, a velocidad constante, en una solución de NaOH 2 M. Las esferas resultantes se dejaron en la solución por 1 h y luego se lavaron con agua destilada para alcanzar un pH neutro. Se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su activación.

Las esferas de quitosán se incubaron a 4 °C y 150 rpm con 50 ml de solución de glutaraldehído a diferentes concentraciones desde 1 a 5 % (p/v) y a diferentes intervalos de tiempo, entre 2 a 10 h. Luego de la activación las esferas se lavaron con agua destilada para eliminar el agente entrecruzante remanente y se conservaron a 4 °C hasta su uso. Se evaluó la influencia de la concentración de glutaraldehído y el tiempo de activación en la inmovilización de la enzima mediante un diseño factorial completo 2^2 + estrella, rotable, con 2 factores experimentales, 1 bloque, 1 respuesta, 13 ensayos experimentales que incluyeron 5 puntos centrales por bloque y 7 grados de libertad para el error, de acuerdo como se indica en la tabla 13.

Tabla 13. Datos cuantitativos de los factores y la respuesta utilizados

Factores	Bajo	Alto	Unidades	Continuo
Concentración de glutaraldehído	1	5	% p/v	Si
Tiempo activación	2	10	h	Sí

El análisis estadístico se realizó con el software *Statgraphics Centurion* XVIII (Stat Point Inc., USA) y *Minitab*® 17.1.0 (LEAD Technologies, Inc., USA).

5.6.3.2. Inmovilización de la enzima inulinasa

La inmovilización de la inulinasa en esferas de quitosán activadas se realizó incubando 50 esferas ($0,75 \pm 0,1$ g) con 2 ml de enzima (55 U/ml) en buffer BPC pH: 5,0 a 4 °C durante 16 h y 150 rpm. Luego las esferas con la enzima inmovilizada se separaron del sobrenadante, el cual se guardó, y se lavaron 3 veces con Buffer BCP pH 5,0 para remover la enzima que no fue

inmovilizada. Como control se incubó la misma concentración de enzima en ausencia de esferas para determinar la desnaturalización de la enzima durante la incubación. La inmovilización de la enzima (IE) se calculó como porcentaje de inulina inmovilizada en la matriz con respecto a la actividad enzimática inicial total, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$IE: (U_0 - U_s) / U_0 \times 100$$

donde U_0 son unidades enzimáticas al inicio de la reacción y U_s son unidades enzimáticas remanentes en el sobrenadante luego del proceso de inmovilización.

Y el rendimiento de actividad inulina, se determinó a partir de la ecuación:

$$\% \text{ Actividad: } U_i / (U_0 - U_s) \times 100$$

donde U_i son unidades enzimáticas en las esferas de quitosán.

5.6.3.3. Efecto del tiempo de inmovilización

Para estudiar el tiempo óptimo de inmovilización de la enzima, se incubó 2 ml de la enzima diluida de tal manera que la concentración final fue de 5,5 U/ml en buffer BCP pH 5,0 con 5 esferas de quitosán activadas (0,075 g) entre un periodo de tiempo de 2 a 16 h. Se determinó el porcentaje de inulina inmovilizada en la matriz y el rendimiento de actividad inulina.

5.6.3.4. Efecto de la carga de la enzima

Se estudió el efecto de la concentración de enzima en la inmovilización, para esto se incubaron 5 esferas de quitosán activadas (0,075 g) y diferentes concentraciones de enzima desde 55 U a 250 U de inulina. Se determinó el porcentaje de inulina inmovilizada en la matriz y el rendimiento de actividad inulina.

5.6.3.5. Efecto del pH óptimo y termoestabilidad de la enzima inmovilizada

La actividad enzimática del sobrenadante, así como de la enzima inmovilizada se midió en las condiciones de ensayo estándar como se describió en el inciso 4.4.

La estabilidad térmica se midió en términos de actividad residual después de la incubación de una determinada cantidad de enzima inmovilizada (0,075 g)

en buffer BCP (pH 5,0) a diferentes temperaturas (37 °C, 45 °C, 55 °C y 65 °C) durante 180 minutos.

El efecto del pH óptimo sobre la actividad enzimática de la enzima inmovilizada se determinó a 37 °C en una mezcla de buffers (Tris-HCl, MES y glicina, 20 mM cada uno), ajustados a diferentes valores de pH de 3 a 13, variando de una unidad.

Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se separó la enzima inmovilizada del buffer de incubación y se determinó la actividad inulinasa residual en las condiciones de ensayo estándar.

5.6.3.6. Reutilización de la enzima inmovilizada

Se estudió la reutilización de la enzima inmovilizada en esferas de quitosán. Se incubaron 0,75 g de esferas con 1 % (p/v) de inulina a pH 5,0 y 37°C durante 30 minutos. Luego las esferas se lavaron 3 veces con agua destilada y se reutilizaron con solución de sustrato inicial. Este procedimiento se repitió 12 veces y se determinó la actividad residual considerando como la actividad inicial como 100 %.

5.6.3.7. Hidrólisis de la inulina con la inulinasa recombinante inmovilizada

Se realizó hidrólisis de inulina (20 % p/v y 50 ml) en un proceso que se llevó a cabo a 50 °C durante 24 h con 150 U de la enzima libre e igual cantidad de la enzima inmovilizada.

Este proceso se comparó con la hidrólisis ácida de inulina (20 % p/v y 50 ml) producida por el agregado de HCl 1N a 100 °C durante una hora. La concentración de azúcares reductores en el medio de reacción se midió utilizando la metodología descrita en inciso 4.3.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para presentar los resultados y discusiones correspondientes obtenidos en este trabajo de tesis doctoral en el contexto del conocimiento generado se plantean tres capítulos:

Capítulo 1: Estudio de la producción de inulinasas silvestres de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en fermentaciones líquidas y evaluación de sus características bioquímicas.

Contiene los resultados concernientes a la producción enzimática, incluyendo la evaluación de sustratos; de las condiciones óptimas de producción de la enzima y de la caracterización de la actividad de la enzima silvestre, producida por *Aspergillus kawachii* IFO 4308.

Capítulo 2: Clonado del gen inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en *Pichia pastoris*

Se presentan los resultados de los procesos de clonado obtenidos mediante las dos estrategias planteadas para su concreción.

Capítulo 3: Estudio de la productividad de la inulinasa recombinante, inmovilización y posibles aplicaciones.

Se describen y discuten los resultados de los efectos del sistema de cultivo sobre la expresión heteróloga de la inulinasa recombinante, tanto en cultivos *batch* como en cultivos de alta densidad, la purificación de la enzima y su caracterización posterior y las aplicaciones de la inulinasa recombinante para la producción de bioinsumos. Además, se refieren los resultados de la caracterización bioquímica de la enzima recombinante, de su inmovilización en una matriz de quitosán y ensayos de aplicaciones como producción de fructosa a partir de hidrólisis de inulina y fructanos de agave así como la producción de FOS a partir de sacarosa.

CAPÍTULO 1: OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE INULINASA SILVESTRE

El empleo de fuentes naturales de inulina suscitó el interés por estudiar los tubérculos de yacón como sustrato para el crecimiento de microorganismos que utilizan este polisacárido para producir la enzima inulinasa.

En este trabajo de tesis doctoral se comenzó con la caracterización fisicoquímica del yacón en la forma de extracto y bagazo obtenidos a partir del prensado de tubérculos limpios.

Posteriormente se optimizó el medio de cultivo. El diseño de un medio adecuado es de suma importancia debido a que la composición influye en la concentración final del producto, el rendimiento y la productividad volumétrica. Por lo tanto, detectar y optimizar cuáles son los componentes que afectan esta producción fue la principal tarea para poder desarrollar el primer objetivo de esta tesis. Se siguió la estrategia de optimización clásica de una variable a la vez, donde cada parámetro se optimizó variando su concentración mientras que los demás factores se mantuvieron en un nivel constante. De esta manera se estudió el efecto de diferentes fuentes de carbono y energía individualmente o en combinación con yacón, fuentes de nitrógeno y se evaluaron los parámetros del proceso: concentración de inóculo, temperatura y pH inicial.

Finalmente, se escaló el cultivo de matraces *Erlenmeyer* a un fermentador de 5 litros y se caracterizó bioquímicamente el extracto enzimático obtenido.

1. Caracterización del extracto y bagazo de yacón

La caracterización preliminar del extracto y del bagazo de yacón permitió determinar los contenidos de azúcares totales y reductores de azúcares como se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Valor de pH y composición de azúcares totales y reductores en extracto y bagazo de yacón

Muestra	pH	Azúcares reductores %(g/g ms)	Azúcares totales %(g/g ms)
Extracto de yacón	6,3±0,05	59,5 ±2,25	68,0±1,46
Bagazo de yacón	6,1±0,02	8,7±0,40	12,4±0,43

En referencia al valor de pH obtenido, otros autores reportan resultados similares, Ferner Scher *et al.* (2009) informan un valor de pH de 6,09 en tubérculos cultivados en San Pablo, Brasil y Ledur Alles *et al.* (2015) que informan un valor de 6,03±0,07 en extracto de yacón obtenido a partir de raíces cultivadas en la misma región de Brasil.

La concentración de azúcares totales y reductores en el extracto de yacón son comparables con los obtenidos por Ferner Scher *et al.*, (2009) quienes reportaron 70,56 % (g/g ms) de azúcares totales y 49,16 % (g/g ms) de azúcares reductores, sin embargo, resulta una dificultad comparar los azúcares presentes en los tubérculos de yacón debido a los diversos factores que influyen en su contenido como zona de siembra, época de cosecha y método de almacenamiento poscosecha (Ledur Alles *et al.*, 2015).

2. Ensayo cualitativo de la producción de inulina

Al inicio del trabajo, se realizó una observación microscópica del hongo filamentoso, a partir del crecimiento en APD. Las imágenes se muestran en la figura 16.

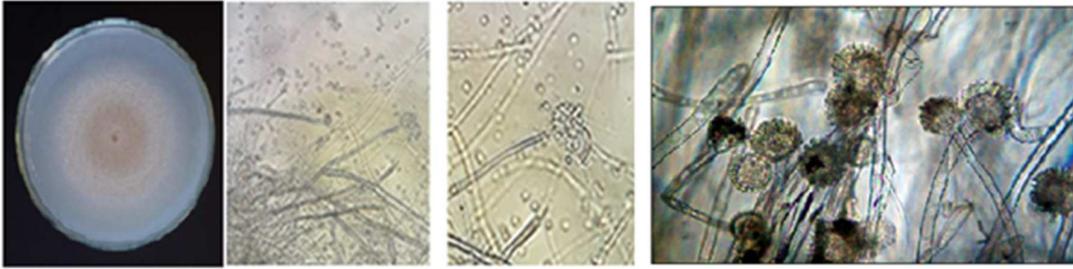


Figura 16. Imagen macroscópica del crecimiento de *Aspergillus kawachii* en medio APD e imágenes obtenidas de la observación microscópica con objetivo de 10X y 40X

Se observaron hifas septadas y conidióforos con extremos terminales ensanchados, que se corresponden con el género *Aspergillus*.

Posteriormente se estudió la producción de inulinasa extracelular en cultivo en placa en medio APD con el agregado de inulina.

La cepa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 fue capaz de crecer en el medio conteniendo inulina y producir una zona de color rojo alrededor de la colonia producto de la liberación de azúcares reductores y la formación de trifenilformazán, compuesto insoluble de color rojo, como se muestra en la figura 17. Se utilizó como patrón una cepa de *Penicillium lilacinum* LPS 876 no productora de inulinasa.

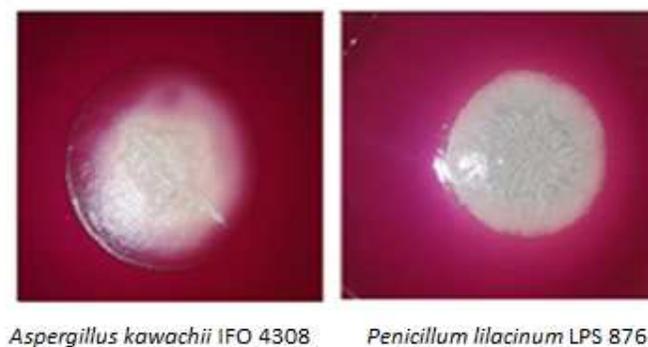


Figura 17. Imagen de actividad inulinasa en placa de medio APD más inulina

3. Evaluación de las condiciones de crecimiento de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en medio líquido

3.1. Efecto de las FCE

Después de comprobar que la cepa de *Aspergillus kawachii* fue capaz de crecer en medio con inulina, se estudiaron los efectos de diferentes FCE en la

producción de inulinasa en cultivos sumergidos diferentes azúcares, incluyendo glucosa, fructosa, sacarosa e inulina de grado alimenticio, bagazo y extracto de yacón.

Aspergillus kawachii IFO 4308 creció en todos los medios de cultivo con las FCE probadas, en forma de pequeños pellets de, aproximadamente, 1-2 mm de diámetro.

Como se muestra en la figura 18 la mayor producción de inulinasa se obtuvo en el medio de cultivo con extracto de yacón ($35,0 \pm 0,7$ mU/ml) y con inulina pura ($19,6 \pm 1,7$ mU/ml).

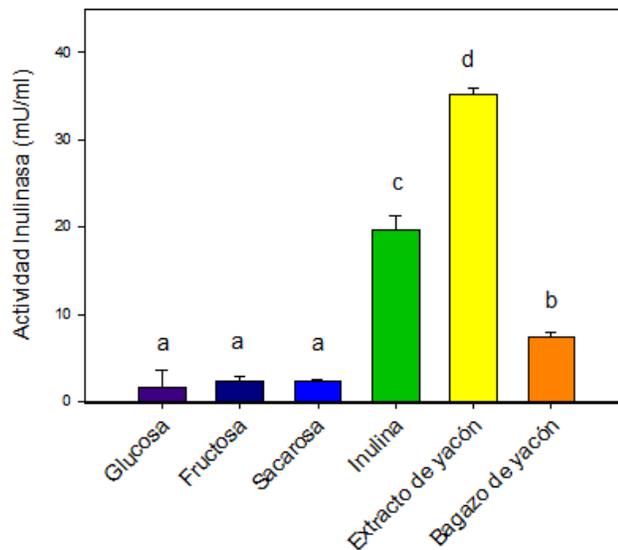


Figura 18. Efecto de la actividad inulinasa en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono y energía

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos.

El uso de bagazo de yacón dio como resultado valores menores de actividad enzimática, probablemente debido a los bajos niveles restantes de FCE en este medio de cultivo. La actividad inulinasa fue mucho menor en los medios con fructosa, glucosa y sacarosa, donde no se observó diferencia significativa ($p < 0,05$) al aplicar el Test de Tukey.

Estos resultados sugieren que la presencia de inulina en los medios de cultivo actuó como inductor para la síntesis de inulinasa. Se han obtenido resultados muy interesantes para la producción de inulinasa con sustratos complejos de desechos agroindustriales o extractos vegetales. Entre estos

materiales vegetales, la dalia, la alcachofa de Jerusalén, el ajo y otros han sido citados en la literatura (Trivedi *et al.*, 2012). Resultados similares a los obtenidos en este trabajo fueron reportados por Singh *et al.* (2007) inoculando *Kluyveromyces marxianus* YS-1 en diferentes medios de cultivo que contenían azúcares. Por otra parte, otros autores también informaron una mayor producción de inulinasa para *Aspergillus niger* utilizando extractos de raíz de diente de león como fuente de carbono en comparación con la inulina de achicoria pura (Kango, 2008).

La búsqueda de sustratos naturales como FCE para la producción enzimática es permanente desde hace muchísimos años, trabajos recientes informan el estudio de diferentes FCE inoculando una cepa de *Aspergillus niger* A-42 y concluyen que la melaza de remolacha azucarera y el extracto de algarroba son promisorias para la producción de la enzima inulinasa (Germec & Turhan, 2019).

El extracto de yacón, que resultó ser el mejor sustrato para la producción de inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308, es una fuente de carbono económica y fácil de obtener, lo que puede ser un producto atractivo para la fermentación a gran escala, ya que la inulina pura tiene un costo muy alto para este tipo de procesos (Das *et al.*, 2019).

3.1.1. Evaluación de la concentración óptima de extracto de yacón

Se determinó la concentración óptima de extracto de yacón evaluando la actividad inulinasa. Se observó un aumento progresivo de la producción de esta enzima desde 0,2 hasta 0,7 % (p/v) de azúcares totales. La máxima producción enzimática fue de $44,8 \pm 1,6$ mU/ml. Al agregar mayor cantidad del extracto se observó disminución de la producción de la enzima, como se muestra en la figura 19.

Se ha establecido que el incremento de concentración de sustrato puede llevar a una represión catabólica disminuyendo la actividad enzimática, esto podría explicar el comportamiento observado en este estudio. Estos resultados son coincidentes con los reportados por Saber & El-Naggar (2009) que estudiaron la optimización de las condiciones de fermentación para la biosíntesis de inulinasa de *Aspergillus tamaris* y encontraron que la producción de la enzima se incrementa con el aumento de la concentración de la FCE, llegando a 25,7

U/ml en presencia de tubérculos de alcachofa y 31,0 U/ml en tubérculos de dalia, con posterior decrecimiento de la actividad enzimática, a mayores concentraciones de sustrato.

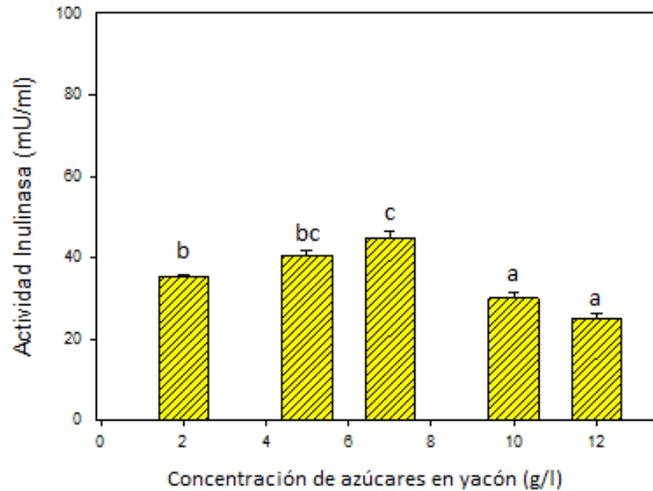


Figura 19. Concentración óptima de yacón para la producción de inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$) en el test de Tukey. Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos.

3.1.2. Efecto de las FCE combinadas con extracto de yacón

Las diferentes fuentes de carbono se estudiaron individualmente y en combinación con extracto de yacón para determinar su efecto sobre producción de inulinasa. Los resultados se muestran en la figura 20.

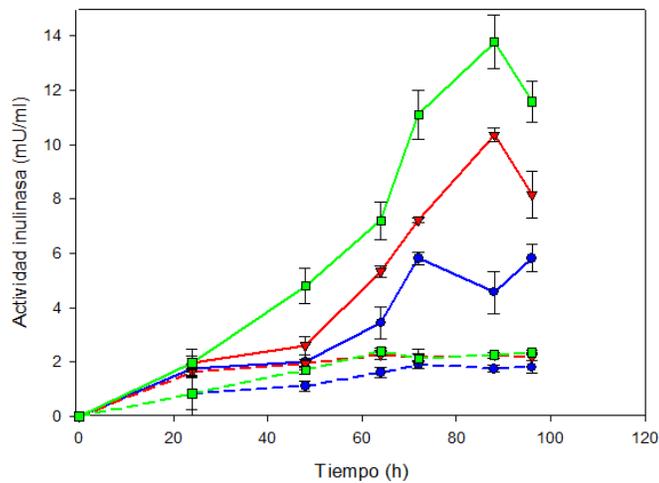


Figura 20. Evaluación de la producción de inulinasa en FCE combinadas con extracto de yacón.

Glucosa 1% (- - ● - -), glucosa 1% + yacón (0,7%) (— ● —), fructosa 1% (- - ▲ - -), fructosa 1% + yacón 0,7% (— ▲ —), sacarosa 1% (- - ■ - -), sacarosa 1% + yacón 0,7% (— ■ —).

Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos.

Individualmente, todas las fuentes de carbono sin el inductor no estimularon la producción de inulinasa, más allá de un nivel basal, mientras que las mismas fuentes de carbono en combinación con extracto de yacón mostraron un aumento significativo en la producción de inulinasa.

A partir de estos resultados se puede deducir que la inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 es una enzima inducible, y que la inulina o los fructanos presentes en el extracto de yacón actúan como inductores específicos. Singh y Chauhan, (2017) encontraron un comportamiento similar al estudiar la producción de una inulinasa de *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 como FCE y como inductor en la fermentación. Estos investigadores estudiaron el efecto de la lactosa, glucosa, maltosa, fructosa y sacarosa por separado y en combinación con inulina y pudieron determinar que aumentó la actividad inulinasa en presencia del inductor.

3.2. Efecto de las FN

Para evaluar la FN que genera mayor producción de inulinasa en *Aspergillus kawachii* IFO 4308, con la concentración de extracto de yacón más adecuada, varias fuentes de nitrógeno tanto orgánicas como inorgánicas se incorporaron individualmente al medio basal con el mismo contenido equivalente de nitrógeno. Los resultados se muestran en la figura 21.

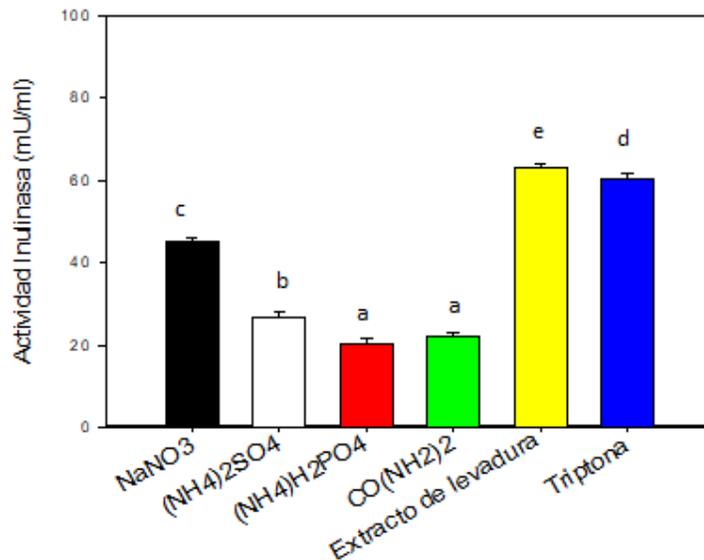


Figura 21. Efecto de diferentes FN en la producción de inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308

NaNO₃ (0,2 %), NH₄H₂PO₄ (0,2 %), (NH₄)₂SO₄ (0,2 %), extracto de levadura (0,2 %), CO (NH₂)₂ (0,2 %) y triptona (0,2 %). Medias con distintas letras indican que son significativamente diferentes (p<0,05) en el test de Tukey. Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos.

Los resultados obtenidos revelan que las fuentes de nitrógeno orgánicas como extracto de levadura y triptona incrementaron la producción de inulinasa. Varios autores han reportado al extracto de levadura como fuente para la producción de esta enzima a partir de diferentes microorganismos: Kango, (2008) lo utilizó como única FN en el crecimiento de *Aspergillus niger* NK 126, Wang *et al.* (2003) reportaron que 2 % de extracto de levadura y 0,5 % de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ fueron las condiciones de fermentación óptimas para la producción de endo y exo inulinasa de *Aspergillus ficuum* NJSP5-06, Skowronek & Fiedurek (2004) informaron que 2 % de extracto de levadura y 0,2 % de NaNO_3 fueron las FN óptimas para la producción de inulinasa a partir de *Aspergillus niger* 13/36, Ilgin *et al.* (2019) optimizaron un medio de cultivo para *Aspergillus niger* y encontraron que 1% de extracto de levadura y 5 % de extracto de algarroba resultaron las concentraciones óptimas para la producción de una exoinulinasa.

En este estudio se seleccionó como FN al extracto de levadura, si bien se conoce que al ser un sustrato complejo provee C, energía, factores de crecimiento, entre otros, para la producción de inulinasa por *Aspergillus kawachii* IFO 4308.

3.2.1. Evaluación de la concentración óptima de extracto de levadura

Se determinó la concentración óptima de extracto de levadura a incorporar en el medio de cultivo evaluando la actividad inulinasa. Los resultados se presentan en la figura 22.

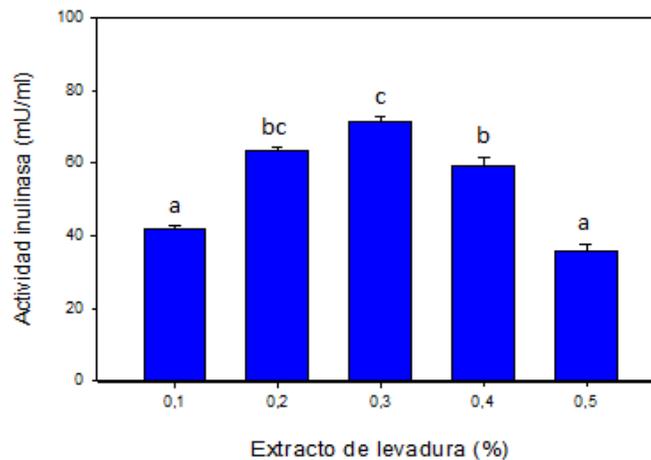


Figura 22. Concentración óptima de extracto de levadura

Medias con distintas letras indican que son significativamente diferentes ($p < 0,05$) mediante test de Tukey. Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos.

La concentración óptima de esta FN que produjo mayor actividad inulinasa fue 0,3 % (p/v). Al aumentar la concentración se observó una disminución en la producción enzimática que podría deberse a la naturaleza compleja de esta FN ya que alguno de sus constituyentes, en concentraciones más altas, podrían tener efectos tóxicos sobre la producción de la enzima (Singh *et al.*, 2006).

3.3. Efecto de la temperatura y el pH

Se estudiaron tres temperaturas de incubación para el cultivo de *Aspergillus kawachii* IFO 4308: 20, 28 y 37 °C en medio base suplementado con extracto de yacón en concentración de 0,7 % p/v de azúcares totales. Los resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Actividad inulinasa a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Act. inulinasa (mU/ml)
20	24,1 ± 0,3 ^b
28	45,0 ± 0,2 ^c
37	6,3 ± 0,5 ^a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$) mediante test de Tukey. Los desvíos estándar se calcularon a partir de los resultados de dos experimentos.

La temperatura de fermentación es un factor esencial ya que tiene efecto significativo en la activación enzimática.

En las temperaturas estudiadas, tanto a 20 como a 37 °C el crecimiento del hongo y la actividad enzimática producida fue escasa, y 28 °C resultó ser la temperatura más adecuada para producción de mayor actividad inulinasa. Temperaturas más altas inhiben el crecimiento del hongo y la producción de la enzima. Esto podría deberse a modificaciones en el transporte de solutos y moléculas en la membrana plasmática (Magadum y Yadav, 2018).

Diferentes temperaturas han sido reportadas para la producción de inulinasas de *Aspergillus spp.*, pero la mayoría de las investigaciones informan valores entre 28 y 30 °C (Singh *et al.*, 2018).

Para evaluar el efecto del pH inicial se estudió la producción enzimática a seis diferentes valores de pH. Se consideró como control el pH= 5 del medio base. Los resultados se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Actividad inulinasa a diferentes valores de pH

pH	Actividad inulinasa (mU/ml)
3,5	88,15± 0,50 ^a
4,0	83,07± 0,35 ^a
4,5	48,23± 0,78 ^b
5,0	45,12± 0,62 ^b
6,0	18,34± 0,68 ^c
7,0	12,36± 1,50 ^c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$) mediante test de Tukey. Los desvíos estándar se calcularon a partir de los resultados de dos experimentos.

Se observó que, en el rango de pH estudiado el hongo fue capaz de producir la enzima, con un máximo a pH inicial de 3,5-4,0 donde la producción enzimática se duplicó con respecto al medio de cultivo control de pH 5. Este pH fue el utilizado en un medio de cultivo con extracto de yacón para la producción de inulinasa por *K. marxianus* por Cazetta *et al.* (2004). Sin embargo otros investigadores han reportado que el pH inicial óptimo para la producción de la enzima por *Aspergillus* spp. está entre 5,0 y 6,5 (Magadum y Yadav, 2018; Germec *et al.*, 2020).

Los resultados de este estudio indican que la cepa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 fue capaz de producir actividad enzimática en medio ácido. La capacidad de esta cepa de crecer a pH bajo es importante para evitar contaminaciones exógenas durante el cultivo.

3.4. Efecto del tamaño del inóculo en la producción enzimática

El efecto de la concentración de inóculo presente en el medio sobre la producción de inulinasa se llevó a cabo ensayando tres concentraciones de 0,1; 1 y 10 % de un inóculo inicial de 8 log esporas/ml. Estas concentraciones se seleccionaron teniendo en cuenta que un alto tamaño de inóculo podría aumentar la viscosidad del medio de fermentación al exceso de crecimiento del hongo filamentoso, lo que provocaría un desequilibrio nutricional en el medio o podría consumir los nutrientes antes de que estén fisiológicamente listos para comenzar la producción de enzimas (Singh *et al.*, 2007) y un inóculo muy diluido podría generar una biomasa fúngica insuficiente y una producción enzimática no

detectable. En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 17. Actividad inulinasa a diferentes concentraciones de inóculos

Conc. del inóculo (% esporas/v)	Actividad inulinasa (mU/ml)
0,1	41,0±0,2
1,0	44,2±0,6
10,0	46,5 ±2,5

Los desvíos estándar se calcularon a partir de los resultados de dos experimentos.

El tamaño del inóculo juega un papel importante en el proceso de fermentación dado que la producción enzimática depende del acceso a una cantidad suficiente de nutrientes y oxígeno. Se han informado diferentes tamaños óptimos de inóculo para la producción de inulinasa, por ejemplo: 1 % para *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128 URM (Souza-Motta *et al.*, 2005), 2 % para *Aspergillus niger* (Skowronek & Fiedurek, 2004) y 5 % para *Aspergillus tamarii* (Saber & El-Naggar, 2009). Sin embargo, a las diferentes concentraciones de inóculo utilizadas en este estudio no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) al aplicar el test de Tukey en los resultados obtenidos de producción de inulinasa. Se continuó trabajando con la concentración inicial de 6 log esporas/ml.

3.5. Cultivo en matraces Erlenmeyer en las condiciones mejoradas

Después de analizar los parámetros que afectan la producción de inulinasa se llevó a cabo un cultivo de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 para estudiar el efecto sinérgico de los parámetros seleccionados.

Los resultados obtenidos permitieron el diseño de un medio que contenía extracto de yacón con una concentración de 0,7 % de azúcares totales, extracto de levadura 0,3 %, K_2HPO_4 0,1 %, KCl, 0,05 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 %, $FeSO_4 \cdot 6H_2O$ 0,001 %. El pH del medio se llevó a 3,5; el tamaño del inóculo fue 1 % (6 log esporas/ml del hongo filamentoso) y la temperatura de cultivo fue 28 °C por 96 h.

A intervalos regulares se midió la actividad enzimática, azúcares totales, biomasa producida y pH del cultivo. Los resultados se presentan en la figura 23.

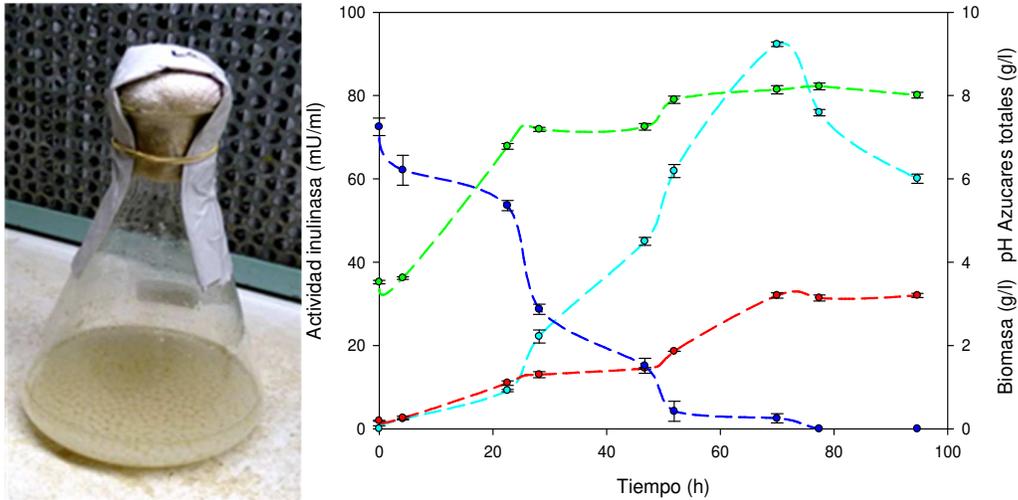


Figura 23. Perfil de cultivo de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en matraces Erlenmeyer en condiciones mejoradas por metodología de una variable a la vez

Azúcares totales (●), biomasa (●), pH (●), actividad inulinasa (●)

Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos.

La concentración de biomasa aumentó hasta las 72 horas de cultivo donde se produjo la máxima actividad inulinasa ($92,3 \pm 0,5$ mU/ml). Posteriormente se produjo una fase estacionaria y la actividad enzimática comenzó a declinar posiblemente debido a la disminución de la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo y la inestabilidad de la enzima a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en agitación prolongada. A las 48 h alrededor del 80 % de los azúcares reductores iniciales habían sido consumidos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kumar *et al.* (2005), Saber & El Naggat (2009), Ilgin *et al.*, (2019).

Durante el cultivo el pH del medio se incrementó de 3,5 a 8 y el aumento se asoció con la asimilación de la fuente de nitrógeno.

Bajo las condiciones mejoradas se logró duplicar la actividad inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 con respecto a la producción enzimática en el medio base que fue de $44,8 \pm 1,6$ mU/ml, alcanzado un valor de $92,3 \pm 0,05$ mU/ml y una productividad de 1,28 U/l/h.

3.6. Cultivo en biorreactor en las condiciones mejoradas

Los cultivos de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 se llevaron a cabo en un biorreactor (LH 210, Inceltech, Francia) de 5 l de capacidad, en 4 l de medio de

cultivo detallado en el inciso anterior.

A intervalos regulares se tomaron muestras para evaluar los mismos parámetros que se midieron en el cultivo en matraces *Erlenmeyer*. La evolución de la producción enzimática, la producción de biomasa, el consumo de azúcares totales y los cambios de pH pueden observarse en la figura 24.

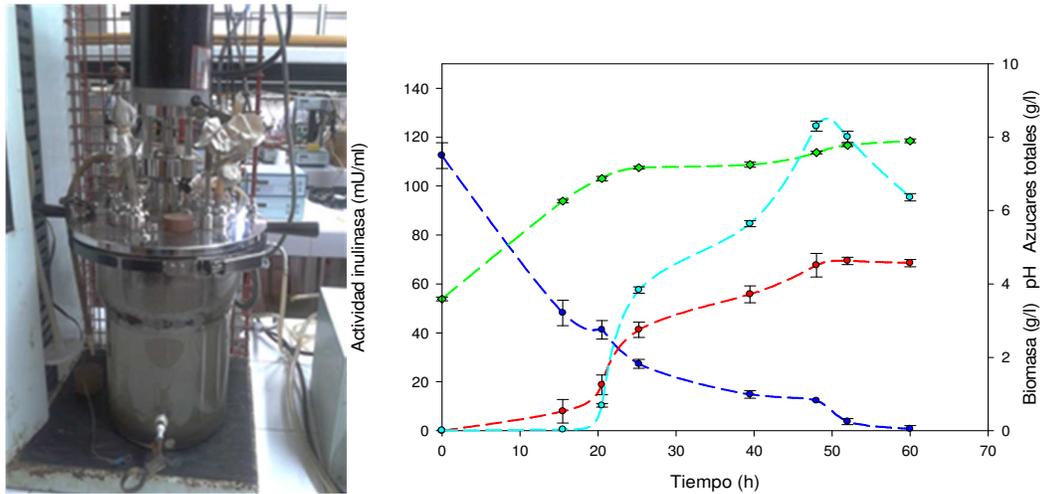


Figura 24. Perfil de cultivo de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en biorreactor en condiciones óptimas por la metodología de una variable a la vez

Azúcares totales (●), biomasa (■), pH (◆), actividad inulinasa (●)
 Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos.

El crecimiento del hongo filamentoso aumentó hasta las 48 horas de cultivo alcanzado una concentración de biomasa de $4,57 \pm 0,1$ g/l. Esto coincidió con la producción de máxima actividad inulinasa ($124,1 \pm 2,1$ mU/ml). Posteriormente se produjo una fase estacionaria y la actividad enzimática comenzó a disminuir. La actividad inulinasa comenzó a detectarse cuando la concentración de azúcares reductores había disminuido en un 70 %.

Durante el cultivo el pH del medio se incrementó de 3,5 a 7,9 de manera similar a lo ocurrido en el cultivo en matraz Erlenmeyer. En la figura 25 se comparan los valores obtenidos de actividad inulinasa en diferentes escalas de cultivo.

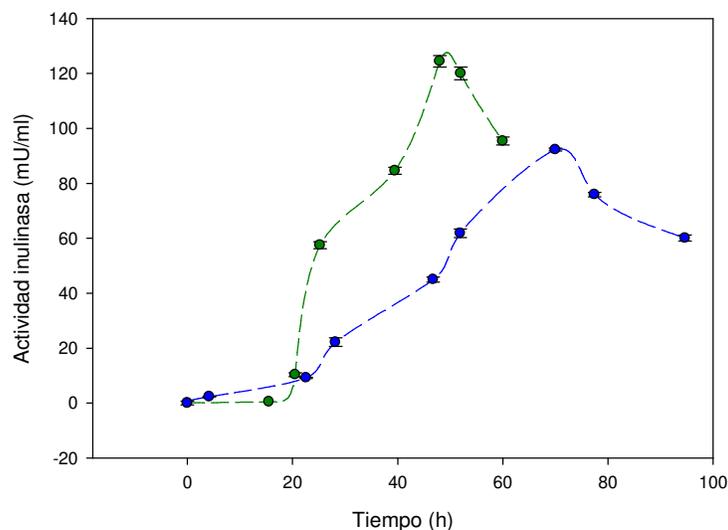


Figura 25. Perfil de actividad inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 en diferentes escalas de cultivo

Escalas de cultivo (●) en matraz *Erlenmeyer* (●) en biorreactor

Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos.

Se obtuvo un aumento significativo en la actividad máxima de inulinasa en el biorreactor ($124,1 \pm 2,1$ mU/ml) comparado con la actividad alcanzada en matraz *Erlenmeyer* ($92,3 \pm 0,5$ mU/ml). También se comprobó un aumento en la productividad que fue de 2,58 U/l/h. La distribución uniforme de los componentes del medio producto de la agitación y una mayor transferencia de O_2 podrían atribuirse a los incrementos producidos en la escala de biorreactor. Resultados similares fueron obtenidos por Singh *et al.* (2007) en la optimización del medio para la producción de inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* YS-1 quienes informaron un aumento de 30,8 U/ml en matraces *Erlenmeyer* a 45,7 U/ml en cultivo en biorreactor.

4. Caracterización bioquímica del extracto enzimático

La mayoría de las enzimas industriales utilizadas actualmente son de acción hidrolítica y se emplean para degradar varias sustancias naturales. Cuando se plantea la utilización de una o varias enzimas en un proceso industrial dado, la estabilidad es un factor importante para tener en cuenta. La temperatura y el pH en el que se lleva a cabo el proceso, así como la presencia de iones metálicos tienden a afectar la actividad y estabilidad del biocatalizador.

Con la finalidad de caracterizar bioquímicamente el extracto enzimático obtenido en biorreactor se estudió la estabilidad frente al pH, la temperatura y

agentes termoestabilizantes, el pH óptimo y la acción de los iones metálicos sobre la actividad y el modo de acción catalítica de la enzima.

4.1. Efecto del pH y la temperatura

Como se mencionó anteriormente, es sustancial conocer la estabilidad de la enzima frente a diferentes valores de pH, no solo para establecer la condición adecuada para que la enzima actúe sobre un determinado sustrato, sino que además tiene que encontrarse activa en las condiciones de pH necesarias para llevar a cabo el proceso en el que interviene.

El extracto crudo de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 se caracterizó en términos de su estabilidad frente a pH y los resultados se presentan en la figura 26.

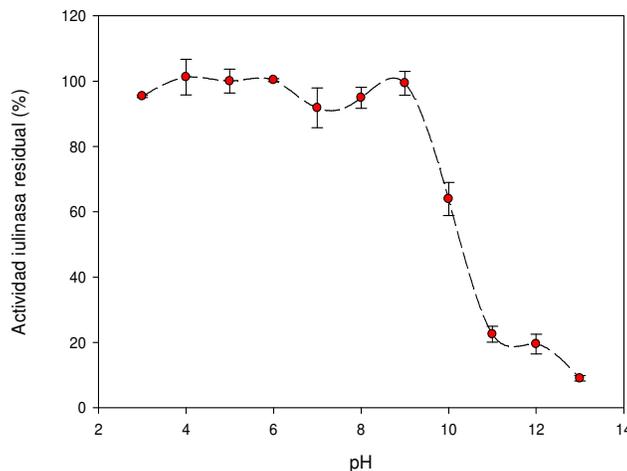


Figura 26. Estabilidad de la inulinasa de *Aspergillus kawachii* frente a diferentes valores de pH

Las barras de error representan el desvío estándar calculado de tres experimentos.

El gráfico muestra que la enzima es altamente estable a valores de pH que van de 3,0 a 9,0, donde retiene aproximadamente el 100 % de su actividad residual. A pH 10, el 60 % y superiores a este valor, menor al 20 %.

Para evaluar la estabilidad frente a diferentes temperaturas, el extracto enzimático se incubó en un rango de 37 a 65 °C. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 26.

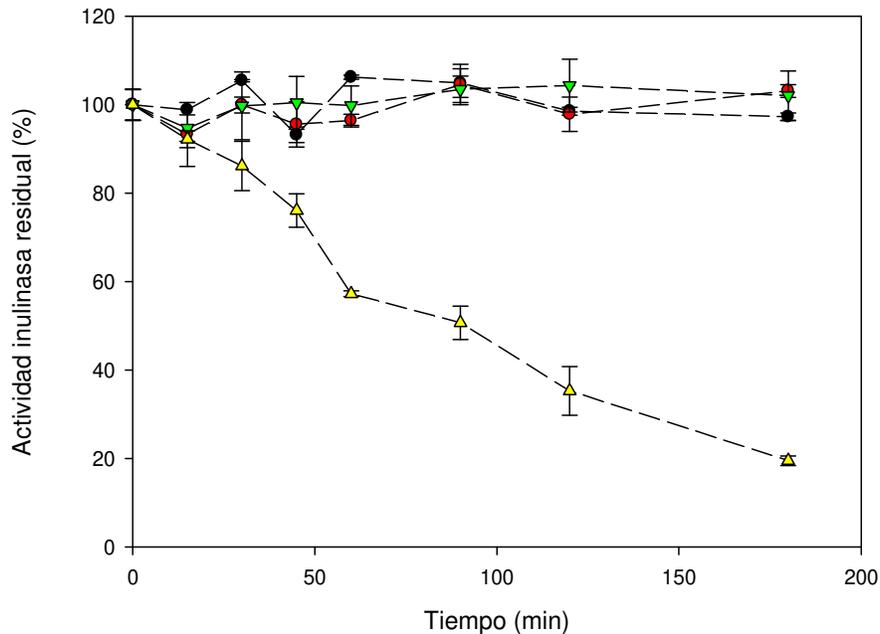


Figura 27. Estabilidad de la enzima inulinaasa frente a diferentes temperaturas

37 °C (●), 45 °C (▼), 55 °C (●), 65 °C (▲)

Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos

Esta enzima resultó termoestable durante 180 minutos en una amplitud térmica de 37 a 55 °C, mientras que retuvo tan solo un 20 % de actividad enzimática luego de incubación a 65 °C por 180 minutos.

La inactivación térmica de esta enzima a esta última temperatura se ajustó satisfactoriamente a una cinética de primer orden con una vida media calculada en 75 minutos y un valor de K_d 0,009 minutos⁻¹.

La estabilidad de las enzimas frente a la temperatura suele considerarse el factor crítico más importante para la aplicación industrial de producción de fructosa o FOS a partir de inulina, ya que elevadas temperaturas aseguran adecuada solubilidad del sustrato y se previene la contaminación microbiana que ocurre a temperatura ambiente.

La mayoría de los estudios realizados sobre inulinasas de *Aspergillus* sp. indican que son enzimas termoestables: Singh & Gill, (2006) caracterizaron una inulinaasa de *Aspergillus niger* que retiene la actividad del 60-65 % después de 2 horas a 65 °C; Gupta *et al.* (1998) estudiaron una inulinaasa extracelular de *Aspergillus oryzae* que mostró una estabilidad notable al calor, perdiendo el 41

y el 32 % de su actividad después de 2 h a 90 °C y 100 °C, respectivamente; Ettalibi & Baratti (1990) reportaron que dos inulinasas de *Aspergillus ficuum* presentaban estabilidad térmica, una con una actividad del 74 % luego de 6 h a 60 °C y los otros con 22 % luego de 6 h a 70°C, entre otros. Estos reportes avalan los resultados obtenidos en este estudio.

4.2. Estudio del pH óptimo

Los valores de pH óptimos reportados para diferentes inulinasas de hongos filamentosos y levaduras varían, en general, en un rango entre 4,5 y 6 (Pandey *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2008; Sheng *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta el pH del crecimiento de *Aspergillus kawachii* se planteó este análisis en un rango de valores pH de 2 a 11. Los resultados obtenidos al estudiar la actividad de la enzima a diferentes valores de pH se muestran en la figura 28.

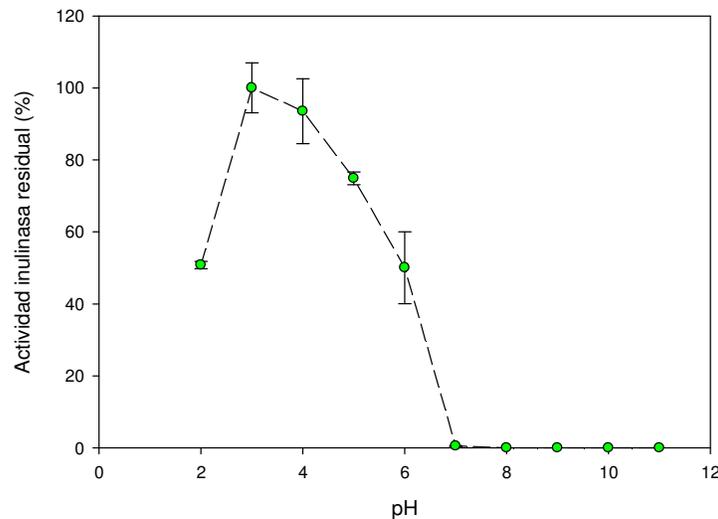


Figura 28. Actividad de la enzima inulinasa a diferentes valores de pH

Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos.

Se desprende de estos estudios que la inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 exhibe actividad óptima a pH 3 con inulina como sustrato, condición que es diferente de las reportadas previamente para otras inulinasas. A modo de ejemplo se citan: Laowklom *et al.* (2012) quienes reportaron un pH de 6 para una inulinasa de *Streptomyces* spp. CP 01 y Mohamed *et al.* (2015) que publicaron para dos inulinasas de *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 un pH óptimo de 5. *Aspergillus kawachii* se caracteriza por expresar enzimas hidrolíticas con

pHs óptimos ácidos. Esta característica hace que este biocatalizador sea interesante para la aplicación industrial en medios ácidos dado que evitaría el crecimiento de microorganismos contaminantes.

4.3. Efecto de los iones metálicos sobre la estabilidad de la inulinasa

Se ensayó el efecto de varios cationes sobre la actividad inulinasa, partiendo de la existencia de estudios en los que se reporta tanto la estimulación como la inhibición de la actividad fúngica y bacteriana por iones metálicos (Sharma *et al.*, 2006, Singh *et al.*, 2007, Sheng *et al.*, 2008, entre otros).

En la figura 29 se indica el efecto de producido por K^+ , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} sobre la actividad inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308.

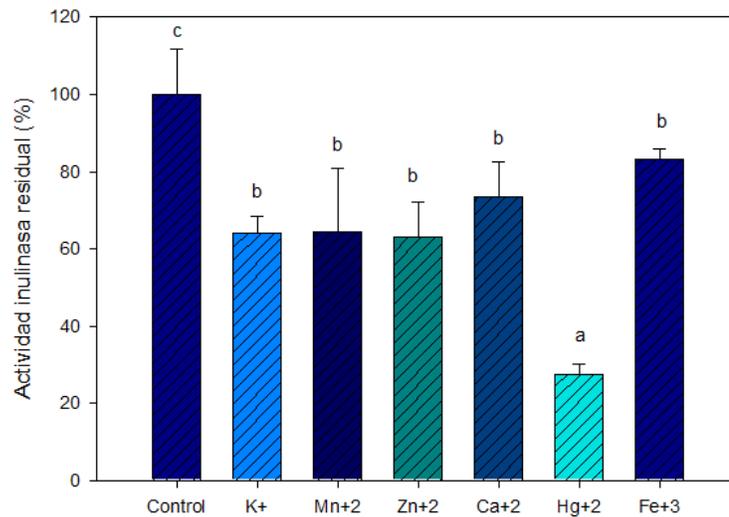


Figura 29. Efecto de los iones metálicos sobre la actividad de la inulinasa

Medias con distintas letras indican que son significativamente diferentes ($p < 0,05$) en el Test de Tukey. Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos.

Puede observarse que la inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 fue parcialmente inhibida por K^+ , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{3+} en concentraciones de 1 mM. Todos iones ensayados presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con el control (extracto crudo) y el Hg^{2+} fue el que presentó mayor inhibición.

Estos resultados difieren de los observados anteriormente para otras inulinasas microbianas. Por ejemplo, Sharma *et al.*, (2006) y Sheng *et al.*,

(2008) trabajando con *Streptomyces* spp. y *Cryptococcus aureus*, respectivamente, informaron la estimulación de la actividad inulinasa por K^+ , Na^+ , Fe^{2+} , Cu^{2+} y Ca^{2+} y la inhibición completa por Hg^{2+} . Estos autores plantean que el fuerte efecto inhibitorio observado con Hg^{2+} sugiere que algún grupo -SH en la proteína podría ser esencial para la actividad. Sin embargo, Gupta *et al.*, (1998) reportaron que aislaron una inulinasa extracelular de *Aspergillus oryzae* cuya actividad hidrolítica sobre inulina mejoró en presencia de iones Hg^{2+} .

Los iones Ca^{2+} y Zn^{2+} fueron reportados como inhibidores de inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* YS-1 (Singh *et al.*, 2007), Zn^{2+} , Fe^{3+} y Mn^{2+} mostraron efectos inhibitorios sobre inulinasa de *Rhizoctonia solani* (Ertan *et al.*, 2005) y también Zn^{2+} y Fe^{3+} en inulinasa de *Aspergillus fumigatus* (Gill *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en este estudio indican que no es necesaria la suplementación de la mezcla de reacción enzimática con estos iones.

4.4. Efecto de agentes estabilizantes en la producción enzimática

Se añadieron al extracto crudo termoestabilizantes tales como glicerol, propilenglicol y manitol. La evaluación de la actividad inulinasa residual se muestra en la figura 30.

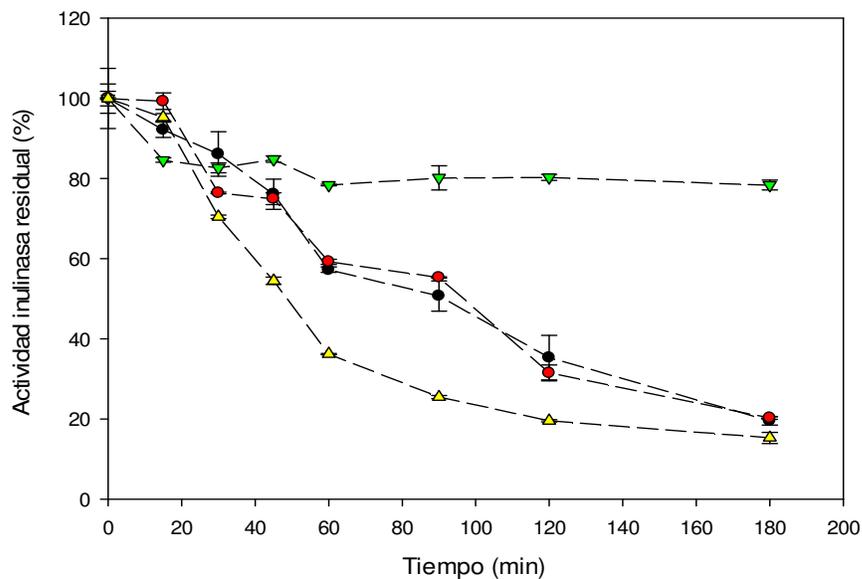


Figura 30. Estabilidad de la inulinasa a 65 °C y frente a agentes estabilizantes

65 °C (●), 65 °C + propilenglicol (●), 65 °C + glicerol (▼) y 65 °C + sorbitol (▲).
Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos.

Puede observarse cómo la presencia del glicerol al 10 % en la muestra, tuvo un efecto protector significativo durante el tiempo estudiado (180 minutos) comparado con las muestras control y con agregado de propilenglicol y sorbitol a la misma temperatura, manteniendo el 80 % de la actividad inulinasa residual. Por otra parte, se puede afirmar que para esta enzima no hay cambios significativos en la vida media en presencia de propilenglicol al 10 %, manteniendo un 20 % de actividad residual, mientras que en presencia de sorbitol la vida media de la enzima disminuyó significativamente y solo retuvo el 15 % de actividad inicial.

Los resultados obtenidos de vida media de la enzima y k_d se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Vida media y k_d de la inulinasa de *Aspergillus kawachii* en presencia de termoestabilizantes

	Vida media (minutos)	k_d (minutos⁻¹)
Control	75,3	0,0092±0,0005 ^a
Propilenglicol	77,0	0,0090±0,0001 ^a
Sorbitol	59,0	0,0116±0,0006 ^b

Los datos corresponden a dos determinaciones con sus respectivos DS. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$) para el Test de Tukey.

Estos resultados sugieren que la termoestabilidad de esta enzima resulta mayor con el agregado de un agente estabilizante, por lo que se presenta como alternativa adecuada para su aplicación.

4.5. Modo de acción de la enzima en la hidrólisis de inulina

Para clasificar el modo de acción de la enzima como exo o endoinulinasa se analizaron los productos de hidrólisis de la inulina por cromatografía en capa fina. Los resultados se muestran en la figura 31.

Como se puede observar, en los primeros tiempos de reacción (1 y 2 h) se encontraron fructosa y restos de sacarosa, producto de la hidrólisis parcial de inulina, posteriormente (3 a 6 h) se encontró fructosa como único producto, lo

que indica que esta enzima muestra un patrón característico de hidrólisis de inulina mediante una exo-actividad. Esta característica determina su potencial tecnológico en la industria alimenticia para la hidrólisis de fructanos y producción de jarabe de fructosa.

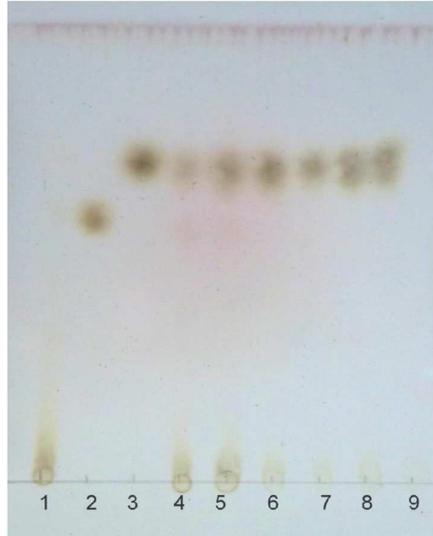


Figura 31. Cromatograma de los productos de hidrólisis de inulina

Calle 1: estándar de inulina, Calle 2: estándar de sacarosa, Calle 3: estándar de fructosa, Calle 4-9: productos de hidrólisis de inulina en tiempos de reacción de 1 a 6 h, Calle 4: 1 h, Calle 5: 2 h, Calle 6: 3 h, Calle 7: 4 h, Calle 8: 5 h, Calle 9: 6 h.

Conclusiones del capítulo

Aspergillus kawachii IFO 4308 fue capaz de producir una inulinasa utilizando extracto de yacón como fuente de carbono y energía, lo que resulta interesante para disminuir costos de producción de componentes del medio de cultivo y de esta manera poder establecer un bioproceso rentable tanto desde el punto de vista económico como ambiental. Por otra parte, su utilización permitirá la valorización de esta raíz andina y el desarrollo de la economía regional.

Se logró mejorar el medio de cultivo mediante el estudio de una variable a la vez y se estudió la producción enzimática actividad tanto en cultivo en matraz Erlenmeyer como en biorreactor donde se obtuvo un incremento de la actividad inulinasa y de la productividad debido a las mejores condiciones de cultivo.

El extracto enzimático obtenido se caracterizó como exoinulinasa estable frente a amplio rango de valores de pH con un óptimo de 3, termoestable hasta

65 °C, característica que pudo mejorarse con el agregado de glicerol.

Por otra parte, los resultados indican que esta enzima no requiere de la presencia de cationes divalentes para catalizar la hidrólisis de su sustrato, y que es completamente inhibida por Hg^{2+} .

Estas características plantearon la continuidad de los estudios, sin embargo, la baja productividad enzimática en el cultivo llevó a plantear la necesidad del realizar el clonado del gen en un sistema de expresión heterólogo para hacer este proceso más adecuado para sus potenciales aplicaciones.

CAPÍTULO 2. CLONADO DEL GEN INULINASA DE ASPERGILLUS KAWACHII IFO 4308 EN PICHIA PASTORIS

La enzima inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 estudiada presentó importantes características bioquímicas, pero se comprobó que este hongo filamentoso la produce en cantidades mínimas, lo que limita la posibilidad de su aplicación.

En la actualidad la producción de enzimas por expresión en sistemas recombinantes es una alternativa atractiva para la obtención de altas cantidades requeridas en la industria. Por otra parte, el sistema de expresión de *Pichia pastoris* ha mostrado gran eficiencia en la producción de enzimas, además de la disponibilidad en el mercado vectores de expresión para adaptarlos a las necesidades de producción de proteínas.

A partir de la bibliografía se decidió plantear tres estrategias de clonado de la inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308, una a partir de ARN mensajero y dos a partir de ADN utilizando dos vectores de expresión pPIC9 y pPICZαA que contienen un promotor inducible para el control de la expresión del gen de la proteína heteróloga.

Se estudió la producción de la enzima inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 expresada en dos cepas *Pichia pastoris* GS115 y X-33.

1. Búsqueda bioinformática

Se comenzó con la búsqueda de la secuencia del gen inulinasa en la base de datos UNIPROT (<http://www.uniprot.org>) para poder diseñar la estrategia de clonado a partir del conocimiento de la proteína.

Se encontró una sola secuencia que corresponde con una exoinulinasa, inferida por homología. Esta secuencia contiene información que codifica una proteína de 518 aa. El PM teórico, de 59,63 KDa, un pI de 4,97 (<http://www.ExPASy.org>), y se determinaron ocho potenciales sitios de N-glicosilación: 49, 67, 111, 112, 254, 300, 398, and 430 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

En la figura 32 se muestra la secuencia aminoacídica de la inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 obtenida de la base de datos mencionada.

10	20	30	40	50
MAPLSKALSV	FMLMGITYAF	NYDQPYRGQY	HFSPQKNWMMN	DPNGLLYHNG
60	70	80	90	100
TYHLFFQYNP	GGIEWGNISW	GHAISEDLTH	WEEKPVALLA	RGFGSDVTEM
110	120	130	140	150
YFSGSAVADV	NNTSGFGKDG	KTPLVAMYTS	YYPVAQTLPS	GQTVQEDQQS
160	170	180	190	200
QSIAYSLDDG	LTWTTYDAAN	PVIPNPPSPY	EAEYQNFDRP	FVFWHDESQK
210	220	230	240	250
WWWTSIAEL	HKLAIYTSN	LKDWKLVSEF	GPYNAQGGVW	ECPGLVKLPL
260	270	280	290	300
DSGNSTKWI	TSGLNPGGPP	GTVGSGTQYF	VGEFDGTTFT	PDADTVYPGN
310	320	330	340	350
STANWMDWGP	DFYAAAGYNG	LSLNDHVHIG	WMNNWQYGAN	IPTYWRSAM
360	370	380	390	400
AIPRHMALKT	IGSKATLVQQ	PQEAWSSISN	KRPIYSRTFK	TLSEGSTNTT
410	420	430	440	450
TTGETFKVDL	SFSAKSKAST	FAIALRASAN	FTEQTLVGVD	FAKQQIFLDR
460	470	480	490	500
THSGDVSFDE	TFASVYHGPL	TPDSTGVVKL	SIFVDRSSVE	VFGGQGETTL
510	520	530		
TAQIFPSSDA	VHARLASTGG	TTEDVRADIY	KIASTWN	

Figura 32. Secuencia aminoacídica de la secuencia de la inulinasa *Aspergillus kawachii* IFO 4308

Otros investigadores han planteado estrategias similares para realizar el clonado del gen inulinasa y han sido reportados por Liu *et al.* (2013).

1.1. Estrategia de clonado a partir de ARN

1.1.1. Extracción de ARN total

El ARN de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 se extrajo a diferentes tiempos: 24, 48 y 72 h y a partir de un cultivo del hongo filamentoso en medio de cultivo con las condiciones mejoradas.

Las muestras se visualizaron en un gel de agarosa para analizar la integridad del ARN extraído. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 35.

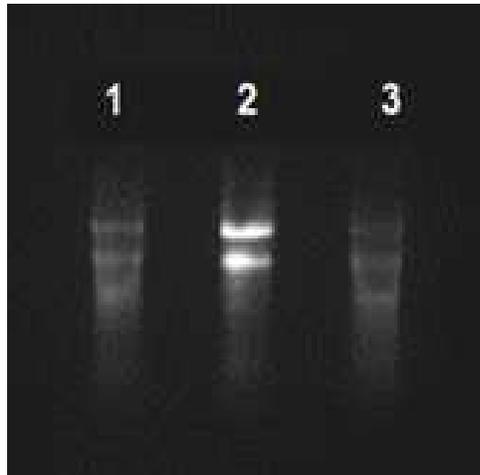


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa 1% del ARN extraído del cultivo de *Aspergillus kawachii* IFO 4308

Calle 1: ARN total extraído a las 24 h de cultivo, Calle 2: ARN total extraído a las 48 h de cultivo, Calle 3: ARN total extraído a las 72 h de cultivo.

En este estudio pueden visualizarse dos bandas definidas en las extracciones de ARN a las 48 h de cultivo (calle 2).

Bernáldez *et al.* (2017) reportan que la extracción de ARN total en hongos filamentosos es difícil debido a la estructura de la pared celular y el alto contenido de ARNasas endógenas que afectan una efectiva extracción de ARN y en los resultados de su investigación muestran, en las electroforesis en gel de agarosa, la presencia de dos bandas que corresponden al ARN ribosomal 28 S y 18 S, así como la aparición de más bandas cuando estos ácidos nucleicos se encuentran degradados. Esto permitió corroborar la integridad del ARN extraído.

Para determinar la pureza del ARN obtenido se midió la relación de absorbancia A_{260}/A_{230} en todas las muestras. Se conoce que los ácidos nucleicos absorben luz a una longitud de onda de 260 nm mientras que los contaminantes orgánicos como el fenol y otros compuestos aromáticos como el trizol absorben luz a una longitud de onda de 230 nm. Las muestras con una relación A_{260}/A_{230} inferior a 1,8 presentan contaminantes que pueden influir en los procesos de clonado.

Los valores obtenidos en este estudio fueron 1,8; 1,9 y 1,4 respectivamente para las extracciones de ARN realizadas a las 24, 48 y 72 h, por lo que se continuó con el ARN extraído a las 48 h de cultivo que fue también el que presentó las dos bandas definidas de ARN ribosomal 26 S y 18 S.

1.1.2. Síntesis de ADNc

Una vez obtenido el ARN total se continuó con la generación de ADNc mediante RT-PCR. El ADNc fue posteriormente utilizado como molde para la reacción de PCR con los *primers* P₁ y P₂ diseñados específicamente para la amplificación del gen inulinasa. No se logró obtener el producto de PCR a partir de ARN a pesar de los múltiples intentos realizados. Posiblemente la baja expresión enzimática y la incertidumbre sobre la calidad del ARN obtenido podían comprometer seriamente los resultados de procedimientos posteriores, los cuales requieren intensa labor, tal como lo reportan Zakaria *et al.* (2013). Estas consideraciones llevaron a plantearnos la segunda estrategia de clonado a partir de ADN genómico.

1.2. Clonado del gen inulinasa a partir de ADN

1.2.1. Extracción del ADN genómico de *Aspergillus kawachii* IFO 4308

El ADN genómico se extrajo de un cultivo de 48 h de *Aspergillus kawachii* en medio en condiciones mejoradas y se realizó una electroforesis en gel de agarosa. En la figura 36 se puede visualizar el resultado obtenido.



Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa 1% del ADN genómico extraído de *Aspergillus kawachii* IFO 4308

La conformación de la pared celular del hongo filamentoso también dificulta la extracción de ADN por lo que el proceso debe ser más agresivo pero puede ocasionar la degradación parcial del ácido nucleico (van Burik *et al.*, 1998). Esto posiblemente fue lo que ocurrió con el ADN de *Aspergillus kawachii* ya que se visualizó parcialmente degradado.

Para determinar la pureza del ADN obtenido se midió la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} dado que a A_{280} absorben compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Se obtuvo un ratio de absorbancia de 2,1 lo que es indicativo de ADN de óptima pureza (Sambrook *et al.*, 1989), por eso es que se decidió utilizarlo para llevar a cabo la amplificación y obtención del gen que codifica para la inulinasa.

1.2.2. Amplificación del gen inulinasa

La amplificación del gen inulinasa se realizó utilizando la técnica de PCR utilizando ADN genómico de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 purificado y los *primers* P₁ y P₂ diseñados específicamente para la amplificación de genes inulinasa.

El producto de PCR se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa como se muestra en la figura 37.

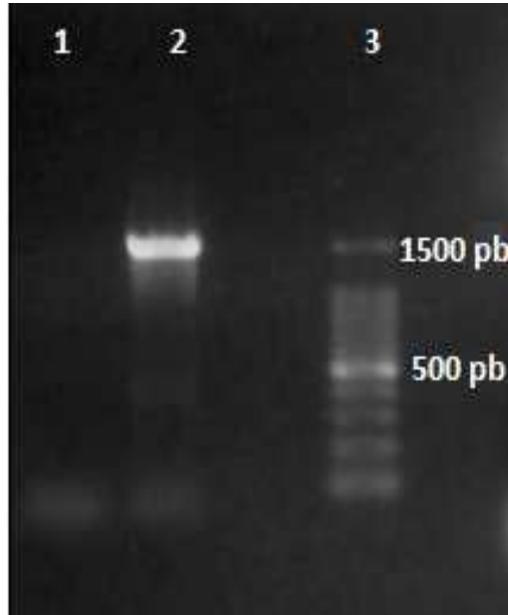


Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la amplificación del gen inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308

Calle 1: control negativo, calle 2: gen inulinasa, calle 3: marcador de peso molecular.

Se confirmó la amplificación de un fragmento de ADN de un tamaño de aproximadamente 1600 pb que coincide con el tamaño esperado del gen inulinasa ya que resultó similar al reportado por Arand *et al.* (2002) quienes obtuvieron un fragmento por amplificación de 1614 pb.

Para evaluar la correcta síntesis e identidad del gen de interés se realizó un ensayo previo a la secuenciación de ADN del gen inulinasa amplificado. Esto consistió en una digestión con la enzima de restricción *BsrDI*, a partir de la información obtenida utilizando el programa Clone Manager versión 9.5.1 (Sci-Ed software, USA) que indicó un único corte en el gen, generando dos fragmentos de 467 pb y 1205 pb.

En la figura 38 se muestra el resultado bioinformático y de la electroforesis en gel de agarosa correspondiente a los productos de digestión.

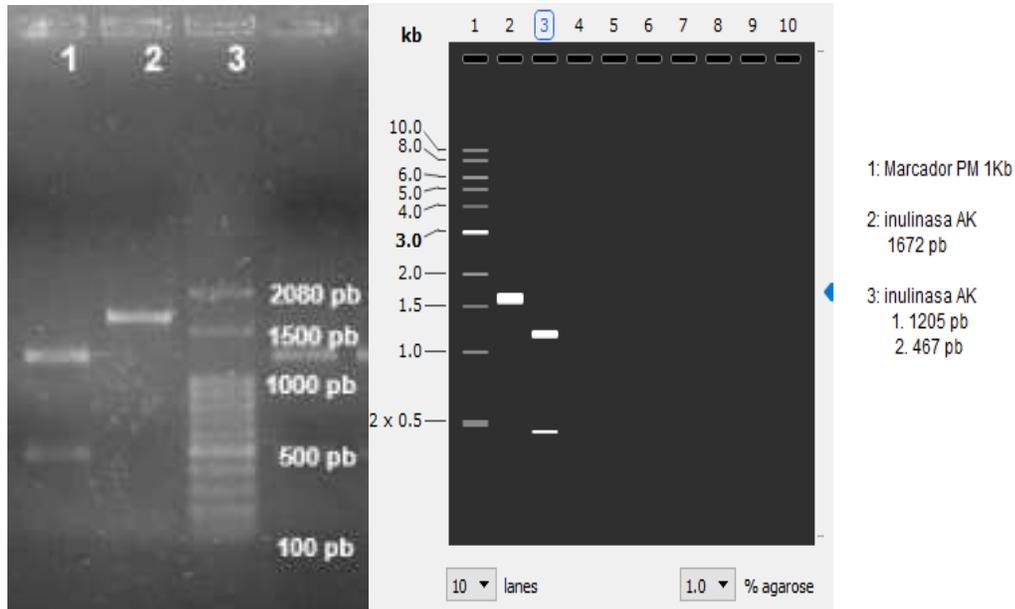


Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de la digestión del gen inulinasa con la enzima *BsrDI* y gel simulado con el programa Snapgene

Calle 1: gen inulinasa digerido con la enzima *BsrDI*, calle 2: gen inulinasa sin digerir, calle 3: marcador de peso molecular.

Como puede observarse en la figura el análisis de restricción del producto de PCR presentó fragmentos de tamaño esperado.

1.2.3. Amplificación del gen inulinasa sin péptido señal

Se realizó la amplificación del gen inulinasa mediante la utilización del *primer* P₃ (*foward*, diseñado específicamente para la eliminación del péptido señal) y el *primer* P₂ (*reverse*).

Posteriormente se estudió la optimización de las condiciones de PCR por medio de la evaluación de un gradiente de temperatura de *annealing* (55, 57, 59, 61, 63, 65 y 67 °C) y prueba de sensibilidad con 5 y 20 ng de ADN genómico de *Aspergillus kawachii* IFO 4308, con el fin de obtener bandas definidas y reproducibles en los productos de PCR.

El resultado se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. Los resultados se muestran en la figura 39.

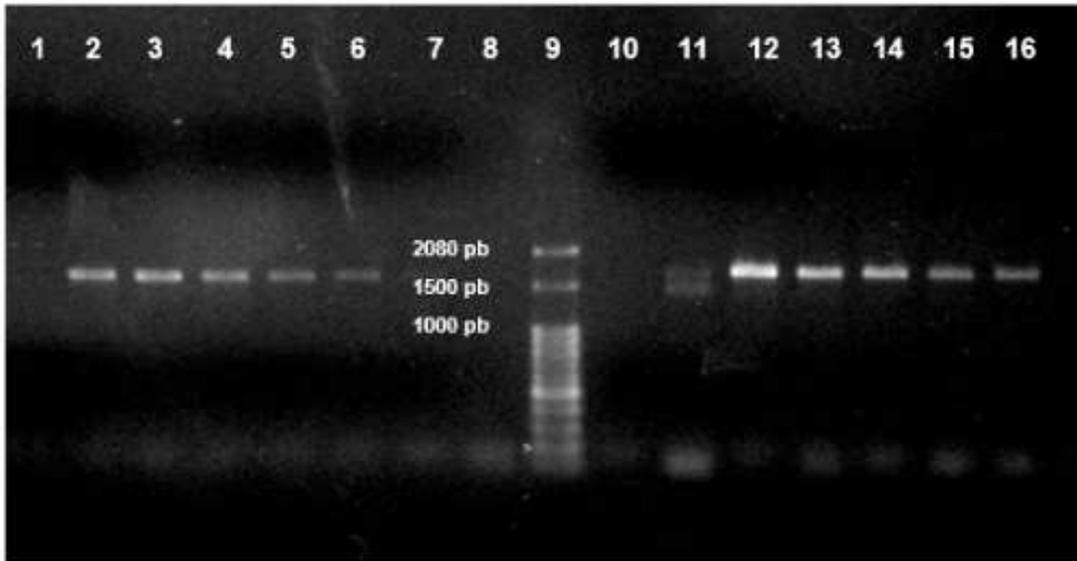


Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa 1 % a diferentes condiciones de temperatura de apareamiento y concentración de ADN genómico.

Calle 1: control negativo (mezcla de reacción sin molde) , calle 2 a 8: 5 ng de ADN y calle 10 a 16: 20 ng de ADN calle 2: 55 °C, calle 3: 57 °C, calle 4: 59 °C, calle 5: 61 °C, calle 6: 63 °C, calle 7: 65 °C, calle 8: 67 °C, calle 9: marcador de peso molecular, calle 10: 55 °C, calle 11: 57 °C, calle 12: 59 °C, calle 13: 61 °C, calle 14: 63 °C, calle 15: 65 °C, calle 16: 67 °C.

La mejor condición de amplificación se logró con una temperatura de 59 °C y 20 ng de ADN, que corresponde a la calle 12, ya que no presentó amplificación de ADN inespecífico.

1.2.4. Clonado del gen inulinasa con intrón en el vector de expresión pPIC9

Se realizó la digestión, tanto del plásmido como del producto de PCR, con las enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII*. En la figura 40 se muestra la estrategia utilizada a partir del gen inulinasa con intrón clonado en pPIC9 y la generación del plásmido recombinante pPIC9: inuAKÄPS.

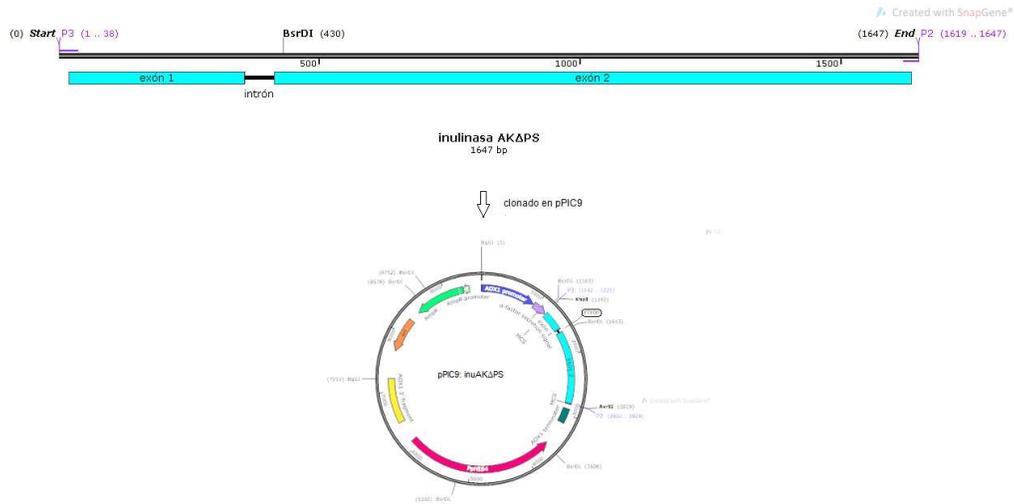


Figura 40. Esquema de clonado del gen inulinasa amplificado con los primers P3 y P2 en pPIC9 generando el plásmido pPIC9: inuAKΔPS

Para confirmar la digestión del plásmido se realizó una electroforesis en gel de agarosa, cuyo resultado se observa en la figura 41.



Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de los productos de digestión del plásmido pPIC9 y del gen de inulinasa con las enzimas XhoI y AvrII.

Calle 1: plásmido sin digerir, calle 2: plásmido digerido con las enzimas XhoI y AvrII, calle 3: marcador de peso molecular, calle 4: producto de PCR del gen inulinasa digerido con las enzimas XhoI y AvrII, calle 5: producto de PCR del gen inulinasa sin digerir.

En la calle 1 se visualizó el ADN plasmídico en las formas de superenrollado y lineal. En la calle 2, luego de la digestión, se observó una banda que corresponde a ADN lineal que confirma la acción de las enzimas de restricción XhoI y AvrII. En las calles 4 y 5 se observó una sola banda que corresponde al gen inulinasa sin digerir y digerido.

Luego de la digestión se ligó el gen de inulinasa, de manera orientada, al vector pPIC9. Se probaron tres relaciones de ligación vector: inserto 1:0, 1:1 y 1:5. Con el producto de la ligación Ppic9: inuAKΔPS se transformaron células competentes de la cepa *E. coli* DH5α F'.

A los efectos de realizar un *screening* sobre los clones obtenidos, se seleccionaron 16 colonias (relación vector: inserto 1:1) resistentes a ampicilina desarrolladas en medio LB, se les extrajo el ADN plasmídico mediante *Miniprep*, y se llevó a cabo una PCR con los *primers* P₁ y P₂, específicos para el gen inulinasa.

La figura 42 muestra el resultado de la electroforesis correspondiente a este ensayo.

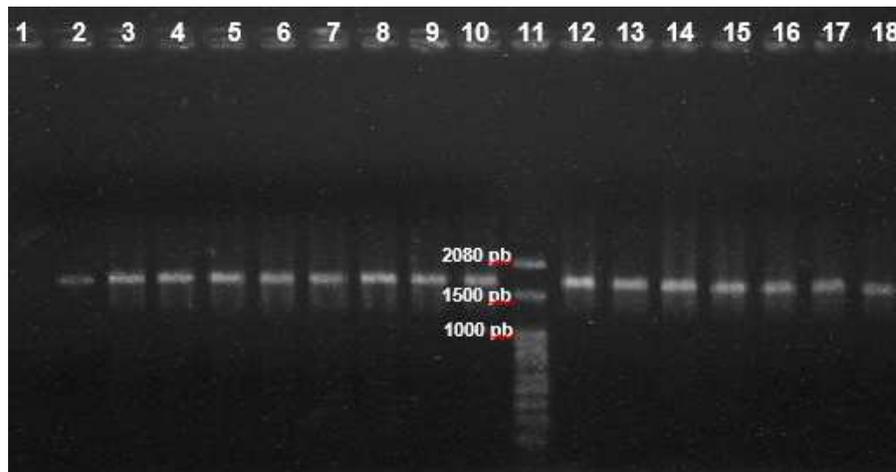


Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de los productos de amplificación del gen inulinasa en 16 clones de *E. coli* pPIC9: inuAKΔPS

Calle 1: control negativo (*E. coli* sin transformar), calle 2: control positivo (amplificación del gen a partir del ADN genómico), calle 3: clon 1, calle 4: clon 2, calle 5: clon 3, calle 6: clon 4, calle 7: clon 5, calle 8: clon 6, calle 9: clon 7, calle 10: clon 8, calle 11: clon 9, calle 12: clon 10, calle 13: clon 11, calle 14: clon 12, calle 15: clon 13, calle 16: clon 14, calle 17: clon 15, calle 18: clon 16.

Se consiguió amplificar un gen de aproximadamente 1600 pb en todos los clones como se visualiza en la imagen.

Se seleccionaron los clones *E. coli* pPIC9: inuAKΔPS 4, 5, 8, 10 y 12 y se secuenciaron para corroborar que presentaban un marco de lectura correcto y poder analizar posibles mutaciones ya que la polimerasa utilizada para la amplificación no presenta la función correctora de errores. Para esto cada uno de los genes de los clones se alinearon con la secuencia de la inulinasa de

Aspergillus awamori utilizando el programa *Clone Manager* versión 9.5.1 (Sci-Ed software).

Se comprobó que todos los clones presentaron la secuencia del gen de interés en marco con la secuencia del péptido señal α de *S. cerevisiae* y también que presentaban mutaciones puntuales, sin embargo, el clon 10 (*E. coli* pPIC9: inuAK Δ PS) mostró una única mutación puntual silenciosa, es decir que no causa ningún cambio en el aminoácido que codifica el codón afectado.

En apéndice 1, se muestra el resultado del alineamiento entre la secuencia del gen que codifica para la inulinasa de *Aspergillus awamori* (inu1) y el gen presente en el clon 10 *E. coli* pPIC9: inuAK Δ PS.

A partir de este análisis se encontró que todos los clones presentaban un fragmento adicional de 58 pb que se correspondía con el intrón de la inulinasa de *Aspergillus awamori*. A partir de estos resultados se seleccionó este clon para continuar los estudios siguientes.

Se presumió que la levadura podría realizar el empalme correspondiente durante la expresión del gen y que se obtendría el ARNm maduro permitiendo la traducción de la enzima activa, por esta razón se decidió continuar con los procedimientos necesarios para clonar el gen de interés en *Pichia pastoris*.

El plásmido se linealizó mediante la digestión con la enzima de restricción *Bgl*/II para transformarlo en células de *Pichia pastoris* GS115 (His⁻, Mut⁺). Al realizar la digestión con esta enzima el evento de integración en el genoma de *Pichia pastoris* ocurrió por reemplazo del locus *AOX1* por el gen inulinasa y el gen *his4* permitiendo la selección de las células transformantes por su habilidad de crecer en medios sin histidina, como se muestra en la figura 43.

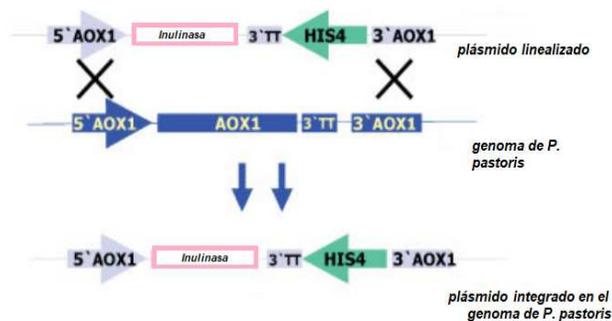


Figura 43. Esquema de integración del plásmido linealizado en el genoma de *Pichia pastoris*

Las células transformadas fueron capaces de crecer en medio mínimo sin histidina. Se seleccionaron cinco clones que se numeran del 1 al 5 (*Pichia pastoris* Ppic9: inuAK Δ PS) y se evaluó la presencia del gen en el genoma de esta levadura mediante *colony*-PCR. Los resultados obtenidos de la electroforesis en gel de agarosa se muestran en la figura 44.

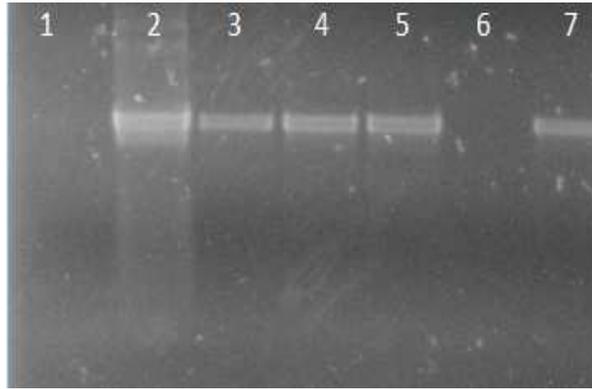


Figura 44. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por *colony*-PCR de los clones de *Pichia pastoris* Ppic9: inuAK Δ PS

Calle 1: Control negativo de PCR, Calle 2: control positivo de PCR (clon 10 *E. coli* Ppic9: inuAK Δ PS), Calle 3: clon 1, Calle 4: clon 2, Calle 5: clon 3, Calle 6: clon 4, Calle 7: clon 5

Como puede observarse 4 de los 5 clones de estudiados presentaron el gen inulinasa ya que se observa una banda de igual PM que el control positivo de PCR. Estos clones se cultivaron en medio BMGY hasta obtener una cantidad de biomasa suficiente ($DO_{600\text{ nm}} = 16$) y luego se indujeron con metanol. Se tomaron muestras a las 24 h y a las 48 h luego de la inducción.

A los sobrenadantes de las muestras se les determinó actividad inulinasa. En ninguno de los 4 clones se detectó esta actividad de forma significativa al compararla con la inulinasa silvestre. Se determinó la expresión de la inulinasa mediante un *SDS-PAGE*. Se utilizó como control negativo *Pichia pastoris* sin transformar, para corroborar que la misma no presenta actividad inulinasa. Se comprobó la expresión de la inulinasa mediante un *SDS-PAGE*. Los resultados se muestran en la Figura 45.

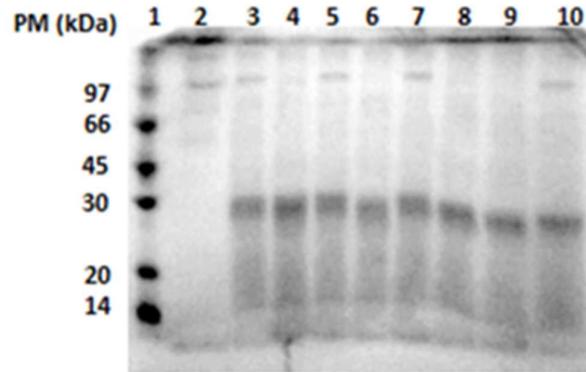


Figura 45. SDS- PAGE de las proteínas producidas por cada uno de los clones de *Pichia pastoris* Ppic9: *inuAKΔPS* a las 24 y 48 hs de cultivo respectivamente

Calle 1: Marcador PM, Calle 2: control negativo (*Pichia pastoris* GS115 sin transformar), Calle 3: clon 1 t= 24 h, Calle 4: clon 1 t= 48 h, Calle 5: clon 2 t= 24 h, Calle 6: clon 2 t= 48 h, Calle 7: clon 3 t= 24 h, Calle 8: clon 3 t= 48 h, Calle 9: clon 5 t= 24 h, Calle 10: clon 5 t= 48 h.

Se observó la expresión de una proteína con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, que no corresponde con el tamaño teórico esperado de la inulinasa de 59,6 kDa. Para identificarla se envió al Instituto Pasteur de Montevideo para ser analizada mediante espectrometría de masas por mapeo peptídico (*MALDI TOF-TOF*). Los resultados se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Identificación por espectrometría de masa de las proteínas producidas por los clones de *Pichia pastoris* Ppic9: *inuAKΔPS*

Rotulo de la muestra	Masa mol. en el gel (kDa)	Proteína identificada por EM	Masa mol. teórica (kDa)
Clon 1	37	"Exo-Inulinase From <i>Aspergillus awamori</i> "	57
Clon 2	37	"Exo-Inulinase From <i>Aspergillus awamori</i> "	57
Clon 3	32	"Exo-Inulinase From <i>Aspergillus awamori</i> "	57
Clon 5	34	"Exo-Inulinase From <i>Aspergillus awamori</i> "	57

Los informes de los resultados obtenidos se muestran en el Apéndice 2.

Estos resultados indicaron la obtención de una exo proteína y, que si bien se identificó con alto porcentaje de similitud con la exoinulinasa de *Aspergillus awamori* no presentó actividad catalítica. Para analizar la posibilidad de contar con un sistema de corte y empalme funcional para la eliminación del intrón se llevó a cabo un análisis bioinformático en el cual se evaluó la presencia de sitios donadores y aceptores necesarios para realizar el corte y empalme en el gen inulinasa de *Pichia pastoris*. Los resultados se muestran en la Tabla 20 y 21.

Tabla 20. Análisis bioinformático de corte y empalme en *Aspergillus spp.*

ID inulinasa 1671 pb cadena directa			
Organismo <i>Aspergillus spp.</i>			
CC cadena directa, Señales de empalme potencial			
SITIOS DONADORES			
POSICION	EXON	INTRON	PUNTUACION
1007	GCA	GTATGG	72
SITIOS ACEPTORES			
POSICION	EXON	INTRON	PUNTUACION
70	CCTT	TATGACCAG	85
103	AAGA	TCACCCCAG	81.
420	CATG	CATTTCTAG	82
438	TAGC	CACTAACAG	78
441	CATC	TAACAGTAG	80
509	TCCA	CAATCACAG	83
523	TCTT	CGCCTACAG	81
570	TCAT	CCAATCCAG	79.
589	CCCT	CCCTCCCAG	83
600	CTGA	CTTATGAAG	77
611	AACT	GAATACCAG	80
653	AAAT	GAATCCCAG	82
723	ACTG	ACCTCAAAG	78
731	CTAG	GACTGGAAG	78
735	TGAG	GGAAGCTAG	77
765	GCGG	ACGCGCAAG	77
811	CGGA	CCTTGACAG	80
867	GCAC	GTCCCCCAG	79
942	TGTA	CCGACACAG	77
951	GAAA	TGTACCCAG	83
1144	CAA	CGTTGGCAG	80
1002	CTGG	ATGCCGCAG	79
1064	TATG	AACTGGCAG	78
1099	CGCC	CTGGCGCAG	81
1133	ACCG	GCCCTAAAG	77
1158	TCCA	CAACCCTAG	83
1163	CAAC	CTAGTCCAG	81
1172	GAAG	CAACCCCAG	81
1226	ACTC	ACATTCAAG	80
1239	GCTC	TCTCTGAAG	79
1307	GCCT	AAGTCTAAG	80
1358	ACCC	ACCGAGCAG	80
1513	GTCC	CGTCGATAG	84
1519	CGTC	TAGGTCCAG	78
1565	ATTT	ACGGCTCAG	80
1649	ATTG	ATCTACAAG	79

Tabla 21. Análisis bioinformático de corte y empalme en levaduras

ID inulinasa hebra directa	
Organismo: levadura	
CC cadena directa, Señales de empalme potencial	
SITIOS DONADORES	
SITIOS DONADORES NO SE ENCONTRARON	
SITIOS ACEPTORES	
SITIOS ACEPTORES NO SE ENCONTRARON	

Los resultados revelaron que el género *Aspergillus* spp. es capaz de reconocer sitios donadores y aceptores dentro del gen indicando un solo sitio donador y 36 sitios receptores. En cuanto a las levaduras puede observarse que no presentan estos sitios de reconocimiento, esta información permite explicar por qué *Pichia pastoris* no pudo expresar la inulinasa activa debido a que no fue capaz de realizar el corte y empalme de forma correcta.

No se encontró en la bibliografía investigaciones sobre la expresión de inulinasas fúngicas a partir de ADN genómico con intrones incorporados, pero si se han reportado estudios como los de Goosen *et al.* (2008) que lograron la expresión de una exoinulinasa de *Aspergillus niger* N 402 en *E. coli* desde una biblioteca de ADNc a partir de ARN total obtenido del micelio del hongo. Estos autores describieron la presencia de un único intrón de 59 pb cuando compararon la secuencia nucleotídica del ADNc con la secuencia genómica; Chen *et al.* (2013) sobreexpresaron una exoinulinasa con actividad catalítica de *Aspergillus ficuum* también en *E. coli* y a partir de ADN genómico pero realizando la eliminación del intrón in vitro; Wang *et al.* (2011) reportaron el clonado de una exoinulinasa de *Penicillium janthinellum* B01 y la sobreexpresión en *Pichia pastoris* e indicaron la presencia de un ORF de 2115 pb interrumpido por un intrón de 67 pb, a partir de ADNc.

Estos reportes nos indujeron a plantear la estrategia de clonado eliminando el intrón de manera in vitro.

1.2.5. Clonado del gen inulinasa sin intrón en pPICZa A

Debido a que *Pichia pastoris* no fue capaz de procesar el intrón de 58 pb, se procedió a la eliminación in vitro utilizando enzimas de restricción. La obtención del gen inulinasa sin intrón fue llevada a cabo por medio de la generación del primer exón por un lado y del segundo exón unido al plásmido por otro. La figura 46 esquematiza el clonado del exón I en el vector pGEM[®]-T Easy.

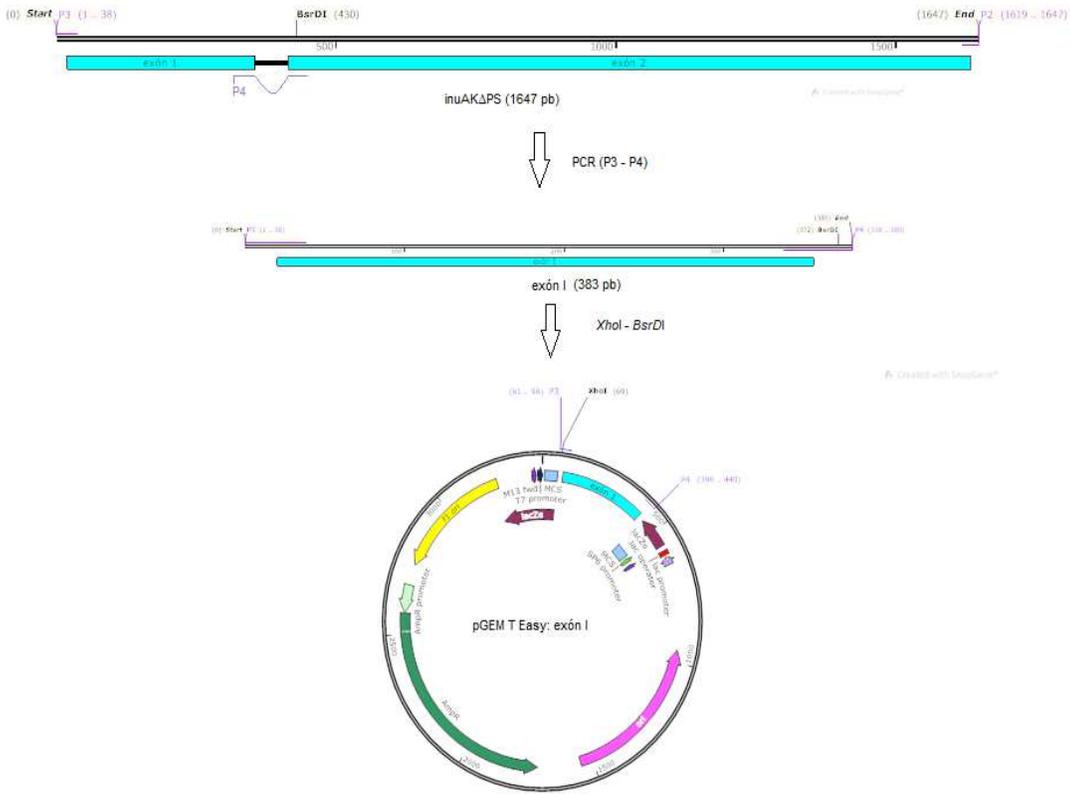


Figura 46. Esquema de clonado del exón I amplificado con los primers P3 y P4 en pGEM[®]-T Easy generando el plásmido pGEM[®]-T Easy: exón I

Para obtener el exón I, se realizó una reacción de PCR utilizando la construcción pPIC9: inuAKΔPS como molde y los *primers* P₃ (para eliminar el péptido señal) y P₄, *primer* interno que contiene una secuencia apareable con el extremo 3' del exón I, seguida de otra, también apareable con el extremo 5' del exón II de manera de dejar sin aparear la secuencia del intrón. El producto de PCR obtenido, de 383 pb, se ligó al vector pGEM[®]-T Easy. Se transformaron células de *E. coli* TOP10F' con el plásmido recombinante pGEM[®]-T Easy: exón I (3395 pb).

Se seleccionaron los clones positivos, los que poseían la construcción pGEM[®]-T Easy- exón I, que se visualizaron como colonias blancas en el medio LB con agregado de X-gal. Se seleccionaron 10 colonias al azar y se realizó una *colony*-PCR utilizando los *primers* P₃ y P₄ para confirmar la presencia del fragmento de interés. En la figura 47 se muestran los resultados de la electroforesis en gel de agarosa 1 %.

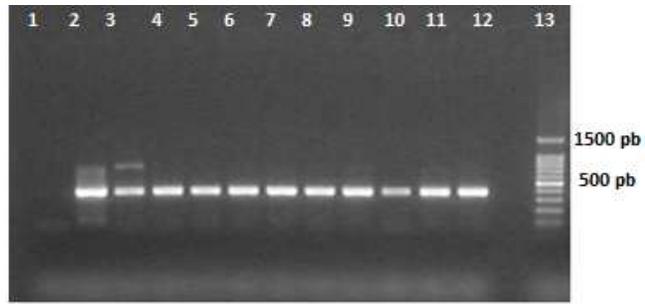


Figura 47. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos obtenidos por colony-PCR de los clones *E. coli* pGEM®-T Easy: exón I, utilizando los primers P2 y P4

Calle 1: Control negativo de PCR, Calle 2: control positivo de PCR (clon 10 *E. coli* Ppic9: inuAKΔPS), Calle 3: clon 1, Calle 4: clon 2, Calle 5: clon 3, Calle 6: clon 4, Calle 7: clon 5, Calle 8: clon 6, Calle 9: clon 7, Calle 10: clon 8, Calle 11: clon 9, Calle 12: clon 10, Calle 13: Patrón de PM

Se observó la presencia del mismo en todos los clones *E. coli*: pGEM®-T Easy: exón I, analizados.

Luego, los vectores recombinantes aislados de los transformantes positivos se digirieron con las endonucleasas *Xho*I y *Bsr*DI, generándose cuatro fragmentos de 1439 pb (*Bsr*DI-*Xho*I), 1419 pb (*Bsr*DI- *Bsr*DI), 363 pb (*Xho*I-*Bsr*DI) y 174 pb (*Bsr*DI- *Bsr*DI) que se visualizaron en un gel de agarosa 1,5 %. Se extrajo del gel la banda de 363 pb que corresponde al exón I del gen inulina de *Aspergillus kawachii*. El resultado de la electroforesis se muestra en la figura 48.

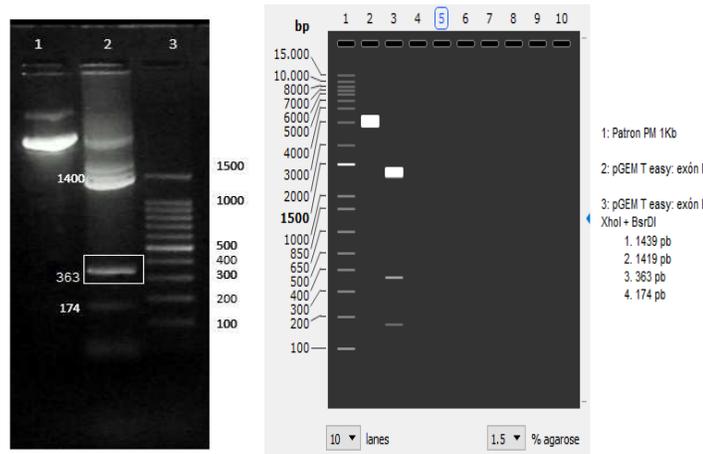


Figura 48. Electroforesis en gel de agarosa 1,5 % (A) de la digestión de la construcción pGEM®-T Easy: exón I y gel simulado con el programa Snappene

Calle 1: pGEM®-T Easy: exón I; Calle 2: pGEM®-T Easy: exón I digerido con *Xho*I y *Bsr*DI; Calle 3: estándar de peso molecular de ADN.

La figura 49 corresponde al esquema del clonado de los exones I y II en pPICZαA.

Para obtener el exón II, el plásmido recombinante pPIC9: inuAKΔPS se digirió con las endonucleasas *BsrDI* y *NotI*. Se generaron siete fragmentos de 3386 pb (*BsrDI* - *BsrDI*), 2025 pb (*BsrDI* - *BsrDI*), 1584 pb (*BsrDI* - *BsrDI*), 1213 pb (*BsrDI*- *NotI*), 782 pb (*NotI*-*BsrDI*), 335 pb (*BsrDI* - *BsrDI*) y 174 pb (*BsrDI* - *BsrDI*) que se visualizaron en un gel de agarosa. Se extrajo, del gel, la banda de 1213 pb que corresponde al exón II. En la figura 50 se muestra el resultado de la electroforesis.

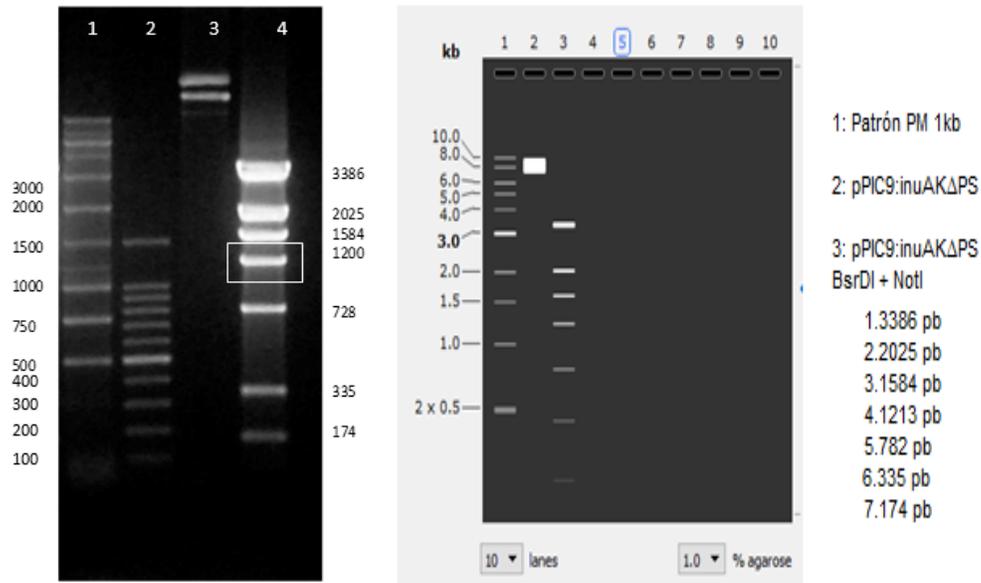


Figura 50. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la digestión de la construcción pPIC9: inuAKΔPS con las enzimas *BsrDI* y *NotI*

Calle 1: Patrón de peso molecular de ADN; Calle 2: Patrón de peso molecular de ADN; Calle 3: pPIC9: inuAKΔPS; Calle 4: pPIC9: inuAKΔPS digerida con *BsrDI* y *NotI*.

Ambos fragmentos (exones I y II) se ligaron al vector pPICZaA (previamente digerido con las endonucleasas *XhoI* y *NotI*), generándose el plásmido pPICZaA: inuAkΔI que se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* TOP10F'. Se evaluó la presencia del gen sin intrón en cinco clones mediante *colony*-PCR, utilizando los *primers* P₃ y P₂. La confirmación se visualizó en gel de agarosa 1 % (p/v) como se muestra en la figura 51. Se observó la presencia del gen en todos los clones.

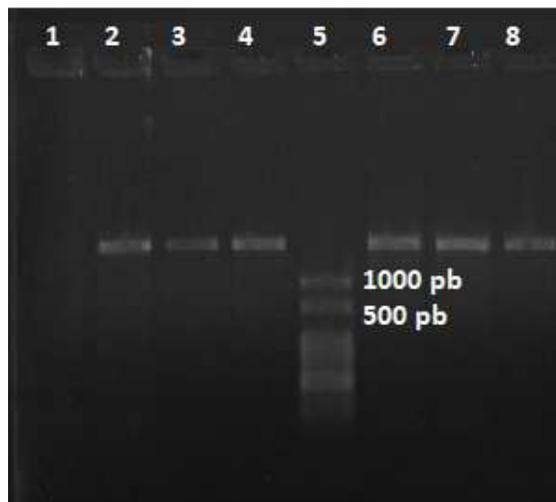


Figura 51. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de productos de Colony PCR de clones de *E. coli* TOP 10F': pPICZαA: inuAKΔPSΔI

Calle 1: control negativo, calle 2: control positivo (pPIC9 inuAKΔPS), calle 3: clon 1, calle 4: clon 2, calle 5: marcador de PM, calle 6: clon 3, calle 7: clon 4, calle 8: clon 5

1.2.6 Transformación de *Pichia pastoris* con el gen inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308

Los plásmidos pPICZαA: inuAKΔPSΔI y pPIC9 se linealizaron mediante la enzima de restricción *Bgl*II. Posteriormente se transfirieron, por electroporación, en *Pichia pastoris* utilizándose los dos plásmidos en la cepa GS115 (para revertir la auxotrofia a histidina), y solo el que contiene el gen inulinasa en la cepa X-33.

Las cepas transformadas se cultivaron en placas de YPD conteniendo 100 mg/ml de zeocina para la selección. A las colonias obtenidas se les realizó una *colony*-PCR utilizando los *primers* P₃ y P₂ a fin de evidenciar la presencia del gen inulinasa. Dicho procedimiento se aplicó a las 18 colonias aisladas y obtenidas luego de la transformación de *Pichia pastoris* GS115 y a las 25 colonias de *Pichia pastoris* X-33. Como control negativo se utilizaron células de *Pichia pastoris* transformadas con el plásmido vacío y como control positivo se utilizó como molde de PCR el gen inulinasa.

Del total de los clones estudiados por *colony*-PCR solo dos de *Pichia pastoris* GS115 no presentaron el gen inulinasa, como puede verse en la figura 52 donde, a modo de ejemplo, se presentan la imagen de la electroforesis de 4 clones de *Pichia pastoris* GS115 y 4 clones de *Pichia pastoris* X-33.

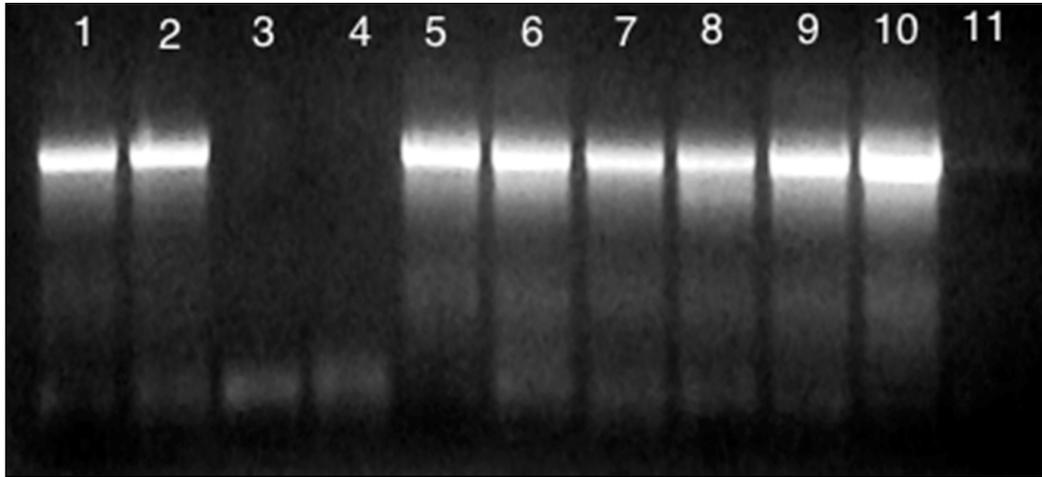


Figura 52. Colony-PCR de *Pichia pastoris* conteniendo el gen de Inulinasa de *Aspergillus kawachii*.

Calles: 1-4: Clones (*Pichia pastoris* GS115) 1; 3; 4; 5. Calles 5-9: Clones (*Pichia pastoris* X-33) A, B; C; D y E.; Calles 10: Control positivo (pPICZαA: inuAKΔPSΔI); Calle 11: Control negativo

Pudo visualizarse una banda del mismo tamaño que el control positivo que indicó la presencia del gen inulinasa, a excepción de los clones 3 y 4 donde no se observa la banda correspondiente al gen de la enzima.

1.2.7. Selección del clon

Existen varias cepas de *Pichia pastoris* disponibles en el mercado para obtener proteínas recombinantes. La expresión de estas proteínas puede variar entre diferentes cepas. Tanto GS115 (His⁻, Mut⁺) como X-33 (sin mutaciones) se han utilizado con éxito para expresar enzimas biológicamente activas (Zhang *et al.*, 2003, Blanchard *et al.*, 2008; Zhou *et al.* 2020).

En este trabajo de tesis se estudió la producción de la enzima inulinasa de *Aspergillus kawachii* expresada en *Pichia pastoris* GS115 y X-33 en cultivos que se realizaron en dos etapas: la primera de incremento de biomasa sin producción de inulinasa utilizando los medios de cultivo medios YPD y BMGY y la segunda, de producción de la enzima en el medio BMMY.

En la tabla 22 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 22. Evaluación de la producción de inulinasa recombinante en matraces Erlenmeyer a las 48 h de inducción

	Clones	Actividad enzimática (U/ml)
Clones de la cepa <i>Pichia pastoris</i> GS115	1	ND
	2	ND
	3	ND
	4	ND
	5	ND
	6	ND
	7	ND
	8	ND
	9	1,85 ± 0,6 ^d
	10	2,81 ± 0,8 ^e
	11	0,49 ± 0,3 ^a
	12	1,73 ± 0,5 ^{cd}
	13	ND
	Control negativo	ND
Clones de la cepa <i>Pichia pastoris</i> X-33	A	3,10 ± 0,2 ^f
	B	1,54 ± 0,1 ^{bc}
	C	1,46 ± 0,3 ^b
	D	1,81 ± 0,3 ^d
	E	14,65 ± 0,1 ^m
	F	9,33 ± 0,2 ⁱ
	G	ND
	H	14,26 ± 0,1 ^l
	I	6,64 ± 0,2 ^h
	J	3,78 ± 0,3 ^g
	K	0,33 ± 0,6 ^a
	L	10,05 ± 0,4 ^j
	M	13,36 ± 0,8 ^k
	Control negativo	ND

Los clones de la cepa *Pichia pastoris* GS115 se diferenciaron con números del 1 al 13 y los de la cepa *Pichia pastoris* X-33 por letras desde A hasta M.

Control negativo: cepa de *Pichia pastoris* con plásmidos vacíos

ND: no detectable

Letras con una media común no son significativamente diferentes $p < 0,05$

En este estudio, se utilizaron, como control negativo de la expresión, las células de *Pichia pastoris* transformadas con el plásmido vacío. Se estudiaron trece transformantes de cada cepa.

Se tomaron muestras a las 0, 24 y 48 horas del comienzo de la inducción y para cada clon se determinó la actividad de inulinasa en el sobrenadante a las 48 h de inducción.

Los resultados indicaron que 4 de los 13 transformantes de *Pichia pastoris* GS115 exhibieron actividad enzimática, no se detectó para los clones 1 a 8 y 13

a pesar de la transformación confirmada del gen inulinasa. Doce de 13 clones de la cepa *Pichia pastoris* X-33 exhibieron actividad. El clon E presentó la mayor actividad $14,62 \pm 0,1$ U/ml después de 48 h, que es 150 veces más alta que la del microorganismo silvestre, que produjo una actividad máxima de $92,3 \pm 0,5$ mU/ml en escala de *Erlenmeyer*. La productividad alcanzada por este clon fue de 304 mU/ml, aumentando más de 200 veces con respecto al microorganismo silvestre que fue de 1,28 mU/h.

Este resultado resultó promisorio, ya que, si bien se encuentran reportadas inulinasas recombinantes ninguna presenta una relación tan elevada respecto al microorganismo silvestre. Por ejemplo, en un estudio de Zhang *et al.* (2003) encontraron que la inulinasa de *Aspergillus niger* expresada en *Pichia pastoris* GS115 presentó un aumento de 13 veces con respecto a la actividad enzimática de la cepa silvestre en las mismas condiciones.

Debido a la elevada actividad encontrada en ensayos en matraces *Erlenmeyer* se seleccionó el clon E de *Pichia pastoris* X-33 para continuar los estudios de producción en biorreactor.

Conclusiones del capítulo

Se realizaron tres estrategias de clonado, una a partir de ARN mensajero y dos a partir de ADN genómico.

No se logró obtener el gen codificante para la enzima inulinasa a partir de ARN mensajero posiblemente debido a la baja expresión enzimática en *Aspergillus kawachii*. Por este motivo se continuó con la segunda estrategia de clonado a partir de ADN. Se logró obtener un gen de aproximadamente 1600 pb.

El gen de inulinasa se insertó en el plásmido pPIC9 y se secuenció, encontrándose un intrón de 58 pb. A partir de estos resultados se decidió clonar el gen inulinasa en *Pichia pastoris* suponiendo que esta levadura sería capaz de realizar el *splicing* para obtener la proteína madura debido a la cercanía filogenética entre estos dos microorganismos. Como esta estrategia no generó los resultados esperados se realizó la eliminación del intrón in vitro mediante cortes con enzimas de restricción.

Una vez obtenido el gen codificante para inulinasa se clonó en cepas de *Pichia pastoris* G115 y X-33 logrando la expresión de la enzima. Se seleccionaron

los clones de mayor actividad enzimática que presentaron un incremento de 150 veces más actividad inulinasa y 200 veces más la productividad en cultivos en matraces *Erlenmeyers* con respecto a la cepa de *Aspergillus kawachii* silvestre.

Se seleccionó uno de estos clones para continuar con los estudios de producción enzimática en biorreactor y estudiar las aplicaciones de la enzima recombinante.

CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE LA INULINASA EN CULTIVOS DE ALTA DENSIDAD, INMOVILIZACION Y POSIBLES APLICACIONES

En los últimos años, las inulinasas han atraído el interés en todo el mundo debido a sus potenciales aplicaciones en procesos industriales tales como la producción de jarabe de alta fructosa, bioetanol, ácido cítrico y la síntesis de FOS.

En el presente trabajo la enzima recombinante se produjo inicialmente en cultivos en matraces *Erlenmeyer*, para luego diseñar fermentaciones de alta densidad celular, a los efectos de llevar a cabo un estudio de la cinética de crecimiento del organismo y la producción de la enzima para obtenerla en escala industrial.

Después de realizar la purificación de la inulinasas recombinante obtenida se estudiaron las condiciones de inmovilización y se determinaron las características bioquímicas y cinéticas de la enzima inmovilizada en esferas de quitosán utilizando glutaraldehído como agente de reticulación bifuncional.

Debido a la demanda en la utilización de estas enzimas y a que en Argentina no hay producción a nivel industrial, se realizaron ensayos de posibles aplicaciones como la capacidad de hidrólisis de inulina, la producción de FOS y la hidrólisis de fructanos de agave.

1. Cultivo en biorreactor

La producción de proteínas recombinantes empleando el sistema de expresión de *Pichia pastoris*, mediante el promotor pAOX1, generalmente se realiza en tres etapas. En primer lugar, se hace un cultivo en sistema batch en medio definido con glicerol como FCE, en el que el crecimiento se desarrolla a velocidad específica máxima, alcanzando altas concentraciones de biomasa en poco tiempo y en el que se reprime la expresión de genes foráneos debido a las altas concentraciones en glicerol.

Luego, comienza la segunda etapa, que consiste en un cultivo batch alimentado en medio con glicerol como sustrato limitante y en presencia de baja concentración de metanol. Esta fase genera una alta densidad celular y permite la desrepresión gradual de las enzimas necesarias para la asimilación de metanol, lo que se traduce en una mejor adaptación para soportar mayores concentraciones del inductor. La estrategia de alimentación utilizando sustratos mixtos de glicerol y metanol, se realiza para aumentar la densidad celular y reducir el tiempo de inducción. Finalmente, en la tercera etapa se continúa con la alimentación, pero con un medio definido conteniendo alta concentración de metanol para inducir la producción de la proteína recombinante (Celik *et al.*, 2009).

En este trabajo, una vez seleccionado el clon que presentó mayor producción de inulinasa, se continuó con los estudios de la producción de enzima recombinante en diferentes sistemas de cultivo, utilizando un biorreactor de 5 litros con 3 litros de medio BSM suplementado con solución de PTM y biotina, a pH inicial 5,0 y con un inóculo de 100 ml de *Pichia pastoris* en medio YPD. Los resultados obtenidos durante el cultivo se muestran el apéndice 3.

El cultivo se realizó en tres etapas, como se explicó anteriormente. La primera consistió en un batch de 29 horas con glicerol como FCE. El crecimiento fue exponencial y alcanzó una velocidad específica máxima de $0,20 \text{ h}^{-1}$ y una biomasa final de 20,02 g/l generando un rendimiento $Y_{x/s} = 0,57 \text{ g biomasa/g sustrato}$. Una vez finalizada la etapa de crecimiento exponencial que se evidenció por el agotamiento de FCE, y el consecuente descenso del consumo de oxígeno, se comenzó la etapa de alimentación con medio definido conteniendo glicerol al 43,5 % v/v, suplementado con 10 ml/l de una solución stock de biotina, 10 ml/l de solución de PTM y 50 ml/l de metanol, a un caudal de alimentación de 40

ml/h. A las 45 horas del cultivo se detuvo la alimentación habiendo alcanzado una biomasa de 63,30 g/l lo que representa un rendimiento $Y_{x/s}$ de 0,56 g biomasa/ g sustrato. Con esta concentración de biomasa en el cultivo se evitó que se produzca limitación por oxígeno en la etapa de inducción ya que, cuando el promotor pAOX está activo, la levadura consume 1 molécula de oxígeno para oxidar una molécula de metanol a formaldehído, además de utilizarlo como aceptor de electrones en la respiración celular (Canales *et al.*, 2015).

Finalmente, se comenzó la etapa de expresión inducida por una alimentación con medio definido y metanol puro a un caudal de 4,80 ml/h. Esta última etapa duró 24 horas y se pudo observar que el crecimiento de la biomasa es prácticamente nulo, con la producción concomitante de la inulinasa recombinante.

Durante todo el cultivo el pH se mantuvo constante en un valor de 5,0 por el agregado continuo de NH_4OH , utilizado como FN. El oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20 % mediante control en cascada con la velocidad de agitación que comenzó en 350 rpm y aumentó hasta 800 rpm al finalizar el cultivo.

Por otra parte, se evaluó el comportamiento del cultivo frente al consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono. Estos resultados se presentan en la figura 53.

Como puede observarse las formas de las curvas correspondientes al consumo de oxígeno ($V_r\text{O}_2$) y generación de dióxido de carbono ($V_r\text{CO}_2$) se comportaron de forma predecible para este sistema de cultivo. Durante la etapa de crecimiento en *batch* el consumo de oxígeno aumentó en forma exponencial llegando a un valor máximo de 0,14 mol O_2/h , luego los valores descendieron al agotarse la FCE (glicerol). Sin embargo, al comenzar con la etapa de alimentación lineal con glicerol, los valores de consumo aumentaron nuevamente, alcanzando un valor de 0,31 mol O_2/h y manteniéndose aproximadamente constante durante toda la etapa. En cuanto a la fase de inducción, debido a que el consumo de metanol se encuentra directamente relacionado con el consumo de oxígeno y generación de la enzima recombinante, se puede observar que el consumo fue entre 0,17 y 0,21 mol O_2/h .

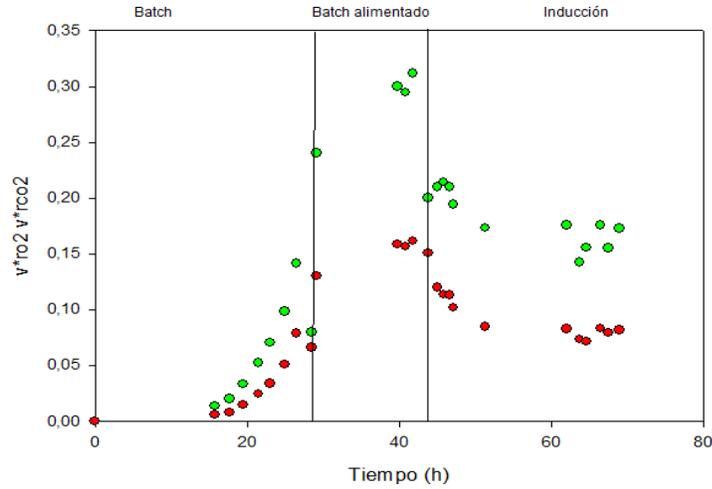


Figura 53. Perfil de consumo de O₂ y generación de CO₂ en función del tiempo del cultivo de *Pichia pastoris* recombinante en biorreactor

(●) V.rO₂ y (●) V.rCO₂

Aunque las formas de las curvas de consumo de O₂ y generación de CO₂ son similares, esta última se mantuvo por debajo de lo esperado. Esto puede deberse a que los valores de CO₂ a la salida del reactor se encontraron subestimados, cercanos al límite de detección del sensor (0 a 4 %).

Para relacionar los demás parámetros medidos se realizó el perfil de fermentación como se muestra en la figura 54.

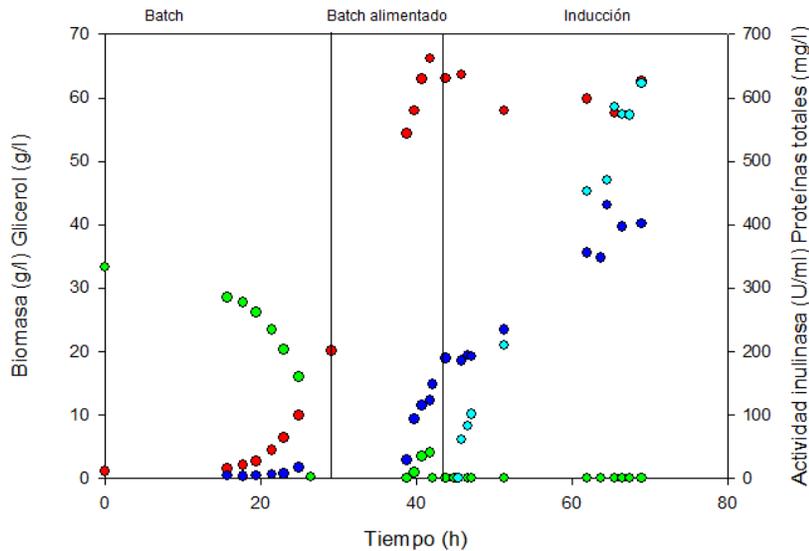


Figura 54. Perfil de fermentación en función del tiempo del cultivo de *Pichia pastoris* recombinante en biorreactor

(●) biomasa, (●) proteínas totales, (●) actividad inulinasa, (●) glicerol

Al evaluar la evolución de la biomasa, medida por peso seco, se pudieron observar tres secciones marcadas: una de crecimiento exponencial (cultivo *batch*), una de crecimiento lineal (cultivo *batch* alimentado limitado en FCE) y otra donde no hubo crecimiento (etapa de inducción de la proteína recombinante).

En cuanto a la producción de proteínas totales, se pudo observar un aumento considerable una vez iniciada la inducción con metanol. Esto se debe a que, en presencia de metanol, se induce la expresión del promotor pAOX1 originando la producción de la enzima recombinante. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se analizaron por *SDS-PAGE*. Los resultados pueden observarse en la figura 55.

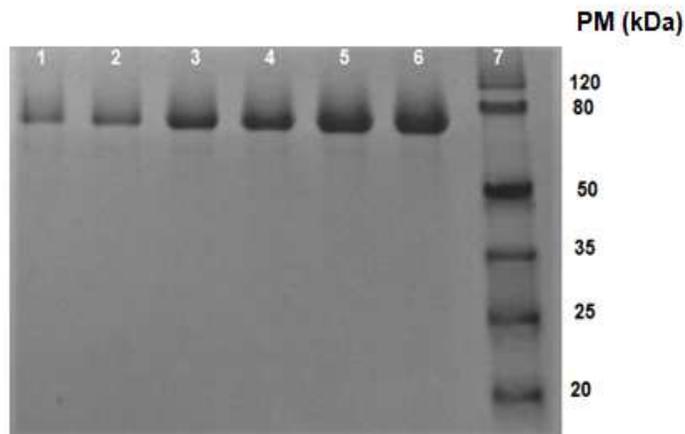


Figura 55. Electroforesis *SDS-PAGE* de la inulinasa recombinante producida por *Pichia pastoris* en biorreactor

Calles 1-6: Muestras tomadas a 0, 5, 10, 13, 16 y 24 h de inducción con metanol. Calle 7: marcador de peso molecular.

Como puede observarse en la figura, en las calles 1 a 6 que corresponden a muestras tomadas a los 0, 5, 10, 13, 16 y 24 h de inducción con metanol se visualizó una banda definida entre 80 y 120 kDa que fue incrementándose a lo largo del tiempo.

El sistema de expresión *Pichia pastoris* no secreta al medio de cultivo considerables cantidades de proteínas endógenas dado que no se visualizaron en el análisis por *SDS-PAGE*.

Como puede verse en el apéndice 3, al final del proceso se logró alcanzar una concentración aproximada de 400 mg/l de proteínas totales en el

sobrenadante. La actividad inulinasa comenzó a ser detectable a partir de la inducción con metanol. Se alcanzó una actividad máxima de 622,4 U/ml a las 24 horas de inducción, momento en que se cosechó el cultivo para la purificación de la enzima y su posterior caracterización.

La actividad enzimática obtenida en biorreactor se muestra en la figura 56.

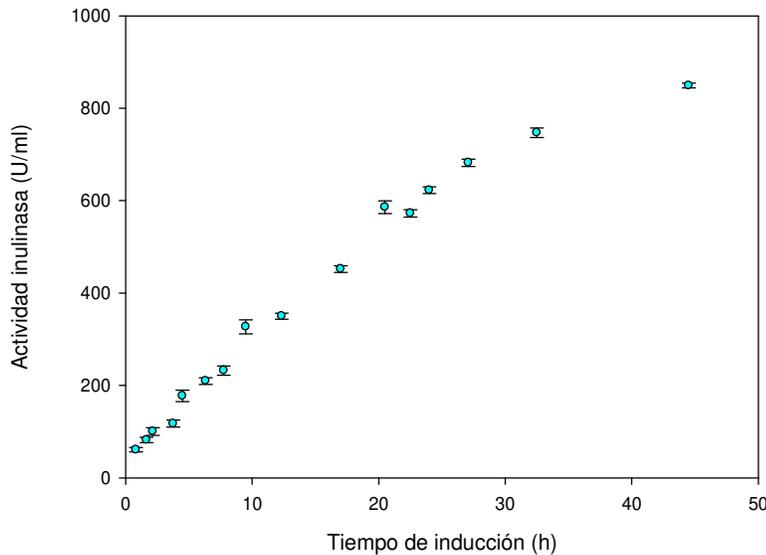


Figura 56. Actividad inulinasa recombinante en función del tiempo de inducción

En este gráfico se observa que la actividad inulinasa aumenta considerablemente hasta las 24 h pero a partir de ahí el incremento de la actividad enzimática resultó menor al 10 % por lo que se decidió recuperar la proteína a las 24 h.

La actividad inulinasa fue 42,5 veces mayor a la obtenida en matraces *Erlenmeyer* (14,65 U/ml), esto se debe a que en el biorreactor se pueden controlar el pH, el oxígeno disuelto y la concentración de metanol en el medio y por ende lograr mayor cantidad de biomasa microbiana. Estos resultados indican que se logró una actividad enzimática 5000 veces mayor que la reportada para el organismo silvestre en biorreactor (0,12 U/ml).

Existen varios reportes sobre la producción de inulinasa recombinante en biorreactor utilizando el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. En la tabla 23 se presentan los informados en los últimos años.

Tabla 23. Ejemplos exitosos de producción de inulinasas recombinantes

Microorganismo	Modo de acción	Sistema de expresión <i>Pichia pastoris</i>	Actividad inulinasa volumétrica (U/ml)	Actividad inulinasa específica (U/mg de proteína)	Productividad (U/l/h)	Referencia bibliográfica
<i>Pichia guilliermondii</i> cepa 1	Exo	X-33	286,0	8873,0	3983,3	Zhang <i>et al.</i> , 2009
<i>Kluyveromyces cicerisporus</i> CBS4857	Exo	<i>P. pastoris</i> X-33	45,2	-	470,8	Ma <i>et al.</i> , 2016
<i>Aspergillus niger</i> DSM 2466	Endo	<i>P. pastoris</i> KM71	858,0	286,0	7150,0	Xu <i>et al.</i> , 2016
<i>Penicillium janthinellum</i> B01	Exo	<i>P. pastoris</i> X-33	272,8	389,7	1894,4	Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus Niger</i> CICIM F0620	Endo	<i>P. pastoris</i> KM71	1349,0	613,2	11241,0	He <i>et al.</i> , 2014
<i>Aspergillus kawachii</i>	Exo	<i>P. pastoris</i> x-33	622,4	1517	25933,3	Este trabajo

Los datos de la última fila corresponden a la inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 producida en *Pichia pastoris* X-33, objeto de estudio de esta tesis doctoral. El cálculo de productividad se realizó en base a tiempo de inducción del cultivo.

Como puede observarse, el valor de actividad enzimática en U/ml para la inulinasa de *Aspergillus kawachii* producida en *Pichia pastoris* X-33 resultó más alto que los valores reportados por los demás autores para exoinulinasas. Sin embargo, los informados para endoenzimas expresadas en *Pichia pastoris* KM71 han sido mayores, pero los autores informaron que utilizaron la técnica de optimización de codones, procedimiento que se utiliza para modificar la secuencia de nucleótidos en el gen diana para replicar los codones que utiliza el sistema de traducción de la célula hospedadora sin que cambien los aminoácidos de la proteína sintetizada.

Si se considera un tiempo de inducción de 24 h la productividad alcanza un valor de 25933,3 de U/l/h, mientras que si se considera un tiempo de 45 h la productividad resulta 18666,6 U/l/h. En base a estos resultados se decidió finalizar el cultivo a las 24 h ya que disminuir el tiempo de cultivo representa una ventaja operacional en la producción de la enzima.

Los resultados obtenidos en este proceso son prometedores para la obtención a escala industrial. Una mayor productividad presenta ventajas para estos procesos ya que se obtiene una mayor producción de enzimas por unidad de volumen del biorreactor y, por lo tanto, un proceso más eficiente y rentable. Además, podrían encararse futuros estudios aplicando optimización de codones, en vistas a obtener mejores resultados de actividad enzimática para esta inulinasa recombinante.

2. Purificación de la inulinasa recombinante

Como material de partida para la purificación de la enzima recombinante obtenida se utilizó el sobrenadante del cultivo en biorreactor con actividad inulinasa de 840 U/ml, pH 5, conductividad de 20.000 μ S/cm y una coloración amarilla que fue disminuyendo durante el proceso de purificación hasta obtenerse una solución translúcida. El volumen utilizado desarrollar este proceso fue de 100 ml.

En el primer paso de purificación se utilizó una resina SP Sepharose FF (intercambio catiónico). Teniendo en cuenta que la enzima silvestre resultó estable a pH ácido se decidió realizar la cromatografía a pH 3, dos unidades por debajo del pI teórico de la proteína. Este paso permitió obtener un rendimiento de 80 % y aumentar 1,3 veces la actividad específica de la inulinasa. Luego se realizó un cambio de buffer para desalinizar la muestra y cambiar el pH a 5 utilizando una columna Sephacryl G25. Posteriormente la fracción proteica con actividad inulinasa se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico fuerte en una columna Q Sepharose HP. En este paso se observó un único pico de absorbancia que presentó actividad enzimática. En la figura 57 se muestra el cromatograma obtenido en esta última cromatografía.

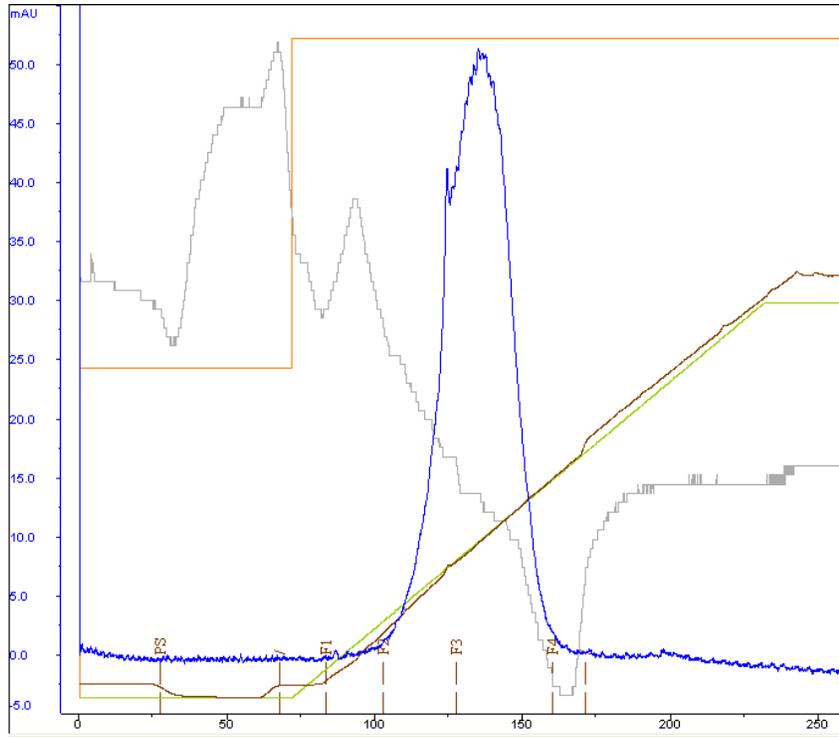


Figura 57. Perfil de elución en resina Q Sepharose HP con gradiente salino

Después de las cromatografías realizadas se calculó el rendimiento alcanzado que fue alrededor del 42 %, mientras que la actividad específica aumentó en 2,2 veces.

En la tabla 24 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 24. Análisis de los pasos implicados en la purificación de la inulinasa recombinante

Pasos de purificación	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo diluido 1/5	500	72,5	84.000	1158	1,0	100
SP						
Sepharose FF	190	44,3	68.040	1535	1,3	81
Sephacryl G25	330	33,0	64.680	1960	1,7	77
Q						
Sepharose HP	60	13,7	35.280	2575	2,2	42

La consideración más importante en el desarrollo de un esquema para purificar una proteína son las aplicaciones que se pretende dar a esa proteína, en este caso si es para uso alimentario, químico o farmacéutico. Las etapas de

purificación son muy costosas por lo que la elección del grado de pureza, en mayor o menor medida, dependerá de los procesos tecnológicos en los que se incorpore la enzima. En este trabajo de tesis se realizaron los pasos de purificación necesarios para la caracterización bioquímica de la enzima recombinante obtenida, considerando su potencial aplicación en la industria alimenticia.

La pureza de la preparación enzimática final se confirmó mediante SDS-PAGE acoplado a un zimograma para detectar la actividad inulinasa, utilizando sacarosa como sustrato. Los resultados de la corrida electroforética se muestran en la figura 58.

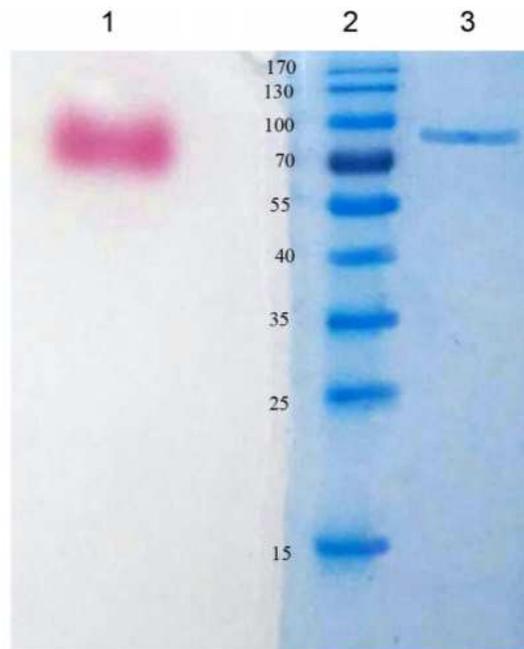


Figura 58. Electroforesis SDS-PAGE de la inulinasa recombinante purificada de *Aspergillus kawachii* producida en *Pichia pastoris*

Calle 1: Zimograma que muestra actividad sacarolítica; Calle 2: estándar de peso molecular expresado en kDa; Calle 3: enzima recombinante purificada.

El SDS-PAGE reveló una única banda homogénea la cual exhibió actividad frente a sacarosa, según puede observarse en la zimografía.

De acuerdo con el análisis por SDS-PAGE, la inulinasa recombinante obtenida presentó un peso molecular de 97 kDa, superior al valor del peso molecular teórico de 59,63 kDa. Esto puede deberse al efecto de la glicosilación, ya que, como se describió anteriormente se encontraron 8 sitios potenciales donde podría ocurrir esta modificación.

Ma *et al.* (2016) también determinaron que el peso molecular de una exoinulinasa de *K. cicerisporus* expresada en *Pichia pastoris* X-33 fue de 90 kDa, 30 kDa más grande que la masa molecular que habían precedido para la enzima. También Zhang *et al.* (2009) determinaron que el peso molecular de una exoinulinasa de *P. guilliermondii* también expresada en *Pichia pastoris* X-33 fue de 57,6 kDa con 10 sitios potenciales de glicosilación, habiendo estimado un peso molecular de 50 kDa para la inulinasa silvestre. Ambos informes sugieren que los mayores pesos moleculares pudieron deberse a modificaciones postraduccionales de la enzima, como la glicosilación.

3. Caracterización de la inulinasa recombinante

La fracción purificada de la proteína recombinante con actividad inulinasa fue analizada por isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida utilizando un gradiente de pH de 3 a 10. Los resultados se muestran en la figura 59.

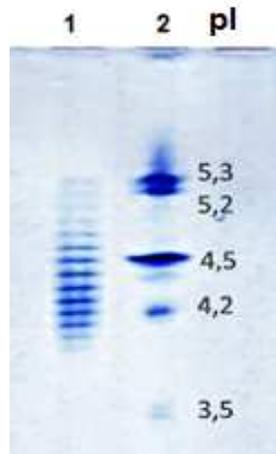


Figura 59. Isoelectroenfoque de la inulinasa recombinante purificada de *Aspergillus kawachii* producida en *Pichia pastoris*

Calle 1: Fracción purificada de la inulinasa recombinante. Calle 2: Marcadores de pI

La fracción purificada de la inulinasa recombinante presentó diferentes isoformas con puntos isoeléctricos entre 4,2 y 5,3, que pueden vincularse con los posibles sitios de glicosilación, como se mencionó anteriormente. Este resultado concuerda con lo reportado por Holyavka *et al.* (2016) quienes informaron que las inulinasas presentan puntos isoeléctricos entre 3,9 a 4,6.

Por otra parte, se determinó la relación sacarosa-invertasa / inulinasa (S / I) ya que es un valor útil para determinar si la glicosilhidrolasa en estudio es una invertasa o una verdadera inulinasa. Se ha establecido que si la relación S

/ I es superior a 100, la enzima en estudio es una invertasa; mientras que, si la relación es inferior a 100, la enzima es una inulinasa. En este estudio la relación S / I resultó $2,0 \pm 0,7$ lo que indica que corresponde a una enzima con actividad inulinasa (Sharma *et al.*, 2002).

También se investigaron las características bioquímicas de la inulinasa recombinante y se comprobó que la enzima presentó un pH óptimo de 3 igual que la enzima silvestre y resultó estable en un rango de pH entre 3 y 9,5 manteniendo un 80 % de su actividad residual, como se observa en las figuras 60 A y B.

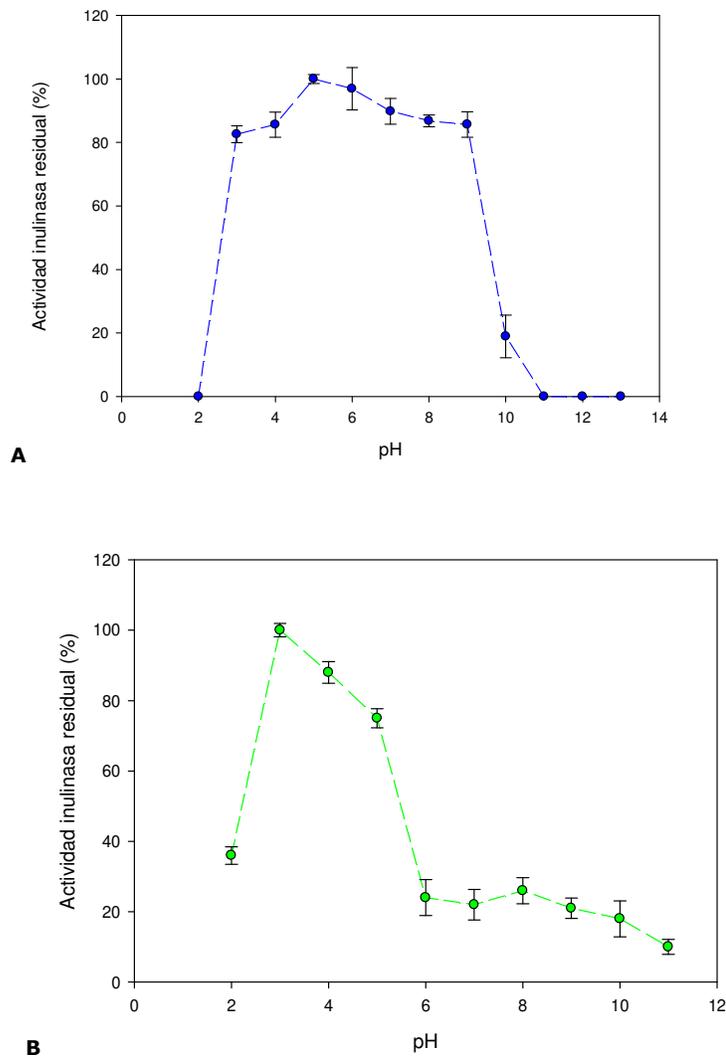


Figura 60. (A) Estabilidad de la inulinasa recombinante purificada de *Aspergillus kawachii* producida en *Pichia pastoris* (B) Influencia del pH en la actividad de la enzima recombinante purificada

En ambos gráficos, las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos

Al comparar el pH óptimo de esta enzima con otras inulinasas fúngicas se pudo comprobar que la mayoría presentan mayor actividad en un rango de pH entre 4,5 y 7,0 (Singh et al., 2017). En cuanto a inulinasas recombinantes se han reportado datos de una enzima de *Pichia guilliermondii* expresada en *Pichia pastoris* X-33 que tiene una actividad máxima a pH 6,0, y fue estable entre valores de pH 6,0-7,0 (Gong et al., 2008 y Zhang et al., 2009); y la inulinasa de *Aspergillus niger* AF10 expresada en *Pichia pastoris* que tuvo un pH óptimo de 4,5 (Zhang et al., 2004). Estos resultados permiten resaltar el potencial de esta inulinasa recombinante para ser utilizada en procesos biotecnológicos a pH ácido, en condiciones en las que se evitaría la contaminación microbiana.

Finalmente, al evaluar la estabilidad de esta inulinasa recombinante frente a la temperatura pudo comprobarse que fue altamente estable a 55 °C, con 70 % de la actividad restante después de una incubación de 3 h a esta temperatura. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 61.

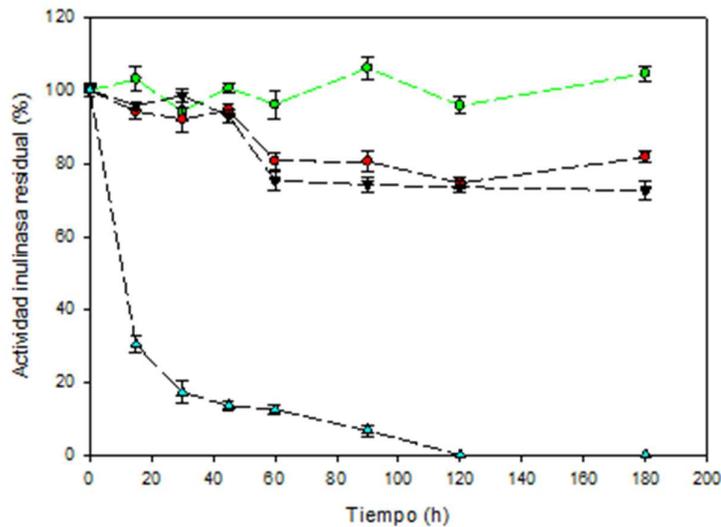


Figura 61. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la inulinasa recombinante purificada de *Aspergillus kawachii* producida en *Pichia pastoris*

(●): 37 °C, (●): 45 °C, (▼): 55 °C, (▲): 65 °C

Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos

A 37, 45 y 55 °C la enzima recombinante no presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) en la actividad inulinasa residual comparada con la inulinasa silvestre. A 65°C la enzima recombinante resultó más lábil que la silvestre, logrando retener sólo el 25 % de su actividad después de 15 minutos

con una vida media de 25,6 minutos y un k_d de $0,027 \pm 0,002$, esto podría deberse a que la enzima estudiada ha sido sometida a un proceso de purificación.

Estas evidencias experimentales en conjunto indican que esta inulinasa recombinante no presentó grandes cambios en sus características bioquímicas con respecto a la inulinasa silvestre. Esto resultó también interesante ya que, según lo reportado por Ma *et al.* (2019) exo-inulinasas expresadas en *Pichia pastoris*, han presentado modificaciones postraduccionales que afectan la N-glicosilación y producen cambios en el plegamiento y la conformación de las proteínas, la expresión secretora, la actividad enzimática y la estabilidad. La glicosilación en diferentes sitios puede conducir a efectos opuestos sobre la actividad enzimática.

En vista del posible efecto de ciertos iones metálicos sobre la actividad de la enzima recombinante, se estudió el efecto de diferentes cationes a igual concentración. La Tabla 25 muestra las actividades residuales obtenidas.

Tabla 25. Efecto de los cationes metálicos a una concentración de 1 mM en la actividad de la inulinasa recombinante de *Aspergillus kawachii*

Metales catiónicos	Actividad residual (%)
Sin cationes	100,02 \pm 3,1 ^{bc}
Ca ²⁺	99,84 \pm 3,8 ^b
Fe ³⁺	86,19 \pm 1,5 ^b
Hg ²⁺	23,35 \pm 1,6 ^a
K ⁺	103,41 \pm 2,2 ^c
Mn ²⁺	105,39 \pm 1,7 ^c
Zn ²⁺	106,06 \pm 0,8 ^c

Los datos se muestran como actividad residual (%) de tres determinaciones con sus respectivos DS. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

La presencia de Zn²⁺; Mn²⁺; y K⁺ aumentó levemente la actividad enzimática, mientras que el Hg²⁺ produjo una notable inactivación, efecto similar al mostrado por la inulinasa silvestre.

Se estudió el comportamiento cinético de la enzima en función de la concentración de inulina. La inulinasa recombinante de *Aspergillus kawachii* mostró la típica cinética de Michaelis-Menten, con los valores K_M y V_{max} con inulina como sustrato, que presentaron valores de 1,35 mM y 2673

$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteínas, respectivamente. Estos valores se determinaron utilizando la transformación Lineweaver-Burk como se muestra en la figura 62.

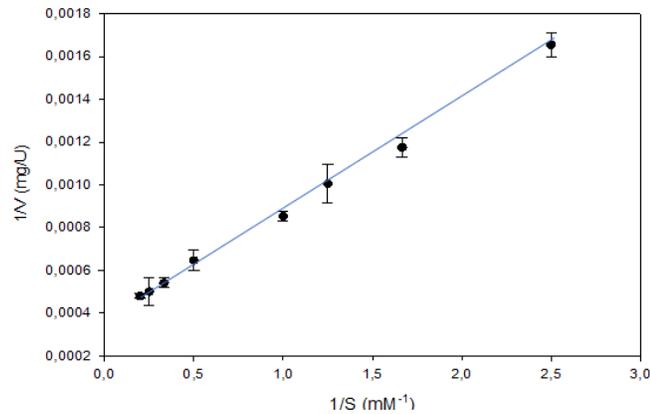


Figura 62. Gráfico de Lineweaver-Burk para estimar los parámetros cinéticos de la inulinasa recombinante usando inulina como sustrato

Las barras de error representan el desvío estándar calculado de tres experimentos.

Las inulinasas han demostrado gran divergencia entre los valores de K_m y V_{max} reportados en la bibliografía. Es posible que la multiplicidad de formas de esta enzima explique estas diferencias, entre ellos se pueden citar: una exoinulinasa de *Kluyveromyces cicerisporus* expresada en *Pichia pastoris* X-33, con valores K_M y V_{max} para inulina de 0,322 mM y 4317 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente (Ma *et al.*, 2015), una exoinulinasa de *Aspergillus ficuum* expresada en *Escherichia coli* con valores de K_M y V_{max} de 7,1 mM y $1000,0 \pm 0,1 \mu\text{mol min}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente (Chen *et al.*, 2013).

4. Ensayos para aplicaciones de la inulinasa recombinante

Debido a que la producción de FOS ha ganado interés comercial por sus propiedades funcionales y su carácter prebiótico surgió la necesidad de realizar estos ensayos de manera de generar información para la obtención de estos compuestos de interés para la producción industrial.

4.1 Actividad fructosiltransferasa

Se ensayó la capacidad de la inulinasa recombinante para sintetizar FOS a partir de sacarosa. Los productos del ensayo de actividad fructosiltransferasa fueron analizados por HPLC y, a modo de ejemplo, en la figura 63 se muestran

los cromatogramas de dos muestras, una muestra obtenida a los 60 minutos y otra a los 180 minutos.

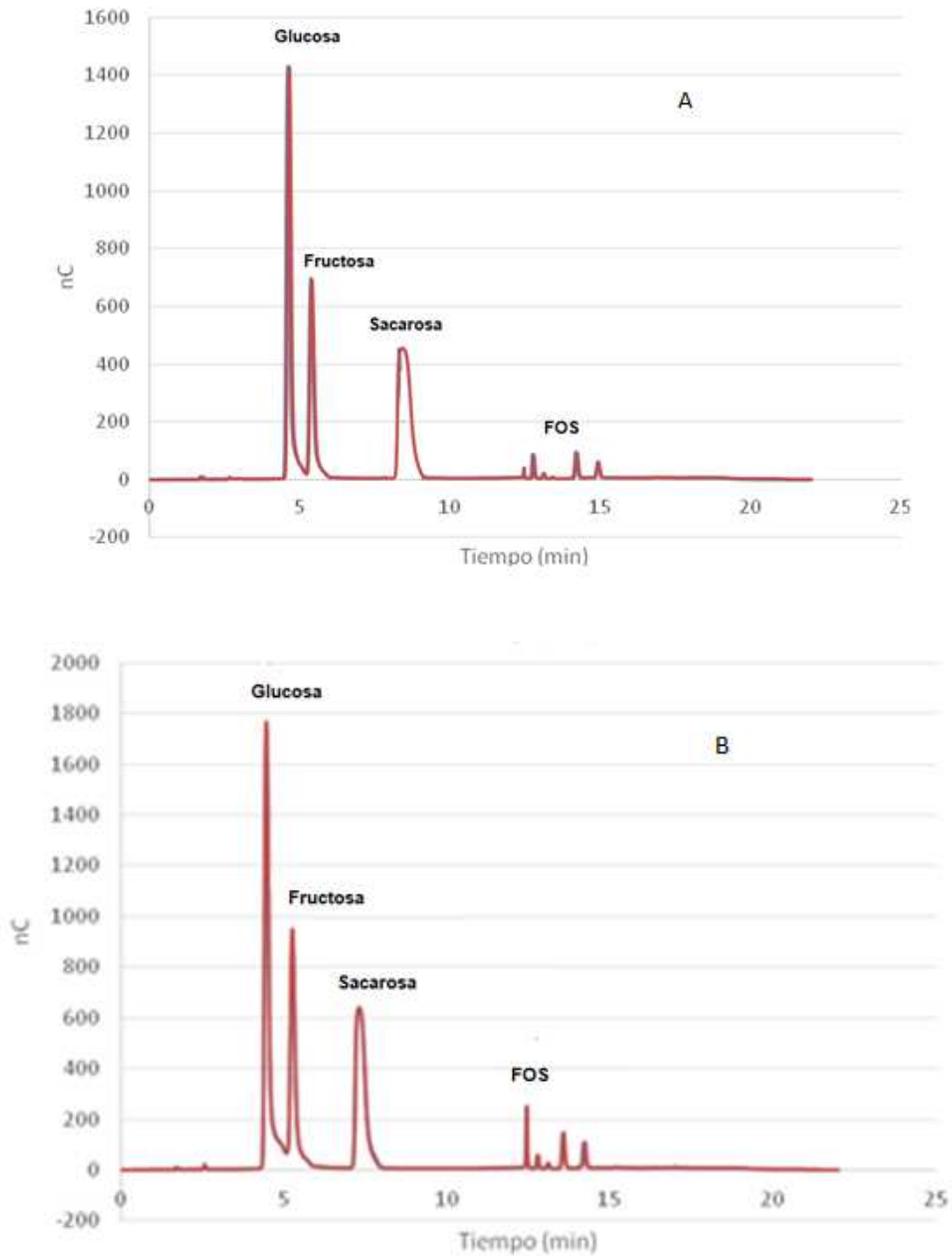


Figura 63. Perfil de HPLC obtenido del producto de la actividad fructosiltransferasa a partir de sacarosa.

(A) Muestra obtenida a los 60 minutos, (B) Muestra obtenida a los 180 minutos

La hidrólisis de la sacarosa produce una glucosa libre, mientras que la fructosa es retenida por la enzima para formar un intermediario fructosil-enzima. Si el siguiente aceptor es agua, la reacción da como resultado los productos de

hidrólisis de fructosa y glucosa. Sin embargo, si el siguiente aceptor es un fructano (sacarosa, GF2 o GF3), el resto de fructosa se transfiere y da como una molécula FOS con aumento del grado de polimerización.

Los cromatogramas obtenidos mostraron la presencia de FOS que fueron identificados como una serie de picos en el rango de 12 a 15 minutos de elución. Al comparar los cromatogramas obtenidos, se pudo observar un aumento de la concentración de los productos de síntesis, sin embargo, en las condiciones estudiadas, a los tiempos de elución de 4,8 y 5,2 minutos, se observan picos que se corresponden con los productos de hidrólisis glucosa y fructosa.

Se han informado exoinulinasas con actividad fructosiltransferasa, Goosen *et al.* (2008) reportaron una exoinulinasas de *Aspergillus niger* N402 con un 91 % de similitud con la reportada por Arand *et al.* (2003) producida por *Aspergillus awamori*. La actividad de transfructosilación se detectó con sacarosa y pequeñas moléculas oligoméricas como 1-kestosa y nistosa. El aumento de la concentración de sustrato (100 mM a 1 M) dio como resultado un aumento en la actividad de transfructosilación.

La similitud de la inulinasas recombinante con la exo inulinasas de *Aspergillus awamori* estudiada por Arand *et al.* (2003) no se correspondió con la actividad fructosiltransferasa detectada en estos estudios. Estos investigadores no tuvieron evidencias de esta actividad enzimática cuando analizaron concentraciones de 50 a 200 mM de sacarosa. Esto puede deberse a que se conoce que la reacción de transfructosilación se produce predominantemente a concentraciones de sacarosa superiores a 500 mM (Kim *et al.*, 1996), mientras que la misma enzima tiene una acción hidrolítica a concentraciones menores de sacarosa.

Aunque se han reportado un gran número de fuentes de fructosiltransferasas para la producción de FOS, aún no hay en el mercado una preparación enzimática con esta actividad principal por lo que sería interesante continuar con estudios de manera de optimizar la reacción para la obtención de estos compuestos.

4.2 Hidrólisis de fructanos de agave

Se estudió la actividad enzimática de la inulinasa recombinante sobre distintas concentraciones de soluciones de fructanos de agave crudos, obtenidos de la industria tequilera mexicana. Los resultados se muestran en la tabla 26.

Tabla 26. Análisis de hidrólisis de fructanos de agave en función del tiempo

Concentración (g/l)	Máximo % de hidrólisis a las 24 h
200	86
400	95
700	75

Al evaluar las tres concentraciones de fructanos de agave utilizadas, se observó que la mejor condición de hidrólisis se produjo cuando la concentración del sustrato fue de 400 g/l a las 24 horas de reacción obteniendo una degradación del 95 %. Al aumentar la concentración a 700 g/l el máximo porcentaje de hidrólisis obtenido fue 75 %. Esto podría haber ocurrido debido a una inhibición por producto.

Posteriormente se comparó la hidrólisis en dos jugos de agave crudos, subproductos de la elaboración de miel de agave de 160 g/l con azúcares totales de dos empresas tequileras mexicanas utilizando, por un lado, la inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 producida en *Pichia pastoris* recombinante y por otras células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-5088 productora de inulinasa, a diferentes concentraciones enzimáticas (250 U/g y 125 U/g y a 50 °C. Los resultados se presentan en la tabla 27.

Tabla 27. Máximos porcentajes de hidrólisis en jugos de agave crudos para inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 producida en *Pichia pastoris* y células permeabilizadas de *K. marxianus* NRRL Y-5088

Enzimas	Sustrato	Unidades enzimáticas (U/g de sustrato)	Máximo % de hidrólisis a las 24 h
Inulinasa recombinante	jugo de agave (Empresa 1)	125	85,3 %
Células de <i>K. marxianus</i>	jugo de agave (Empresa 1)	125	70,2 %
Inulinasa recombinante	jugo de agave (Empresa2)	250	88,7 %
Células de <i>K. marxianus</i>	jugo de agave (Empresa 2)	250	67,6%

El porcentaje de hidrólisis fue mayor para la enzima recombinante de *Aspergillus kawachii* que para las células inmovilizadas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-5088.

Por otra parte, para la concentración de 250 U de actividad inulinasa, la hidrólisis aumentó hasta las 6 h (aproximadamente 85 %) y luego se mantuvo prácticamente constante mientras que, a la concentración de 125 U, el porcentaje de hidrólisis fue menor en ese tiempo (aproximadamente 70%) pero permaneció en aumento hasta las 24 horas donde alcanzó un valor próximo del 85 %.

Estos resultados no sólo demostraron la capacidad de hidrólisis que posee la inulinasa recombinante sobre un residuo crudo obtenido de la industria tequilera, en donde el sustrato se encuentra con impurezas y en un medio hostil para la enzima, sino que, además, se obtuvo un alto porcentaje de degradación sin la necesidad de otras enzimas como suele utilizarse actualmente en los procesos industriales (Arrizon *et al.*, 2012).

Los biocatalizadores comerciales que actualmente se utilizan en estas industrias tienen como principal desventaja sus rendimientos variables cuando se usan subproductos industriales, tales como jugo de agave crudo (menos del 80 % de hidrólisis), mientras que la inulinasa recombinante mostró rendimientos superiores a 80 %. Esta característica la hace prometedora para su uso en las

industrias productoras de derivados de agave, razón por la que se presentó una patente ante el Instituto Mexicano de Propiedad Industrial.

4.3. Inmovilización de la enzima inulinasa en esferas de quitosán

4.3.1. Activación de esferas de quitosán

La activación de las esferas de quitosán con glutaraldehído se realizó con la finalidad de introducir grupos carbonilos en la superficie del quitosán para que interaccionen con los grupos aminos de la inulinasa y reducir las interacciones entre esta proteína y el soporte mediante el distanciamiento de la enzima con la superficie del polímero. El uso de glutaraldehído tiene la ventaja de proporcionar al menos un separador de 5 átomos entre la matriz del soporte y la enzima. Este espaciador es vital en la catálisis de sustratos macromoleculares como la inulina (Singh *et al.*, 2017).

En el esquema de la figura 64 se muestra la interacción entre los componentes de este sistema utilizado.



Figura 64. Esquema del sistema de inmovilización utilizado

Adaptado de Singh *et al.* (2017)

Con el objetivo de determinar los parámetros óptimos para la activación de las esferas de quitosán se realizó un diseño factorial completo 2^2 + estrella donde se estudiaron diferentes concentraciones del glutaraldehído desde 1 % a 5 % y a diferentes intervalos de tiempo desde 2 a 10 horas.

Las condiciones experimentales y el porcentaje de inmovilización de la enzima inulinasa en las esferas se muestran en la tabla 28.

Tabla 28. Diseño central compuesto del porcentaje de inmovilización de la enzima recombinante

Orden	Glutaraldehído (% v/v)	Tiempo de activación (h)	Inmovilización de enzima (EI %)
1	5	10	78,2
2	1	10	78,0
3	5	2	72,1
4	3	0,3	64,9
5	3	6	87,0
6	0,17	6	86,0
7	1	2	72,1
8	3	6	90,0
9	3	6	85,9
10	3	11,6	75,0
11	3	6	88,2
12	3	6	86,1
13	5,83	6	83,0

El modelo matemático de segundo orden (cuadrático) obtenido para este diseño, establece una relación empírica entre el rendimiento de inmovilización (variable dependiente) y la concentración de glutaraldehído y tiempo de activación de las esferas de quitosán (variables independientes), relación que se representa en la siguiente ecuación:

$$EI (\%) = + 87,40 - 0,53 * A + 3,27 * B - 2,01 * A^2 - 9,26 * B^2$$

Este modelo fue evaluado estadísticamente mediante análisis de varianza para ver el grado de ajuste a los datos experimentales. Los resultados se muestran en la tabla 29.

Tabla 29. Resultado del análisis de varianza del diseño factorial empleado.

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
<i>Modelo</i>	689,08	5	137,82	39,95	< 0,0001
A-conc. Glut.	2,25	1	2,25	0,65	0,4459
B-tiempo	85,43	1	85,43	24,76	0,0016
AB	0,00	1	0,00	0,00	1,0000
A ²	28,17	1	28,17	8,17	0,0244
B ²	596,83	1	596,83	173,00	< 0,0001
Residual	24,15	7	3,45		
Falta de ajuste	12,95	3	4,32	1,54	0,3342
Error puro	11,20	4	2,80		
Error Total	713,23	12			
DS	1,86	R ²			0,9661
Promedio	80,46	R ² ajustado			0,9420

Estos resultados indican que, de los factores analizados, el tiempo de activación fue significativo ($p < 0,05$), mientras que, la concentración de glutaraldehído no resultó significativa. Con respecto a los términos cuadráticos, el tiempo y la concentración de glutaraldehído tuvieron un efecto significativo ($p < 0,05$).

Por otro lado, la suma de cuadrados del error puro resultó mínima con respecto a la suma de cuadrados del error total, indicando buena reproducibilidad en el punto central. Con respecto al coeficiente de determinación, R^2 , indicó que el modelo explica 96,61 % de la variabilidad en % de inmovilización. El estadístico R^2 ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, resultó 94,20 %.

La prueba de falta de ajuste, diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados o si debería usarse un modelo más complicado, tomó un valor de 0,33 ($p > 0,05$) por lo que el modelo resultó adecuado para describir los datos observados al nivel de confianza del 95,0 %. El gráfico de superficie de respuesta obtenido se presenta en la figura 65.

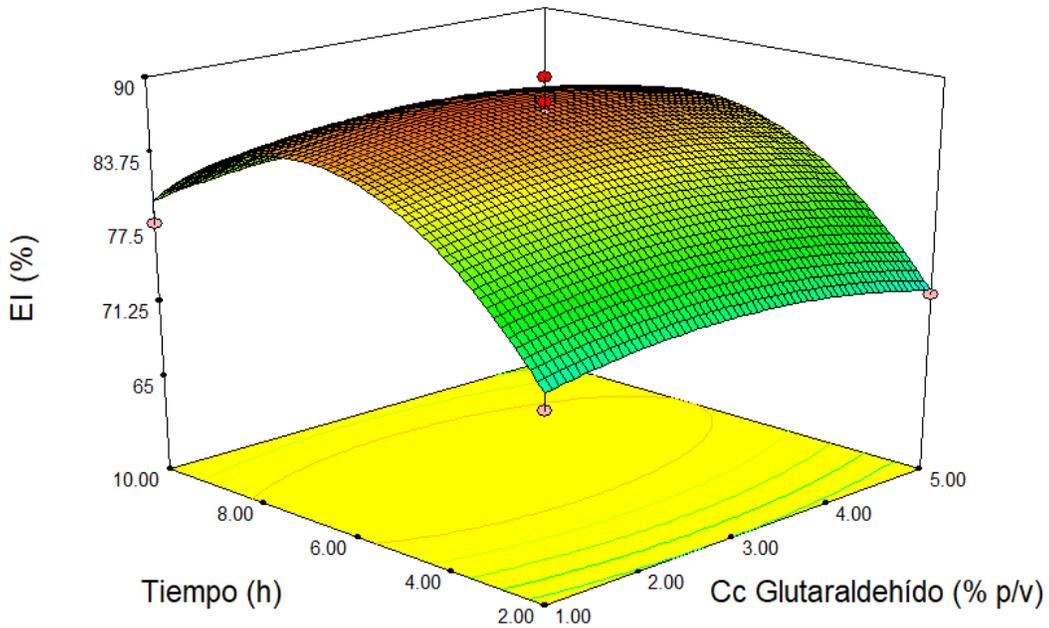


Figura 65. Superficie de respuesta para la inmovilización de enzimas en función de la concentración de glutaraldehído y el tiempo de activación para la inmovilización de inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 producida en *Pichia pastoris*, en esferas de quitosán

Color rojo: 90 % de inmovilización, color azul: 65 % de inmovilización. Las líneas de un mismo color del plano inferior indican isorespuesta.

Nuevamente, el gráfico muestra que la concentración de glutaraldehído no presentó ningún efecto sobre el porcentaje de inmovilización de la enzima.

En cuanto al tiempo de activación el mayor porcentaje de inmovilización se encontró en los experimentos llevados a cabo durante de tiempo de activación correspondiente al nivel 0 del diseño (6 h). Tiempos insuficientes de activación del soporte podrían haber generado pocos grupos activados para que se lleve a cabo el entrecruzamiento, por el contrario, tiempos excesivos de activación podrían haber causado interacciones covalentes multipunto perjudiciales que podrían llevar a la desnaturalización de la enzima o aumento de la rigidez de la molécula debido al incremento de la formación de enlaces covalentes.

Los resultados obtenidos mostraron un valor óptimo para el porcentaje de inmovilización al usar 30 g/l de glutaraldehído y 6 h de tiempo de activación y fueron los seleccionados para los posteriores estudios.

4.3.2. Efecto del tiempo en la inmovilización enzimática

Se estudió cómo afecta el tiempo de contacto entre la enzima y las esferas de quitosán, al porcentaje de inmovilización de la inulinasa recombinante. En la figura 66 se muestran los resultados.

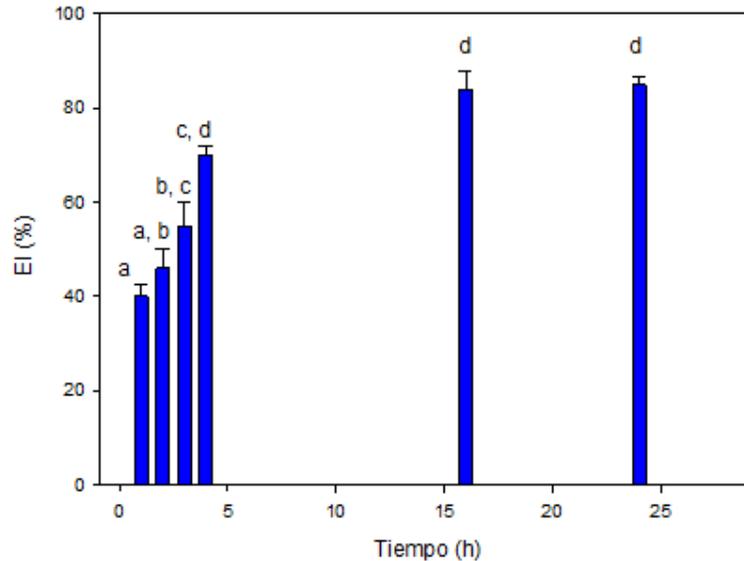


Figura 66. Efecto del tiempo en la inmovilización de la inulinasa recombinante

Medias con distintas letras indican que son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos

Puede observarse que el porcentaje de inmovilización aumenta significativamente con el tiempo durante las 4 primeras horas, alcanzando un máximo de 85 % a las 16 h y manteniéndose sin incrementos en horas posteriores.

Algunos autores han reportado tiempos similares de mayor porcentaje de inmovilización en esferas de quitosán utilizando glutaraldehído, entre ellos Singh *et al.* (2017) que informaron un porcentaje de inmovilización de 56 % a las 12 h para una inulinasa de *K. marxianus* YS-1 y Trivedi *et al.* (2015) que reportaron un tiempo de contacto óptimo de 18 h y un porcentaje de inmovilización de 76,4 % para una inulinasa de *Aspergillus tubingensis* CR16.

4.3.3. Efecto de la carga enzimática en la inmovilización

Se evaluó cómo incide la concentración de enzima con respecto a la actividad inulinasa inmovilizada y el porcentaje de inmovilización. En la figura 67 se observa que el rendimiento de inmovilización aumentó hasta 85 % para

una carga de 150 U/g soporte ya que, a mayor carga enzimática no se observó un aumento en el rendimiento de inmovilización. La actividad de la inulinasa inmovilizada aumentó hasta 200 U/g soporte alcanzando un valor de actividad de 145 U/g soporte, que representa un 83 % de rendimiento. Si bien esta eficiencia disminuye a la vez que la carga enzimática aumenta, se decidió utilizar una concentración de 200 U/g soporte para los estudios de caracterización de la enzima.

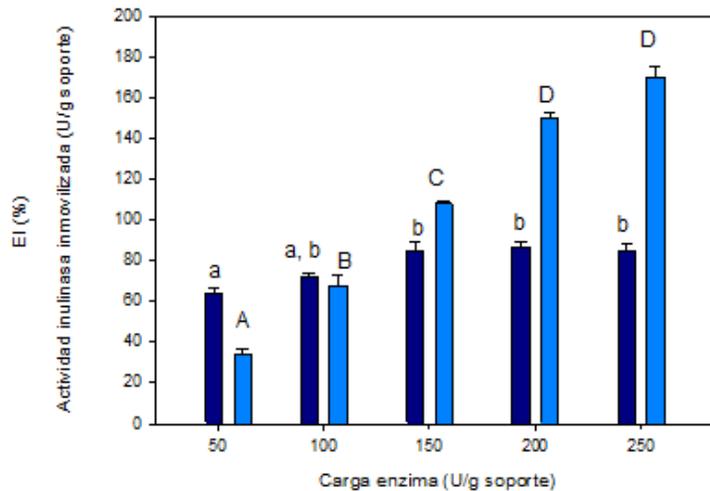


Figura 67. Efecto de la carga enzimática sobre la actividad inulinasa recombinante inmovilizada y el porcentaje de inmovilización

■ EI %, ■ Actividad inulinasa inmovilizada

Medias con distintas letras indican que son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos

Es posible que, debido a la inmovilización, algunos grupos activos permanezcan no expuestos a altas concentraciones de carga enzimática. En estudios previos, Curcio *et al.* (2014) reportaron que la actividad catalítica de la enzima usualmente disminuye debido a la alteración de la estructura tridimensional de la proteína o por el efecto microambiental causado por el soporte y el sistema enzima-sustrato; mientras que Valerio *et al.* (2013) también han sugerido que a mayor concentración enzimática los sitios de unión del soporte se saturan con la enzima lo cual lleva a una limitación por el fenómeno de difusión.

Los resultados obtenidos de la cantidad de U de enzima/ g soporte son comparables con los publicados por Trivedi *et al.* (2015) quienes informaron que

obtuvieron una carga óptima de 132 U/g soporte y un rendimiento de inmovilización de 66 %, Yewale *et al.* (2013) que informaron 83 U/ml para una inulinasa de *Aspergillus niger* NCIM 945 inmovilizada en esferas de quitosán, Nguyen, *et al.* (2011) que informaron 291 U/g soporte para una endoinulinasa de *Aspergillus niger*. Otros autores han reportado cantidades muy superiores utilizando soportes más novedosos (Garlet *et al.*, 2014, Neeraj *et al.*, 2017).

Luego de seleccionar las condiciones óptimas de la inmovilización de la inulinasa en esferas de quitosán (3 % de glutaraldehído, 6 h de tiempo de activación, 16 h de tiempo de inmovilización y una concentración enzimática de 200 U/g de soporte) se procedió a caracterizar el sistema estudiando estabilidad frente a la temperatura, pH óptimo, reutilización de la enzima y su aplicación frente a la hidrólisis de inulina.

Se determinó la estabilidad térmica de la inulinasa inmovilizada incubando la enzima a diferentes temperaturas entre 37 y 65 °C por 180 minutos y determinando su actividad residual. Los resultados obtenidos a 65 °C se compararon con la enzima libre y se muestran en la figura 68.

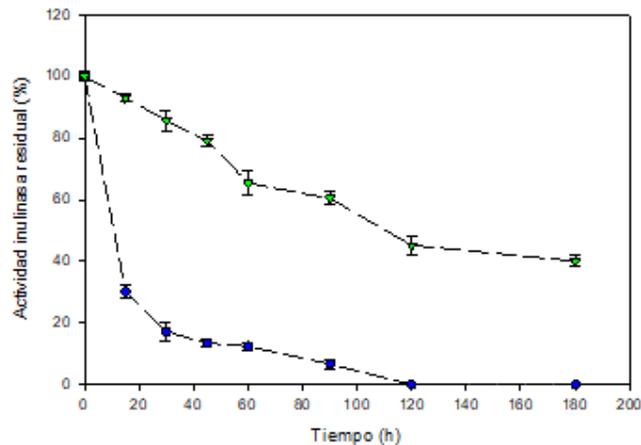


Figura 68. Actividad enzimática residual de la enzima inulinasa recombinante libre e inmovilizada

(●) inulinasa libre (▼) inulinasa inmovilizada

Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos

Estos resultados indican que la pérdida de actividad fue menor para la enzima inmovilizada que para la enzima libre. A los 120 minutos, a 65 °C, la inulinasa libre no exhibió actividad enzimática residual, mientras que la inulinasa inmovilizada exhibió alrededor del 45 % de actividad residual que se mantuvo

hasta los 180 minutos, donde alcanzó un valor del 40 %. A las otras temperaturas estudiadas no se encontraron diferencias con respecto a los resultados obtenidos para la enzima libre, reteniendo 100 % de la actividad a 37 °C y 80 % de actividad a las temperaturas de 45 y 55 °C respectivamente. La vida media de la enzima inmovilizada se estimó, a partir de una cinética de primer orden a una temperatura de 65 °C, en 126 minutos y un k_d de $0,0055 \pm 0,0005$.

Un aspecto de sumo interés en el campo de la tecnología enzimática es el mejoramiento de la termoestabilidad de las enzimas. Las reacciones que se llevan a cabo a altas temperaturas poseen mayor velocidad de catálisis, favoreciendo además la transferencia de masa debido a que al aumentar la temperatura se incrementa la solubilidad del sustrato y se disminuye la viscosidad del medio de reacción (Matsumoto & Ohasi, 2003).

La inmovilización es una de las estrategias más utilizadas para estabilizar térmicamente a las enzimas. Varios autores coinciden en que la formación de interacciones covalentes entre la enzima y el soporte de inmovilización incrementan la rigidez conformacional de la estructura proteica y, por ende, su resistencia a ser desnaturalizada por un tratamiento térmico (Singh *et al.*, 2013).

En este trabajo se seleccionó la carga que presentó mayor actividad inulinasa/g de soporte a los fines de poder estudiar el sistema, pero en caso de utilizarse la inmovilización en un proceso industrial, la condición más conveniente debería elegirse a partir de la evaluación de los costos-beneficios operativos.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados por Gill *et al.* (2006) que han informado que una inulinasa de *Aspergillus fumigatus* inmovilizada en varios soportes retuvo entre el 68 y el 72 % de actividad a 60 °C por 48 h mientras que la libre sólo retuvo el 32 % a la misma temperatura y tiempo. También coinciden con el estudio de Tanriseven & Aslan (2005) que reportaron la inmovilización de una inulinasa comercial que retuvo el 30 % de actividad enzimática a 75 °C mientras que la enzima libre perdió completamente la actividad a esta temperatura.

Los resultados obtenidos al evaluar el pH óptimo de la inulinasa recombinante inmovilizada indicaron que a un pH de 3 mostraba actividad enzimática máxima, coincidente con el valor de pH de la enzima libre.

Los grupos amino protonados ($-NH_3^+$) del quitosán le confieren un carácter catiónico por lo que las enzimas inmovilizadas en materiales a base de este polisacárido presentan su máxima actividad a valores de pH más bajos con respecto a la enzima libre. Cuando se agrega glutaraldehído como agente bifuncional se inducen reacciones de entrecruzamiento entre la enzima inmovilizada y el soporte, produciendo que, el efecto de desplazamiento del pH óptimo de catálisis hacia zonas ácidas no sea significativo. Dicho comportamiento se atribuye a que los grupos amino del quitosán están muy poco disponibles para protonarse debido a que interaccionan con los agentes entrecruzadores utilizados (Dhananjay & Mulimani, 2008). Esto puede explicar el comportamiento de la inulinasa recombinante en este estudio.

Otro factor importante para la aplicación de enzimas inmovilizadas es evaluar la capacidad de su reutilización. Desde el punto de vista económico, esta posibilidad representa una gran ventaja con respecto al uso de enzimas en forma soluble que son desechadas después de un solo uso, agregándole un mayor costo financiero al proceso.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 69.

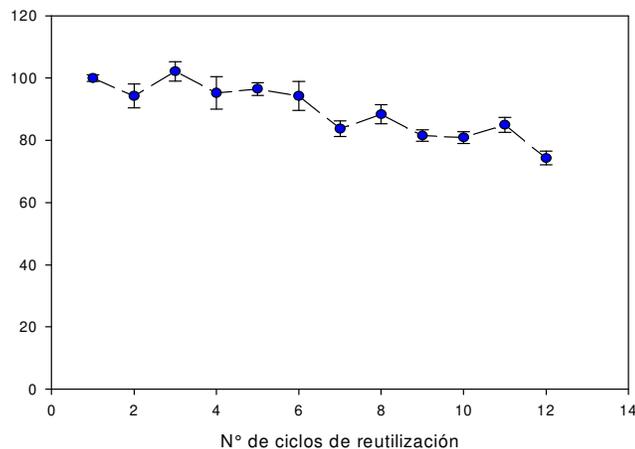


Figura 69. Reutilización de inulinasa recombinante inmovilizada en esferas de quitosán

Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos

Estos resultados indican que cuando la inulinasa recombinante se unió al quitosán hubo una mínima pérdida después de 12 ciclos de reutilización manteniéndose la actividad residual, en el último ciclo, en el 75 %, lo que representa una mayor estabilidad operacional en comparación con la enzima libre.

El uso repetido del sistema catalítico provoca que la fuerza de los enlaces establecidos entre la enzima y el soporte se debilita provocando pérdidas en actividad por desprendimiento de la enzima, además la alta frecuencia de interacción entre el sustrato y el sitio activo causa distorsión que resulta en una disminución en la eficiencia catalítica. El enlace formado entre la inulinasa recombinante y el quitosán resultó ser lo suficientemente estable para evitar desprendimientos de la enzima y con ello mantener la eficiencia catalítica del sistema durante 12 ciclos de uso.

4.3.4. Hidrólisis de inulina

Para estudiar la aplicación de la enzima inmovilizada se llevó a cabo un análisis comparativo de la hidrólisis de inulina durante 24 h utilizando la enzima libre y la enzima inmovilizada. Los resultados se presentan en la figura 70.

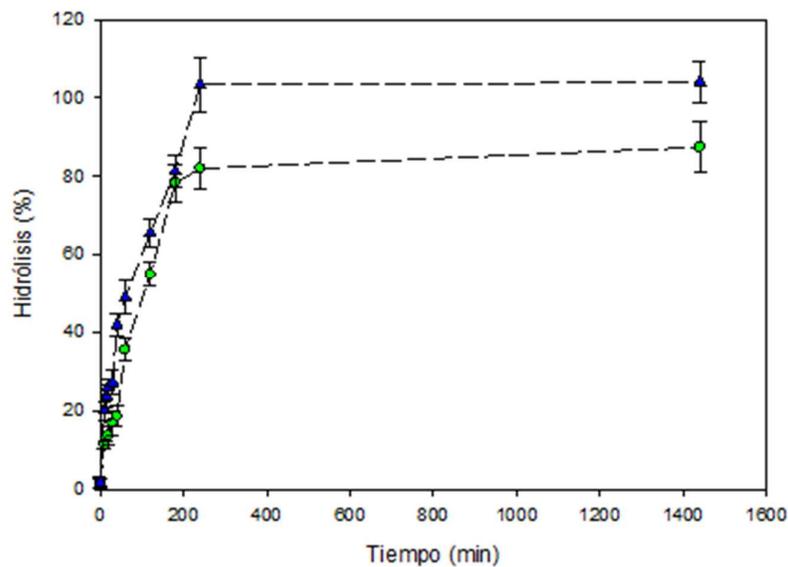


Figura 70. Porcentaje de hidrólisis utilizando inulina como sustrato, de inulinasa recombinante libre e inmovilizada en esferas de quitosán

(▲) inulinasa libre, (●) inulinasa inmovilizada.

Las barras de error representan el desvío estándar calculado de dos experimentos

Puede observarse que el máximo porcentaje de hidrólisis para la enzima inmovilizada fue de 87 % que corresponde a 174 g/l de azúcares reductores y 150 g/l de fructosa, a partir de las 4 h de reacción.

Estos resultados son comparables con los obtenidos por Singh *et al.* (2017) que reportaron la hidrólisis de inulina en sistema batch donde obtuvieron 83,6 % de hidrólisis (47 g/l de azúcares reductores y 42, 5 g/l de fructosa) para la enzima inmovilizada utilizando 5 % (p/v) de inulina a las 5 h de cultivo y Yousefi Mokri *et al.* (2019) que reportaron que, bajo condiciones optimizadas, pudieron lograr 80 % de hidrólisis de inulina para la enzima inmovilizada utilizando 20 % de sustrato (160 g/l de fructosa).

Son necesarios mayores estudios para poder encontrar tanto las condiciones óptimas de hidrólisis de la inulina tanto en sistemas batch como continuos. Estos ensayos son solo aproximaciones que se pueden utilizar como base para investigaciones futuras sobre la aplicación de la inulinasa en la producción industrial de fructosa.

Conclusiones del capítulo

Un factor importante para obtener una producción óptima de la enzima recombinante fue evaluar las condiciones de cultivo. Efectivamente al trabajar con un biorreactor a escala de laboratorio se logró mejorar la producción de la enzima con respecto a cultivos en matraces *Erlenmeyer*. Los ensayos de cultivo en biorreactor ofrecen un mayor control de parámetros para la producción de proteína heteróloga y un escalado adecuado hacia una posible comercialización.

El hospedador elegido pudo excretar al medio extracelular la inulinasa recombinante, esto facilitó su posterior purificación mediante etapas sencillas. Además, se logró una integración genómica estable, alta densidad celular, rápido crecimiento en medios definidos y económicos.

La inulinasa recombinante presentó las mismas propiedades bioquímicas que la enzima nativa, resultó funcional con niveles de producción de actividad enzimática aumentada 5000 veces y se logró un incremento en la productividad de aproximadamente 3500 veces con respecto a los reportados para el organismo silvestre.

En cuanto al procedimiento de inmovilización se pudo comprobar que confiere la estabilidad térmica y ácida a la enzima, lo que podría ser conveniente en términos de hidrólisis continua de inulina. Además, la reutilización de la enzima podría lograrse después de este proceso de inmovilización.

La enzima recombinante presentó actividad fuctosiltransferasa que le confiere interés industrial para la obtención de FOS a partir de sacarosa.

Los valores de producción de inulinasa recombinante obtenidos junto con las características bioquímicas que presentó la enzima, permiten que se la considere como una proteína con posibilidad de ser empleada en procesos industriales dado que fue capaz de hidrolizar fructanos de agave en subproductos de la industria tequilera.

CONCLUSIONES GENERALES

Este estudio aporta información cuantitativa relevante sobre la producción de una inulinasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 expresada en el sistema de expresión *Pichia pastoris* X-33. También provee información acerca de las características más relevantes de la enzima, el cultivo en biorreactor, la inmovilización y sus posibles aplicaciones.

En particular permitió arribar a las siguientes conclusiones:

- *Aspergillus kawachii* IFO 4308 fue capaz de producir una inulinasa utilizando extracto de yacón como fuente de carbono y energía, que implica una alternativa basada en sustratos vegetales que se convierten en un factor clave para reducir costos y aumentar la competitividad en la producción de enzimas.
- Se utilizó una estrategia de optimización de una variable a la vez del medio de cultivo para la producción de la enzima inulinasa, así se logró duplicar la actividad enzimática.
- El extracto enzimático obtenido se caracterizó como exoinulinasa y las características más sobresalientes resultaron ser su amplia estabilidad al pH en condiciones desde neutras hasta muy ácidas y su termoestabilidad. A 65 °C presentó una vida media de 75 minutos.
- *Aspergillus kawachii* IFO 4308 produjo la enzima inulinasa en mínimas concentraciones en cultivo en biorreactor (124,1 mU/ml y una productividad de 2,59 U/l/h), por lo que decidió su clonado.
- La estrategia exitosa de clonado en *Pichia pastoris* X-33 fue a partir de ADN genómico, una vez que se eliminó el intrón. Se encontró un clon que presentó un incremento de 150 veces más actividad inulinasa con respecto a la cepa de *Aspergillus kawachii* silvestre en escala de matraces *Erlenmeyers*.
- El cultivo en biorreactor del clon seleccionado logró niveles de producción enzimática de 622,4 U/ml y una productividad de 25933,3 U/l/h. Estos resultados podrían atribuirse a una combinación sinérgica de la elección del sistema de expresión y el

establecimiento de las condiciones de producción.

- La inmovilización de la inulinasa recombinante en esferas de quitosán confirió un aumento en la termosestabilidad de la enzima a 65 °C con una vida media de 126 minutos, permitiendo la reutilización lo que otorga una ventaja operacional.
- La enzima recombinante presentó actividad fucosiltransferasa que le confiere interés industrial para la obtención de FOS a partir de sacarosa.
- Los valores de producción de inulinasa recombinante obtenidos junto con las características bioquímicas que presentó la enzima, permiten que se la considere como una proteína con posibilidad de ser empleada en procesos hidrólisis de fructanos de agave en subproductos de la industria tequilera.

La experiencia adquirida y los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral presentan la posibilidad de continuar con las aplicaciones industriales de la enzima recombinante, optimizando procesos y costos.

BIBLIOGRAFÍA

- Arand, M; Golubev, A;, Brandao Neto J., Polikarpov I., Wattiez R ., Korneeva O., Eneyskaya E., Kulminskaya A., Konstantin, Shabalin A., Shishliannikov S., Chepurnaya O., Neustroev K. (2002). Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*. *Biochemical Journal*. 362, 131-135.
- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., Monsan, P. (2012). Fructanase and fructosyltransferase activity of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from fermenting musts of Mezcal. *Bioresource Technology* 110 560–565.
- Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A., Hoseinpoor, R., Rahbarnia, L., Aria, M. (2019) Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Mol Biotechnol* 61, 365–384.
- Bernáldez, V., Rodríguez, A., Rodríguez, M., Sánchez-Montero, L., Córdoba, J. J. (2017). Evaluation of different RNA extraction methods of filamentous fungi in various food matrices. *LWT - Food Science and Technology*, 78, 47–53.
- Blanchard, V., Gadkari, R.A., George, A.V., Satarupa, R., Gerwig, G., Rajan R., Boelens, R., Kamerlinget J. (2008) High-level expression of biologically active glycoprotein hormones in *Pichia pastoris* strains selection of strain GS115, and X-33, for the production of biologically active N-glycosylated 15N-labeled pHCG. *Glycoconj J*. 25(3):245-257.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Byrne, C., Cabalito, S., Voget, C. (2017) Purification and characterization of two inducible exopolysaccharidases from *Aspergillus kawachii*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 38-45.
- Brena, B.M., Batista-Viera, F. (2006) Immobilization of enzymes. In: *Immobilization of enzymes and cells*, Guisan JM (ed) Second edition. Humana Press, New Jersey, pp 15- 30.

- Brites, M., L., Zapata Noreña C., P. (2016) Obtaining fructooligosaccharides from yacón (*Smallanthus sonchifolius*) by an ultrafiltration process. Journal of Chemical Engineering 33(4), 1011-1020.
- Canales, C., Altamirano, C., Berrios, J. (2015). Effect of dilution rate and methanol-glycerol mixed feeding on heterologous *Rhizopus oryzae* lipase production with *Pichia pastoris* Mut⁺ phenotype in continuous culture. Biotechnology progress, 31, 707-714.
- Cavello, I. (2013) Tesis doctoral. Recuperado de: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/32430/Documento_completo_.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cazetta, L., Martins, P., Monti, R., Contiero, J. (2005). Yacón (*Polymnia sonchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. J Food Eng 66: 301-305.
- Cereghino, G., Cereghino, J., Ilgen, C., Cregg, J. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Curr. Opin. Biotechnol. Aug. 13 (4) 329-32.
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M, (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, FEMS microbiology reviews. 24, 45-66.
- Chacón Villalobos, A. (2006). Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofructosacáridos (FOS). Agronomía Mesoamericana, 17(2), 265-286.
- Chen, Y., Cino, J., Hart, G., Freedman, D., White, C. Komives, E.A. (1997) High Protein Expression in Fermentation of Recombinant *Pichia pastoris* by a Fed-batch Process. Process Biochem. 32, 107.
- Chen, H.Q., Chen, X.M., Li, Y., Wang, J., Jin, Z.Y., Xu, X.M., Xie, Z.J. (2009). Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. Food Chemistry, 115(4), 1206-1212.
- Chen, H.Q., Chen, X.M., Chen, T.X., Xu, X.M., Jin, Z.Y. (2011). Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 using response surface methodology. Carbohydrate Polymers, 86(1), 249-254.

- Chen, X.M., Xu, X.M., Jin, Z.Y., Chen, H.Q. (2013) Expression of an exoinulinase gene from *Aspergillus ficuum* in *Escherichia coli* and its characterization. Carbohydr Polym. 92(2):1984-1990.
- Chen, M., Lei, X., Chen, C., Zhang, S., Xie, J., Wei, D. (2015) Cloning, overexpression, and characterization of a highly active endoinulinase gene from *Aspergillus fumigatus* C1 for production of inulo-oligosaccharides. Appl Biochem Biotechnol.175 (2):1153-1167.
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Yue, L. (2009). Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 82, no. 2, p. 211-220.
- Chi, Z.M., Zhang, T., Cao, T.S., Liu, X.Y., Cui, W., Zhao, C.H., (2010). Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. Biores. Technol. 102, 4295-4303.
- Contreras Esquivel, J.C. (2003). Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. 127-151.
- Contreras Esquivel, J.C.; Voget, Claudio Enrique (2004). Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*; Elsevier Science; Journal of Biotechnology; 110 (1) 21-28.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., Raschke, W. C. (1993) Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. Bio/Technology 11, 905-910.
- Cunja, J. (2006) El yacón en el contexto de la biodiversidad andina. Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/80918577/Modulo-I-El-Yacon-en-el-Contexto-de-la-Biodiversidad-Andina>.
- Curcio, S., Ricca, E., Calabrò, V., Iorio, G. (2014). Effect of the Degree of Polymerization of Inulin on the Rate of Hydrolysis Using Immobilized Inulinase. Food Technology and Biotechnology. 52. 317-324.
- Daly, R., Hearn, M. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. Journal of molecular recognition 18, 119-38.

- Das, D., Bhat, D., Raja, S. (2019) Review of inulinase production using solid-state fermentation. *Annals of Microbiology* 69, (3) 201–209.
- Demain, A.L., Vaishnav, P. (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*, 27(3):297-306
- Dhananjay, S. K., Mulimani, V. H. (2008). Optimization of immobilization process on crab shell chitosan and its application in food processing. *Journal of Food Biochemistry*, 32(4), 521–535.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Ertan, F., Sanal (E), F., Kaboğlu (Ç), A., Aktaç, T., Bakar, E. (2005). Some properties of inulinase from *Rhizoctonia solani*. *J. Biol. Science*, 5(3): 330-334.
- Ettalibi, M., Baratti, J.C. 1990. Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases. *Agricultural and Biological Chemistry* 54: 61-68.
- Ferner Scher, C. F., de Oliveira Rios, A., Zapata Noreña, C. P. (2009). Hot air drying of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and its effect on sugar concentrations. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(11), 2169–2175.
- Flores Maltos, D. A., Mussatto, S. I., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., Teixeira, J. A., & Aguilar, C. N. (2014). Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 259–267.
- Flores Gallegos, A. C., Veana, F., González-Herrera, S. M., Muñoz-Márquez, D. B., Sáenz-Galindo, A., & Rodríguez-Herrera, R. (2018). Fungal Inulinases: An Interesting Option for Food Sweetener Production. *Enzymes in Food Technology*, 79–101.
- Freigassner, M., Pichler, H., Glieder, A. (2009). Tuning microbial hosts for membrane protein production. *Microbial Cell Factories*, 8, 69-91.
- Futagami, T., Mori, K., Yamashita, A., Wada, S., Kajiwara, Y., Takashita, H., Toshiro, O., Takegawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Goto, M. (2011). Genome

- sequence of the white koji mold *Aspergillus kawachii* IFO 4308, used for brewing the Japanese distilled spirit shochu. *Eukaryotic Cell*, 10, 1586-1587.
- Fushinobu, S., Ito, K., Konno, M., Wakagi, T., Matsuzawa, H. (1998) Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp37 for catalysis at low pH. *Protein engineering* 11(12):112-8.
 - Garlet, T., B., Weber, C.T., Klaic, R., Foletto L. E., Jahn, L., S., Mazutti, A., M., Kuhn C.R. (2014). Carbon nanotubes as supports for inulinase immobilization *Molecules* 19 (9):14615-14624.
 - Gao, W., Bao, Y., Liu, Y., Zhang, X., Wang, J., An, L. (2008). Characterization of thermo-stable endoinulinase from a new strain *Bacillus Smithii* T7. *Applied biochemistry and biotechnology*, 157. 498-506.
 - Germec, M., Turhan, I. (2019). Evaluation of carbon sources for the production of inulinase by *Aspergillus niger* A42 and its characterization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42, 1993-2005.
 - Gill, P.K.; Sharma, A.D.; Harchand, R.K., Singh, P. (2004). Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. *Bioresource Technology*, 87 (3) 359-362.
 - Gill, P.K., Manhas, R.K., Singh, P. (2006) Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Food Eng.*, v. 76, p. 369-375, 2006.
 - Gong, F., Sheng, J., Chi, Z.M., Li, J. (2007) Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *J. Indu. Microbiol. Biotechnol.* 34,179–185.
 - Gong, F., Zhang, T., Chi, Z., Sheng, J., Li, J., Wang, X. (2008) Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13:533-539.
 - Goosen, C., van der Maarel, M., Dijkhuizen, L. (2008). Exo-Inulinase of *Aspergillus niger* N402: A hydrolytic enzyme with significant transfructosylating activity. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26 (1-2) 49-58.

- Grumezescu, A., M., Holban A., M. (2018) The Role of Materials Science in Food Bioengineering, Volumen 19 in the Handbook of Food Bioengineering, página 480.
- Guimarães, L.H.S., Terenzi, H.F., Polizeli, M.L.T.M. & Jorge, J.A. (2007). Production and characterization of a thermostable β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agro-industrial residues as carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 42, 52-57.
- Gupta, A.K., Rathore P., Kaur, N., Singh, R. (1998). Production, thermal stability and immobilisation of inulinase from *Fusarium oxysporum*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 47: 245-257.
- Hamilton, S.R., Gerngross, T.U. (2007) Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(5), 387-392.
- He, M., Wu, D., Wu, J., Chen, J. (2013). Enhanced expression of endoinulinase from *Aspergillus niger* by codon optimization in *Pichia pastoris* and its application in inulooligosaccharide production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(1), 105–114.
- He M, Wu D, Wu J, Chen J. (2014) Enhanced expression of endoinulinase from *Aspergillus niger* by codon optimization in *Pichia pastoris* and its application in inulooligosaccharide production *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41(1):105-114.
- Herber, D., Phipps, P., Strange, P., (1971). Chemical analysis of microbial cells. In: J. Norris, J, Ribbons, D. (Eds.), *Methods in Microbiology*, vol. 5B. Academic Press, London, pp. 210–344.
- Heyer, A.G., Wendenburg, R. (2001) Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowii* IAM 2544, *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 363–370.
- Holyavka, M., Artyukhov, V., Kovaleva, T. (2016). Structural and functional properties of inulinases: A review. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34(1), 1–17.
- Ilgin, M., Germec, M., & Turhan, I. (2019). Inulinase production and mathematical modeling from carob extract by using *Aspergillus niger*.

- Biotechnology Progress, 36 (1) 1-13
- Jacob, M., M., Prapulla, S., G., (2012). Fructans including inulin. Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Food. Nollet, L. & Toldra F. (Eds) CRC Press, Boca Ratón, FL., USA 561-582.
 - Kang, S.I., Chang, Y.J., Oh, S. J., Kim, S.I. (1998) Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp. Biotechnol Lett 20, 983–986.
 - Kango, N. (2008). Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. Journal of Food Engineering, vol. 85 (3) 473-478.
 - Kango, N., Jain, S.C. (2011). Production and properties of microbial inulinases: recent advances. Food Biotechnol 4:165-212.
 - Kannaujia P.K., Bhan C., Asrey R., Prasad H. (2015) Enzymes and its importance in food processing: A review. Journal of Progressive Agriculture 6 (1) 71-74.
 - Kalra, K., & Kumari, R. (2017). Isolation and production of inulinase from banana peel by using *Aspergillus niger* under submerged fermentation. International Journal of Scientific and Research Publications, Volume 7, Issue 3, 464-461.
 - Kaur Gill, P., Manhas, R., Singh, P. (2006). Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. Bioresource Technology. 97. 894-902.
 - Kochhar, A., Kaur, N., & Gupta, A. K. (1997). Inulinase from *Aspergillus versicolor* is a potent enzyme for producing fructose from inulin. Journal of Scientific and Industrial Research, 56, 721–726.
 - Kulminskaya, A., Arand, M., Eneyskaya, E., Shishlyannikov, S., Saveliev, A., Korneeva, O., Neustroev, K. (2003). Biochemical characterization of *Aspergillus awamori* exoinulinase: substrate binding characteristics and regioselectivity of hydrolysis. Biochimica et Biophysica Acta 1650, 22– 29.
 - Kumar, G. P., Kunamneni, A., Prabhakar, T., Ellaiah, P. (2005). Optimization of process parameters for the production of inulinase from the newly isolated *Aspergillus niger* AUP19. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21, 1359-1361.

- Kumar, C. G., Sripada, S., Poornachandra, Y. (2018). Status and Future Prospects of Fructooligosaccharides as Nutraceuticals. *Role of Materials Science in Food Bioengineering*, 451–503.
- Lachman, J., Fernández, E., Orsák, M. (2003). Yacon [*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use a review. *Plant soil environment* 49(6), 283-289.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laowklom, N., Chantanaphan R., Pinphanichakarn, P. (2012). Production, Purification and Characterization of Inulinase from a Newly Isolated *Streptomyces* sp. CP01, *Natural Resources*, 3 (3), 137-144.
- Ledur Alles, M., J., Tessaro, I., C., Zapata Noreña C., P. (2015). Concentration and Purification of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Root fructooligosaccharides Using Membrane Technology. *Food Technol Biotechnol*. 2015 Jun; 53(2): 190–200.
- Leite, J., Murr, F., Martinelli, P., Dal Fabbro, I., Park, K. (2007) Optimization of a physical concentration process for inulin. *Journal of Food Engineering*, 80 (3), 832-838.
- Li, A.X., Guo, L.Z., Lu, W.D. (2012) Alkaline inulinase production by a newly isolated bacterium *Marinimicrobium* sp. LS-A18 and inulin hydrolysis by the enzyme. *World J Microbiol Biotechnol*. 28(1):81-9.
- Li, Y., Liu, G.-L., & Chi, Z.-M. (2013). Ethanol production from inulin and unsterilized meal of Jerusalem artichoke tubers by *Saccharomyces* sp. W0 expressing the endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp. *Bioresource Technology*, 147, 254–259.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934) Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56, (3), 658–666.
- Liu, G., L., Chi, Z., Chi, Z. (2013) Molecular characterization and expression of microbial inulinase genes, *Critical Reviews in Microbiology*, 39:2, 152-165.
- Liu, X.-Y., Chi, Z., Liu, G.-L., Wang, F., Madzak, C., & Chi, Z.-M. (2010). Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase. *Metabolic*

- Engineering, 12(5), 469–476.
- Lu, W.D., Li, A.X., Guo, Q.L. (2014). Production of novel alkalitolerant and thermostable inulinase from marine actinomycete *Nocardioopsis* sp. DN-K15 and inulin hydrolysis by the enzyme. *Ann Microbiol* 64: 441.
 - Ma, J., Cao, H., Tan, H., Hu, Z., Liu, W., Du, Y.G., Yin, H. (2016). Cloning, expression, characterization, and mutagenesis of a thermostable exoinulinase from *Kluyveromyces cicerisporus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 178, 144–158.
 - Ma, J., Li, Q., Tan, H., Hao, J., Li, K., Zhang, L., Shi, Q., Yin, H. (2019). Unique N-glycosylation of a recombinant exo-inulinase from *Kluyveromyces cicerisporus* and its effect on enzymatic activity and thermostability. *J Biol Eng* 13, 81.
 - Madrigal, L., Sangronis, E., (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57 (4).
 - Magadum, D. B., Yadav, G. D. (2018). Fermentative production, purification of inulinase from *Aspergillus terreus* MTCC 6324 and its application for hydrolysis of sucrose. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 293–299.
 - Manrique, I.; Hermann, M.; and Bernet, T. (2004). Yacon - Fact Sheet. International Potato Center (CIP) Lima, Perú. Recuperado de: <https://nqxms1019hx1xmtstxk3k9sko-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/PDF/factsheetyacon.pdf>
 - Manual Invitrogen (2014) Recuperado de: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf
 - Manpreet, S., Swaraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., Banerjee, U.C. (2005) Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malays J Microbiol* 1:1–9.
 - Matsumoto, M., Ohashi, K. (2003). Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*. *Biochemical Engineering Journal*, 14(1), 75–77.
 - Mazutti, M.A., Ceni, G., Di Luccio, M., Treichel, H. (2007). Production of

- inulinase by solid state fermentation: Effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 30, 297-304.
- Meyer, M.S.T., Miguel, M.S.A., Fernandez, R.E.D., Ortiz, D.M.G. (2015). Biotechnological production of oligosaccharides: applications in the Food industry. In: Eissa, A.H.A. (Ed.), *Food Production and Industry*. Intech, Rijeka, Croatia, (Chapter 2).
 - Mikami, S., Karita, S., Iwano, K., Shinoki, S., and Shimada, T., (1988). Purification and some properties of hydrolases from shochu koji (*Aspergillus kawachii*). *Nippon Nogeikgaku Kaishi*, 62, 867-874.
 - Moriyama, S., Tanaka, H., Uwataki, M., Muguruma, M., & Ohta, K. (2003). Molecular cloning and characterization of an exoinulinase gene from *Aspergillus niger* strain 12 and its expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(4), 324–331.
 - Nakamura, T., Ogata, Y., Shitara, A., Nakamura, A., Ohta, K. (1995) Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *J Ferment Bioeng* 80,164–169.
 - Neeraj, G., Ravi, S., Somdutt, R., Aishvarya, S., Ravi, K., Kumar, V., V. (2017) Immobilized inulinase: a new horizon of paramount importance driving the production of sweetener and prebiotics. *Critical Reviews in Biotechnology* 38 (3) 1-14.
 - Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric-focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255–262.
 - Nguyen, Q. D., Rezessy Szabo, J. M., Czukor, B., Hoschke, A. (2011). Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase. *Process Biochemistry*, 46, 298- 303.
 - Ojansivu, I.; Ferreira, C.L., Salminen, S. (2011). Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 22 (1), 40-46.
 - Pandey, A., Soccol, C., Selvakumar, P., Soccol, V., Krieger, N. y Fontana, J.,

- (1999). Recent Developments in Microbial Inulinases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 81, 35-52.
- Pessoni, R., Ribeiro, R., Braga, M. (1999). Extracellular inulinases from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteraceae). *Journal of Applied Microbiology*, 87: 141- 147.
 - Qiu, J., Han, H., Sun, B., Chen, L., Yu, C., Peng, R., & Yao, Q. (2016). Residue mutations of xylanase in *Aspergillus kawachii* alter its optimum pH. *Microbiological Research*, 182, 1–7.
 - Rawat, H., Soni, H., Treichel, H., Kango, N. (2017) Biotechnological potential of microbial inulinases: Recent perspective, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57:18, 3818-3829.
 - Ricca, E., Calabró, V., Curcio, S. and Dorio, G., (2007). The State of the Art in the Production of Fructose from inulin Enzymatic Hydrolysis. *Crit Rev Biotechnol*, 27, 129-145.
 - Saber, W.I.A., El-Naggar, N.E. (2009). Optimization of fermentation conditions for the biosynthesis of inulinase by the new source; *Aspergillus tamaris* and hydrolysis of some inulin containing agro-wastes. *Biotechnology*, vol. 8, (4), 425-433.
 - Sambrook, J., Fritschi, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 - Schotte, P., Dewerte, I., De Groeve, M., De Keyser, S., De Brabandere, V., Stanssens, P. (2016). *Pichia pastoris* Mut^s strains are prone to misincorporation of O-methyl-L-homoserine at methionine residues when methanol is used as the sole carbon source. *Microbial Cell Factories*, 15, 98.
 - Scorer, C., Buckholz, R., Clare, J., Romanes, M. (1993) The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 136 (1-2), 111-119.
 - Serrano-Rivero, Y., Marrero-Domínguez, K., Fando-Calzada, R. (2016) *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 47 (2) 67-77.
 - Sharma, A.D., Nanda, J.S., Gill, P.K., Bhullar, S.S., Singh, P., & Vyas, D. (2002). Enhancement in Inulinase Production by Mutagenesis in *Penicillium*

- purpurogenum*. Indian Journal of Biotechnology 1: 270-274.
- Sharma, A.D., Kainth, S., Gill P.K, (2006). Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. J. Food Eng., 77: 486-491.
 - Sheng, J.; Chi, Z.M.; Gong, F., Li, J. (2008). Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase. Applied Biochemistry and Biotechnology, 144 (2) 111-121.
 - Singh, P., Kaur Gill, P., (2006). Production of Inulinases: Recent Advances. Food Technology and Biotechnology, 44, 151–162.
 - Singh, R.S., Singh H., Sooch, B., Puri, M. (2007). Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. Bioresource Technology, 98 (13) 2518-2525.
 - Singh, R.S.; Bhermi, H.K. (2008). Production of extracellular exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root tubers of *Asparagus officinalis*. Bioresource Technology, 99 (15) 7418-7423.
 - Singh, R.S., Singh, R.P. (2010) Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential. Food Technol Biotechnol; 48: 435-50.
 - Singh, R., Tiwari, M., Singh, R., Lee, J.K. (2013). From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. International Journal of Molecular Sciences, 14(1), 1232–1277.
 - Singh, R. S., Singh, R. P. (2017). Inulinases. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, 423–446.
 - Singh, R. S., Chauhan, K., Kennedy, J. F. (2017). A panorama of bacterial inulinases: Production, purification, characterization and industrial applications. International Journal of Biological Macromolecules, 96, 312–322.
 - Singh, R. S., Singh, R. P., Kennedy, J. F. (2018). Immobilization of yeast inulinase on chitosan beads for the hydrolysis of inulin in a batch system. International Journal of Biological Macromolecules, 95, 87–93.

- Singh, R.S., Singh, T. (2019) Microbial inulinases and pullulanases in the food industry. *Microbial Enzymes and Additives for the Food*. Capítulo 2 Nova Science Publishers, Inc. (e-Book) 23-52.
- Skowronek, M., Fiedurek, J. (2004). Optimisation of Inulinase Production by *Aspergillus niger* Using Simplex and Classical Method. *Food Technology and Biotechnology* 42 (3) 141–146.
- Souza Motta C.M., Cavalcanti M.A.Q., Porto A.L.F., Moreira K.A., Lima Filho J.L. (2005) *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production. *Braz. Arch. Biol. Technol.*; 48,343-350.
- Sutay Kocabaş, D., Grumet, R. (2019). Evolving regulatory policies regarding food enzymes produced by recombinant microorganisms. *GM Crops & Food*, 1–17.
- Tanriseven, A., Aslan, Y. (2005). Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), 550–554.
- Trivedi, S., Divecha, J., Shah, A. (2012). Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates. *Carbohydrate Polymers*. 90. 483–490.
- Trivedi, S., Divecha, J., Tapan S., Shah, A. (2015). Rapid and efficient bioconversion of chicory inulin to fructose by immobilized thermostable inulinase from *Aspergillus tubingensis* CR16. *Bioresources and Bioprocessing*. 2. 32.
- Valluru, R., Van den Ende, W., (2008). Plant fructans in stress environments: Emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 2905-2916.
- van Burik, J.A., Schreckhise, R.W., White, T.C., Bowden R.A, Myerson D. (1998) Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi, *Medical Mycology*, 36 (5) 299–303.
- Vanz, A. L., Lünsdorf, H, Adnan, A., Nimtz, M., Gurramkonda, C., Khanna, N., Rinas, U. (2012) Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes. *Microb Cell*

Fact 11:103.

- Vargas G. (2009) Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino. Tesis doctoral. Recuperado de: <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/5701>
- Valerio, S., Alves, J., Klein, M., Rodrigues, R., Hertz, P. (2013). High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles. *Carbohydrate polymers*. 92. 462-468.
- Vijayaraghavan, K., Yamini, D., Ambika, V., Sravya, N. (2009) Trends in inulinase production – a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 29(1) 67–77.
- Wang, J., Jin, Z.Y., Jiang B., Adamu A. (2003) Production and separation of exo-and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*. *Process Biochemistry*, 30 (1) 5-11.
- Wang, J.M., Zhang, T., Chi, Z., Liu, G.L., Chi, Z.M. (2011). 18S rDNA integration of the exo-inulinase gene into chromosomes of the high ethanol producing yeast *Saccharomyces* sp. W0 for direct conversion of inulin to bioethanol. *Biomass and Bioenergy*, 35(7), 3032–3039.
- Wang, L., Du, Y., Meng, X., Long, X., Liu, Z., Shao, H. (2014) Direct production of bioethanol from Jerusalem artichoke inulin by gene-engineering *Saccharomyces cerevisiae* 6525 with exoinulinase gene. *Plant Biosystems* 148:133-139.
- Yewale, T., Singhal, R., Vaidya, A. (2013). Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* NCIM 945 on chitosan and its application in continuous inulin hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2. 96-101.
- Yousefi Mokri, M., Sharafi, A., Rezaei, S., Sadeghian-Abadi, S., Imanparast, S., Mogharabi-Manzari, M., Faramarzi, M. A. (2019). Enzymatic hydrolysis of inulin by an immobilized extremophilic inulinase from the halophile bacterium *Alkalibacillus filiformis*. *Carbohydrate Research*, 483, 107746.
- Yuan, W., Bai, F. (2008) Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* Y1. *J Biotechnol* 136:290–344
- Zakaria, Z. Umi, S., Mokhtar, S., Mokhtar, U., Zamberi, Z., Aziz, A., Boon P.

- (2013). An alternate method for DNA and RNA extraction from clotted blood. *Genetics and molecular research: GMR*. 12. 302-311.
- Zhang, L., Zhao, C., Zhu, D., Ohta, Y., Wang, Y. (2004) Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AF10 expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.*35(2):272-275
 - Zhang, J., Wang, X., Zheng, Y., Fang, G., Wei, D. (2008) Enhancing yield of S-adenosylmethionine in *Pichia pastoris* by controlling NH₄⁺ concentration. *J Biosci Bioeng.* 3:63–67.
 - Zhang, T., Gong, F., Peng, Y., Chi, Z. (2009). Optimization for high-level expression of the *Pichia guilliermondii* recombinant inulinase in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant inulinase. *Process Biochemistry* 44 (12) 1335-1339.
 - Zhou, Q., Su, Z., Jiao, L., Wang, Y., Yang, K., Li, W., Yan Y. (2020) High-Level Production of a Thermostable Mutant of *Yarrowia lipolytica* Lipase 2 in *Pichia pastoris*. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 279: 1-14
 - Xu, Y., Zheng, Z., Xu, Q., Yong, Q., & Ouyang, J. (2016). Efficient Conversion of Inulin to Inulooligosaccharides through Endoinulinase from *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(12), 2612–2618.

APÉNDICES

APÉNDICE 1 (Capítulo II)

1. Alineamiento de secuencia de gen inulinasa de *A. kawachii* y *A. awamori*

Sombreado en amarillo se indica el péptido señal, en celeste el intrón, y en gris el codón de terminación.

ATGGCTCCTCTGTCGAAGGCCCTAAGTGTTTTTATGTTGATGGGCATTAC pPIC9: inuAK

|||||

atggctcctctgtcgaagccctaagtgtttttatgttgatgggcattac *inu1*

ATATGCCTTCAACTATGACCAGCCTTATCGTGGTCAATACCATTCTCAC pPIC9: inuAK

|||||

atatgccttcaactatgaccagccttatcgtggtcaataccatttctcac *inu1*

CCCAGAAGAAGTGGATGAATGACCCCAATGGGCTCTTATACCACAATGGA pPIC9: inuAK

|||||

cccagaagaactggatgaatgaccccaatgggctcttataaccacaatgga *inu1*

ACCTACCATCTGTTCTTCCAATACAACCCTGGTGGCATCGAGTGGGGAAA pPIC9: inuAK

|||||

acctaccatctgttcttccaataacaaccctggtggcatcgagtggggaaa *inu1*

CATATCATGGGGGCATGCTATCAGTGAGGATCTCACCCACTGGGAGGAGA pPIC9: inuAK

|||||

catatcatgggggcatgctatcagtgaggatctcaccactgggaggaga *inu1*

AGCCTGTTGCCCTTCTGGCCGAGGATTTGGCAGCGATGTCACCGAGATG pPIC9: inuAK

|||||

agcctgttgcccttctggccgaggatttggcagcgatgtcaccgagatg *inu1*

TACTTCAGCGGAAGTGTGTTGCCGATGTCAACAACACGAGTGGCTTTGG pPIC9: inuAK

|||||

TCCCCCTTGACAGCGGAAACTCCACAAAATGGGTCATCACAAGCGGACTG pPIC9: inuAK
 |||
 tcccccttgacagcggaaactccacaaaatgggtcatcacaagcggactg inu1

AACCCTGGTGGTCCCCAGGCACTGTCGGCTCCGGAACCCAGTACTTCGT pPIC9: inuAK
 |||
 aaccctggtggtccccaggcactgtcggctccggaacccagtacttcgt inu1

GGGAGAGTTCGACGGAACCACATTCACGCCTGACGCCGACACAGTGTACC pPIC9: inuAK
 |||
 gggagagttcgacggaaccacattcacgcctgacgccgacacagtgtacc inu1

CAGGAAACTCCACCGCAAACCTGGATGGACTGGGGCCCGGACTTTTATGCC pPIC9: inuAK
 |||
 caggaaactccaccgcaaactggatggactggggcccgacttttatgcc inu1

GCAGCTGGTTACAATGGCCTCTCGCTGAACGACCACGTCCATATTGGCTG pPIC9: inuAK
 |||
 gcagctggttacaatggcctctcgctgaacgaccacgtccatattggctg inu1

GATGAACAACCTGGCAGTATGGCGCAAACATCCCTACCTACCCCTGGCGCA pPIC9: inuAK
 |||
 gatgaacaactggcagtatggcgcaaacatccctacctaccctggcgca inu1

GCGCCATGGCCATTCCCCGCCACATGGCCCTAAAGACCGTTGGCAGCAAA pPIC9: inuAK
 |||
 gcgccatggccattccccgccacatggccctaaagaccgattggcagcaaa inu1

GCAACCCTAGTCCAGCAACCCAGGAAGCGTGGTCTTCTATCTCGAACAA pPIC9: inuAK
 |||
 gcaaccctagtccagcaacccaggaagcgtggtcttctatctcgaacaa inu1

GCGTCCGATCTATTACGCACATTCAAGACTCTCTCTGAAGGCTCCACCA pPIC9: inuAK
 |||
 gcgtccgatctattacgcacattcaagactctctctgaaggctccacca inu1

ACACAACCACAACCGGAGAGACATTCAAAGTGGACTTGAGTTTCTCTGCT pPIC9: inuAK
 |||

acacaaccacaaccggagagacattcaaagtggacttgagtttctctgct	<i>inu1</i>
AAGTCTAAGGCCTCAACATTTGCAATTGCCCTCCGAGCATCCGCCAACTT	pPIC9: <i>inuAK</i>
aagtctaaggcctcaacatttgcaattgccctccgagcatccgccaactt	<i>inu1</i>
CACCGAGCAGACCCTCGTTGGCTATGACTTCGCCAAGCAGCAAATCTTCC	pPIC9: <i>inuAK</i>
caccgagcagaccctcgttggtatgacttcgccaagcagcaaattctcc	<i>inu1</i>
TTGACCGTACACACTCCGGAGACGTGTCATTTCGATGAGACCTTCGCGAGC	pPIC9: <i>inuAK</i>
ttgaccgtacacactccggagacgtgtcattcgatgagaccttcgcgagc	<i>inu1</i>
GTCTATCATGGACCTCTGACGCCGGATAGCACTGGTGTGGTGAAGTTGAG	pPIC9: <i>inuAK</i>
gtctatcatggacctctgacgccggatagcactggtgtggtgaagttgag	<i>inu1</i>
TATCTTCGTCGATAGGTCCAGCGTCGAGGTGTTTGGCGGCCAGGGCGAGA	pPIC9: <i>inuAK</i>
tatcttcgctcgataggtccagcgtcgaggtgtttggcggccagggcgaga	<i>inu1</i>
CAACCCTGACGGCTCAGATTTTCCAAGCAGTGATGCGGTTACGCCCCT	pPIC9: <i>inuAK</i>
caaccctgacggctcagatTTTCCAAGCAGTGATGCGGTTACGCCCCT	<i>inu1</i>
CTGGCGTCTACTGGTGGAACTACCGAGGATGTTAGAGCTGACATCTACAA	pPIC9: <i>inuAK</i>
ctggcgtctactggtggaactaccgaggatgtagagctgacatctaaa	<i>inu1</i>
GATTGCTTCGACGTGGAATTTGA	pPIC9: <i>inuAK</i>
Gattgcttcgacgtggaattga	<i>inu1</i>

2. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de *A. kawachii* IFO 4308 y secuencias aminoacídicas de hongos cercanos filogenéticamente.

Letras sombreadas en rosa presentan igual porcentaje de identidad.

Secuencias conservadas se encuentran subrayadas. Las secuencias que corresponden a inulinasas usadas en el alineamiento fueron *Aspergillus awamori* (CAC44220.1); *Aspergillus niger* (A2R0E0.1); *Aspergillus ficuum* (ADM21204.1).

	10	20	30	40	50
	*	*	*	*	*
<i>A. kawachii</i>	MAPLSKALSVFMLMGITYAFNYDQPYRGQYHFSPQKNWMNDPNGLLYHNG				
<i>A. awamori</i>	MAPLSKALSVFMLMGITYAFNYDQPYRGQYHFSPQKNWMNDPNGLLYHNG				
<i>A. niger</i>	MARLLKAVTVCALAGIAHAFNYDQPYRGQYHFSPQKNWMNDPNGLLYHNG				
<i>A. ficuum</i>	MARLLKAVTVCALAGIAHAFNYDQPYRGQYHFSPQKNWMNDPNGLLYHNG				
	60	70	80	90	100
	*	*	*	*	*
<i>A. kawachii</i>	TYHLFFQYNPGGIEWGNISWGHAI SEDLTHWEEKPVALLARGFGSDVTEM				
<i>A. awamori</i>	TYHLFFQYNPGGIEWGNISWGHAI SEDLTHWEEKPVALLARGFGSDVTEM				
<i>A. niger</i>	TYHLFFQYNPGGIEWGNISWGHAT SEDLTHWEEQPVALLARGYGSVDTEM				
<i>A. ficuum</i>	TYHLFFQYNPGGIEWGNISWGHAT SEDLTHWEEQPVALLARGYGSVDTEM				
	110	120	130	140	150
	*	*	*	*	*
<i>A. kawachii</i>	YFSGSAVADV NNTSGFGKDGKTPLVAMYTSYYPVAQTLP SGQTVQEDQQS				
<i>A. awamori</i>	YFSGSAVADV NNTSGFGKDGKTPLVAMYTSYYPVAQTLP SGQTVQEDQQS				
<i>A. niger</i>	YFSGSAVADV NNTSGFGKDGKTPLVAMYTSYYPVAQTLP SGQTVQEDQQS				
<i>A. ficuum</i>	YFSGSAVADV NNTSGFGKDGKTPLVAMYTSYYPVAQTLP SGQTVQEDQQS				
	160	170	180	190	200
	*	*	*	*	*
<i>A. kawachii</i>	QSIAYSLDDGLTWTTTYDAANPVIPNPP SPYEA EYQNFRDPFVFWHDESQK				
<i>A. awamori</i>	QSIAYSLDDGLTWTTTYDAANPVIPNPP SPYEA EYQNFRDPFVFWHDESQK				
<i>A. niger</i>	QSIAYSLDDGLTWTTTYDAANPVIPNPP QPYQAQYQNFRDPFVFWHDESQK				
<i>A. ficuum</i>	QSIAYSLDDGLTWTTTYDAANPVIPNPP QPYQAQYQNFRDPFVFWHDESHK				
	210	220	230	240	250
	*	*	*	*	*
<i>A. kawachii</i>	WVVVTSIAELHKLAIYTS DNLDKDWKLVSEFGPYNAQGGVWECPLVVKLPL				
<i>A. awamori</i>	WVVVTSIAELHKLAIYTS DNLDKDWKLVSEFGPYNAQGGVWECPLVVKLPL				
<i>A. niger</i>	WVVVTSIAELHKLAIYTS DNLDKDWKLVSEFGPYNAQGGVWECPLFKLPL				
<i>A. ficuum</i>	WVVVTSIAELHKLAIYTS DNLDKDWKLVSEFGPYNAQGGVWECPLFKLPL				
	260	270	280	290	300
	*	*	*	*	*
<i>A. kawachii</i>	DSGNSTKWVIT SGLNPGGPPGT VSGTQYFVGEFDGTTFTPDADTVYPGN				
<i>A. awamori</i>	DSGNSTKWVIT SGLNPGGPPGT VSGTQYFVGEFDGTTFTPDADTVYPGN				
<i>A. niger</i>	DGSSTKWVIT SGLNPGGPPGT VSGTQYFVGEFDGTTFTPDADTVYPGN				
<i>A. ficuum</i>	DGSSTKWVIT SGLNPGGPPGT VSGTQYFVGEFDGTTFTPDADTVYPGN				
	310	320	330	340	350
	*	*	*	*	*
<i>A. kawachii</i>	STANWMDWGPDFYAAAGYNGLS LNDHVHIGWMNNWQYGANIPTYPWRSAM				
<i>A. awamori</i>	STANWMDWGPDFYAAAGYNGLS LNDHVHIGWMNNWQYGANIPTYPWRSAM				
<i>A. niger</i>	STANWMDWGPDFYAAAGYNGLS IKD HVHIGWMNNWQYGANIPTYPWRSAM				
<i>A. ficuum</i>	STANWMDWGPDFYAAAGYNGLS IKD HVHIGWMNNWQYGANIPTYPWRSAM				

	360	370	380	390	400
	*	*	*	*	*
<i>A. kawachii</i>	AIPRHMALKTIGSKATLVQQPQEAWSSISNKRPIYSRTFKTLSEGSTNTT				
<i>A. awamori</i>	AIPRHMALKTIGSKATLVQQPQEAWSSISNKRPIYSRTFKTLSEGSTNTT				
<i>A. niger</i>	AIPRHLALKTINNKTTLVQQPQEAWSSISSKHPLYSRYSYTFSEGSTNAS				
<i>A. ficuum</i>	AIPRHLALKTINNKTTLVQQPQEAWSSISSKHPLYSRYSYTFSEGSTNAS				
	410	420	430	440	450
	*	*	*	*	*
<i>A. kawachii</i>	TTGETFKVDLSFSAKSKASTFAIALRASANFTEQTLVGYDFAKQQIFLDR				
<i>A. awamori</i>	TTGETFKVDLSFSAKSKASTFAIALRASANFTEQTLVGYDFAKQQIFLDR				
<i>A. niger</i>	TTGETFRVDLSFSATSKASTFAIALRASANFTEQTLVGYDFAKQQIFLDR				
<i>A. ficuum</i>	TTGETFRVDLSFSATSKASTFAIALRASANFTEQTLVGYDFAKQQIFLDR				
	460	470	480	490	500
	*	*	*	*	*
<i>A. kawachii</i>	THSGDVSFDETFASVYHGPLTPDSTGVVKLSIFVDRSSVEVFGGQGETTL				
<i>A. awamori</i>	THSGDVSFDETFASVYHGPLTPDSTGVVKLSIFVDRSSVEVFGGQGETTL				
<i>A. niger</i>	TKSGDVSFDNTFASVYHGPLVPDSTSMVRLSIFVDRSSVEVFGGQGETSL				
<i>A. ficuum</i>	TKSGDVSFDNTFASVYHGPLVPDSTGMVRLSIFVDRSSVEVFGGQGETTL				
	510	520	530		
	*	*	*		
<i>A. kawachii</i>	TAQIFPSSDAVHARLASTGGTTEDVRADIYKIASTWN				
<i>A. awamori</i>	TAQIFPSSDAVHARLASTGGTTEDVRADIYKIASTWN				
<i>A. niger</i>	TAQIFPSSDAVHARLVSTGGATEDVRVDVHINITSTWN				
<i>A. ficuum</i>	TAQIFPSSDAVHARLVSTGGATEDVRVDVHINITSTWN				

APÉNDICE 2 (Capítulo II)

Informes de los resultados del análisis de las proteínas expresadas en Pichia pastoris por Mapeo peptídico realizados en el Instituto Pasteur de Montevideo.

Se presentan los resultados del clon 1 y 2

Institut Pasteur de Montevideo

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Facultad de Ciencias

Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas

Nombre: Mariana Chesini

Fecha: 05-07-2012

Objetivo del análisis:

Identificación de proteínas por mapeo peptídico.

Datos relevantes:

Peptide mass fingerprinting of protein selected spots was carried out by in-gel trypsin treatment Sequencing-grade Promega) overnight at 37°C. Peptides were extracted from the gels using 60 % acetonitrile in 0.2 % TFA, concentrated by vacuum drying and desalted using C18 reverse phase micro- columns (OMIX Pippete tips, Varian). Peptide elution from micro-column was performed directly into the mass spectrometer sample plate with 3 µl of matrix solution(α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 60 % aqueous acetonitrile containing 0.2 % TFA)

Mass spectra of digestion mixtures were acquired in a 4800 MALDI-TOF/TOF instrument (Applied Biosystems) in reflector mode and were externally calibrated using a mixture of peptide standards (Applied Biosystems). Collision-induced dissociation MS/MS experiments of selected peptides were performed.

Proteins were identified by NCBI nr database searching with peptide m/z values using the MASCOT program and using the following search parameters: monoisotopic mass tolerance, 0.05 Da; fragment mass tolerance, 0.25 Da; methionine oxidation, as possible modifications and one missed tryptic cleavage allowed.

Utilizando datos de ms y ms/ms, se identificaron las siguientes proteínas:

Rotulo de la muestra	Masa mol. en el gel (kDa.)	Proteína identificada por EM	Masa mol. teórica (kDa.)
Clon 1	37	"Exo-Inulinase From <i>Aspergillus awamori</i> "	57
Clon 2	37	"Exo-Inulinase From <i>Aspergillus awamori</i> "	57
Clon 3	32	"Exo-Inulinase From <i>Aspergillus awamori</i> "	57
Clon 5	34	"Exo-Inulinase From <i>Aspergillus awamori</i> "	57

Muestra: clon 1

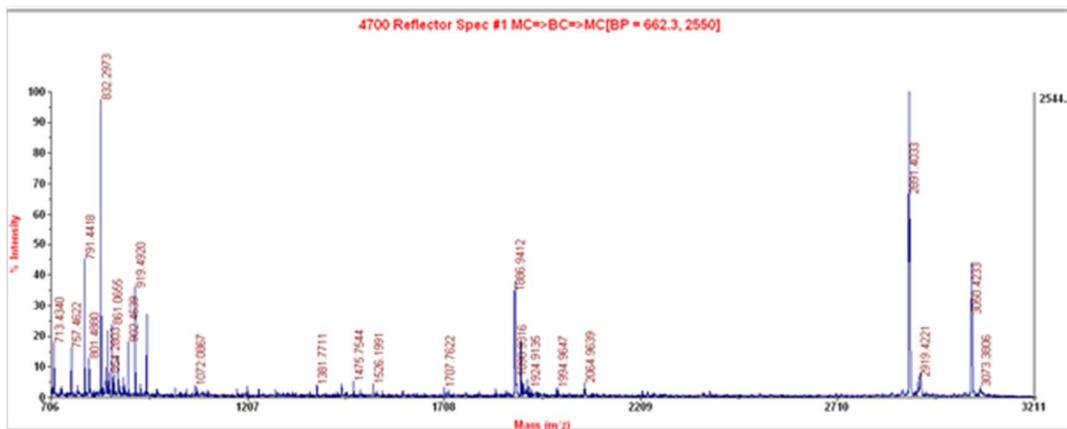
Placa: Junio 2012

Posición : P18

Spectro de masa obtenido en modo reflector positivo

(seleccionar imagen y aumentar el zoom para ver la imagen correctamente)

Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:



712.2374, 713.4340, 757.4622

791.4418 ions(175.1467, 183.1590, 184.0869, 190.0791, 200.1938, 211.1625, 254.1586, 268.1435, 311.3027, 367.2566, 530.3359, 538.3397, 548.3182, 589.4381, 598.2991, 602.9982, 605.3966, 617.3917, 635.3922, 637.2827, 637.5491, 720.4551, 731.3680, 732.2431)

801.4880, 804.2672, 832.2973, 834.3021, 845.0967, 845.5189, 849.4703, 861.0655, 877.0406, 902.4639, 919.4920, 933.5660, 949.5384, 1072.0867, 1381.7711, 1383.6991, 1446.6747, 1475.7544, 1526.1991, 1526.7150, 1707.7622

1886.9412 ions(159.0965, 173.1174, 174.1218, 187.1204, 213.1700, 226.1397, 228.1209, 230.1286, 243.0804, 245.1641, 257.1390, 258.1475, 259.0960, 268.1771, 286.1983, 348.2446, 355.1605, 385.2732, 426.0960, 426.2506, 483.2506, 513.3002, 548.2621, 555.2745, 584.2617, 612.1962, 635.3701, 641.3198, 641.4520, 804.4649, 821.4574, 892.5135, 1021.5940, 1066.6505, 1228.7393, 1246.7147, 1250.7079, 1339.8015, 1375.6772, 1502.8040)

1890.9316, 1891.9413, 1902.9277, 1908.9247, 1918.9288, 1924.9135, 1994.9647, 2064.9639

2891.4033 ions(175.1148, 200.1182, 209.0772, 215.1216, 220.1102, 237.1423, 246.1694, 247.1683, 256.1676, 308.1678, 366.1510, 383.2089, 387.1204, 403.1597, 414.1607, 458.1635, 482.2895, 484.1391, 502.2034, 536.2506, 553.3224, 555.3709, 650.3324, 651.3292, 668.1971, 668.4170, 694.2021, 755.2722, 755.4529, 922.4673, 939.4752, 1069.5896, 1086.4528, 1086.7089, 1310.6111, 1327.8171, 1398.8828, 1500.8169, 1613.0654, 1714.1371, 1815.2310, 2001.3353, 2244.4060, 2472.7063, 2489.6873, 2490.4590, 2493.0063, 2717.3240, 2735.1260)

2913.3726, 2917.3718, 2918.3972, 2919.4221

3050.4233 ions(210.5271, 221.0858, 231.1315, 237.4607, 239.1060, 240.0966, 245.0000, 272.9440, 361.1561, 383.1408, 389.2042, 398.2464, 485.2274, 488.1095, 503.2676, 506.1748, 524.1932, 535.3707, 553.2210, 553.3468, 590.3868, 802.4472, 1113.8105, 1152.5165, 1170.7435, 1307.8586, 1470.8987, 1569.9890, 1656.9670, 1728.1268, 1744.0165, 1853.0507, 1876.2616, 1881.0721, 1938.1208, 1976.3098, 2105.3630, 2121.2163, 2221.4365, 2232.2798, 2249.4458, 2250.2969, 2461.4170, 2553.5193, 2554.6467, 2807.2891, 2814.5452, 2922.9172)

3073.3806

Search Parameters

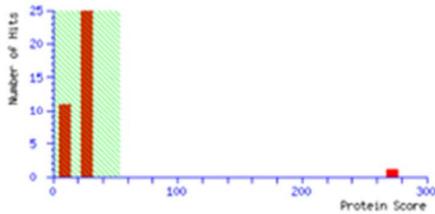
Type of search : Sequence Query
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : [Oxidation \(M\)](#)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.05 Da
 Fragment Mass Tolerance: ± 0.3 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-TOF-TOF
 Number of queries : 41

Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

(www.matrixscience.com)

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 53 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) [Help](#)

Significance threshold p< 0.05 Max. number of hits 20

Standard scoring: MudPIT scoring Ions score or expect cut-off 0 Show sub-sets 0

Show pop-ups: Suppress pop-ups Sort unassigned Decreasing Score Require bold red

Select All Select None Search Selected Error tolerant

1. [g1114787237](#) Mass: 59134 Score: 273 Matches: 3(3) Sequences: 3(3)
 exo-inulinase [Aspergillus awamori]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 26	1886.9412	1885.9339	1885.9534	-0.0194	0	84	3.7e-05	1	U	K.ATLVQQPQERMSISNK.R
<input checked="" type="checkbox"/> 35	2891.4033	2890.3960	2890.4097	-0.0137	0	120	4.4e-09	1	U	R.SSVEVGGQGETTLTAQIFPSSDRAVGR.L
<input checked="" type="checkbox"/> 40	3050.4233	3049.4160	3049.4306	-0.0145	0	69	0.00035	1	U	R.TISGDVSEDETFRASVQHGPLTPDSTGVVK.L

Link al resultado:

http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20120705/FtGmCGHET.dat#Hit11

Link al protein summary:

http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20120705/FtGmCGHET.dat&REPTYPE=protein&sigthreshold=0.05&REPORT=20&minpeplen=7&servermudpitswitch=99999999&ignoreionsscorebelow=0&showsubsets=0&showpopups=TRUE&sortunassigned=scoredown&requireboldred=0

Link al protein view:

http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=../data/20120705/FtGmCGHET.dat&hit=1

Conclusión: En esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa la proteína “Exo-Inulinase From *Aspergillus awamori*”

Muestra: clon 2

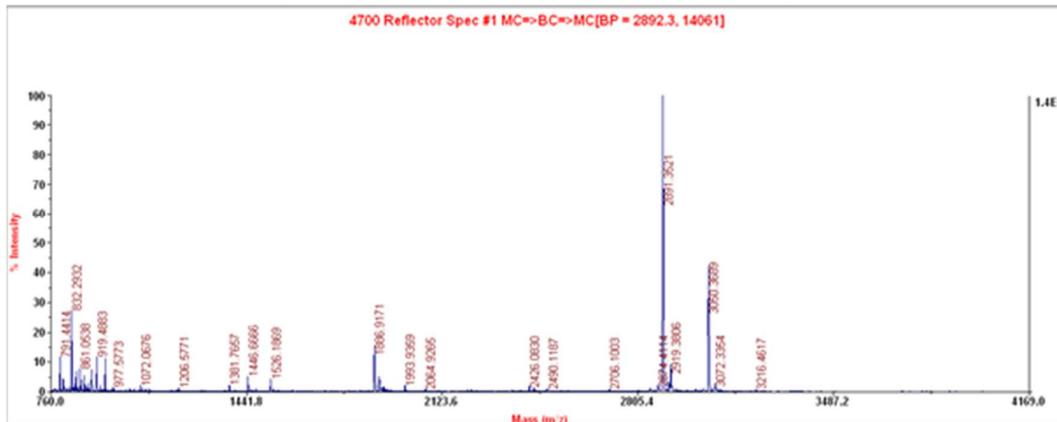
Placa: Junio 2012

Posición : P19

Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo

(seleccionar imagen y aumentar el zoom para ver la imagen correctamente)

Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:



791.4414, 801.4790, 804.2623, 832.2932, 834.2971, 845.0799, 845.5060, 849.4672, 861.0538, 867.0598, 877.0301, 889.5314, 902.4609, 919.4883, 933.5530, 949.5321, 977.5773, 1072.0676, 1078.0768, 1206.5771, 1381.7657, 1446.1748, 1446.6666, 1475.7377, 1525.6852, 1526.1869, 1534.6731

1886.9171 ions(173.0712, 215.0602, 226.1198, 227.1191, 228.1242, 240.1314, 257.1460, 261.1276, 268.1919, 286.1899, 341.1783, 355.1448, 357.2236, 364.3088, 369.1308, 385.2846, 426.1702, 426.2854, 513.2045, 525.6251, 530.3417, 538.3056, 548.2957, 584.2540, 623.3785, 635.3362, 641.3837, 699.4160, 740.3953, 768.3365, 821.4341, 875.4535, 892.5052, 995.5787, 1021.5552, 1022.0571, 1066.5858, 1211.7551, 1212.6433, 1228.7449, 1246.7119, 1250.6866, 1253.7795, 1339.7966, 1374.7593, 1375.8826, 1503.8461, 1504.7452)

1890.9135, 1891.9139, 1902.9138, 1908.9020, 1914.9181, 1918.9104, 1924.8911, 1993.9359, 2064.9265, 2426.0830, 2442.0815, 2490.1187, 2706.1003, 2874.4114

2891.3521 ions(175.1064, 200.0860, 209.0882, 226.0740, 227.0957, 229.0808, 246.1427, 256.1017, 308.1427, 323.1467, 366.1415, 383.1920, 403.1516, 458.1568, 482.2715, 502.2032, 536.2485, 553.3138, 557.2033, 650.3350, 651.3153, 668.2917, 668.4183, 669.3034, 694.3126, 922.4244, 939.5091, 1069.5188, 1086.6392, 1182.6080, 1199.7006, 1310.7147, 1398.8309, 1482.8153, 1499.9388, 1613.0280, 1714.1055, 1815.1913, 2001.3707, 2489.4829)

2908.3308, 2913.3201, 2917.3450, 2918.3691, 2919.3806, 2936.3049, 3034.4443

3050.3689 ions(155.0670, 175.1213, 195.0784, 209.0755, 227.0821, 230.0727, 239.1072, 246.1060, 301.0825, 360.2059, 383.1053, 498.1141, 553.2668, 597.1752, 669.3565, 684.2012, 802.4479, 903.3665, 1113.6584, 1170.6770, 1307.7594, 1309.5797, 1309.8793, 1470.8766, 1569.9507, 1581.8198, 1657.0288, 1728.0781, 1743.9838, 1854.0453, 1875.2153, 1881.0590, 1938.0817, 1976.2163, 2087.3105, 2105.3403,

2107.2388, 2121.2092, 2148.3098, 2150.2092, 2205.3652, 2221.3103, 2231.3130, 2233.2075, 2249.2949, 2461.4219, 2464.3130, 2536.6682, 2553.5923, 2812.6902)

3072.3354, 3077.3711, 3216.4617

Search Parameters

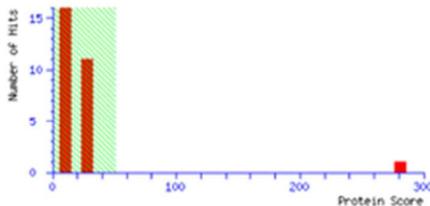
Type of search : Sequence Query
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : [Oxidation \(M\)](#)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da
 Fragment Mass Tolerance: ± 0.3 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-TOF-TOF
 Number of queries : 54

Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

(www.matrixscience.com)

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 51 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As: Peptide Summary [Help](#)

Significance threshold p < 0.05 Max. number of hits 20

Standard scoring: MudPIT scoring Ions score or expect cut-off 0 Show sub-sets 0

Show pop-ups: Suppress pop-ups Sort unassigned Decreasing Score Require bold red

 Error tolerant

1. [gi114787237](#) Mass: 59134 Score: 281 Matches: 3(3) Sequences: 3(3)
 exo-inulinase [Aspergillus awamori]

Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 28	1886.9171	1885.9098	1885.9534	-0.0435	0	61	0.011	1	U	K.ATLVQIQEAMSSISNK.R
<input checked="" type="checkbox"/> 43	2891.3521	2890.3448	2890.4097	-0.0649	0	134	2.1e-10	1	U	R.SSVEVFGGQETTLTAQIFPSSDRVQGR.L
<input checked="" type="checkbox"/> 51	3050.3689	3049.3616	3049.4306	-0.0689	0	87	5.2e-06	1	U	R.THSGVSEDETFAVQHGFLTPDSTGVVK.L

Link al resultado:

http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20120705/FtGmCGEaL.dat

Link al protein summary report:

http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=..%2Fdata%2F20120705%2FFtGmCGEaL.dat&REPTYPE=protein&sigthreshold=0.05&REPORT=20&minpeplen=7&server_mudpit_switch=99999999&ignoreionsscorebelow=0&showsubsets=0&showpopups=TRUE&sortunassigned=scoredown&requireboldred=0

Link al protein view:

http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=..%2Fdata%2F20120705%2FFtGmCGEaL.dat&hit=1

Conclusión:

- En esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa a la proteína “Exo-Inulinase From *Aspergillus awamori*”.

APÉNDICE 3 (Capítulo III) Cultivo de *Pichia pastoris* en biorreactor de 5 l. Resultados de las mediciones realizadas

Muestra	Tiempo (h)	Volumen (ml)	rpm	% O ₂ disuelto	%O ₂ salida	% CO ₂ salida	r _{o2} (mol/l*h)	v*r _{o2} (mol/h)	r _{co2} (mol/l*h)	v*r _{co2} (mol/h)	Glicerol (g/l)	pH	Biomasa (g/l)	DO (600 nm)	Proteínas (mg/l)	Actividad inulinasa (U/ml)
T0	0,0	3000	300	89,30	20,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	33,3	5,4	1,10	2,1	-	-
T1	15,8	2975	300	43,60	20,45	0,24	0,00	0,01	0,00	0,01	28,4	5,6	1,50	2,9	4	-
T2	17,8	2948	300	32,20	20,22	0,33	0,01	0,02	0,00	0,01	27,7	5,6	2,07	5,4	3	-
T3	19,5	2921	350	28,00	19,72	0,61	0,01	0,03	0,00	0,01	26,1	5,5	2,62	8,0	4	-
T4	21,5	2895	410	28,10	19,01	1,02	0,02	0,05	0,01	0,02	23,4	5,2	4,39	14,8	6	-
T5	23,0	2870	469	27,90	18,31	1,43	0,02	0,07	0,01	0,03	20,2	5,1	6,35	10,8	7	-
T6	25,0	2845	630	27,60	17,21	2,15	0,03	0,10	0,02	0,05	16,0	5,6	9,84	21,9	17	-
T7	26,5	2845	779	28,10	15,49	3,35	0,05	0,14	0,03	0,08	-	5,4	-	-	-	-
T8	28,5	2845	507	32,80	17,75	2,75	0,03	0,08	0,02	0,07	-	5,1	-	-	-	-
T9	29,2	2855	752	25,20	11,52	5,66	0,08	0,24	0,05	0,13	0,3	5,1	20,02	75,1	22,4	-
T10	38,8	3243	961	19,10	-	-					0,2	4,8	54,36	246,0	29	-
T11	39,8	3255	961	18,20	9,04	6,98	0,09	0,30	0,05	0,16	0,0	4,7	57,91	319,0	93	-
T12	40,8	3268	954	18,70	9,27	6,88	0,09	0,29	0,05	0,16	0,9	4,8	62,89	308,0	115	-
T13	41,8	3289	960	18,70	8,56	7,14	0,09	0,31	0,05	0,16	3,4	4,8	66,11	358,0	123	-
T14	42,2	3289	-	-	-	-					4,1	-	-	-	148	-
T15	43,8	3261	872	33,70	12,92	6,38	0,06	0,20	0,05	0,15	0,0	5,1	63,03	293,5	189	-
T16	45,0	3261	518	32,00	12,85	5,10	0,06	0,21	0,04	0,12	0,0	5,5	-	-	-	-
T17	45,4	3264	800	24,60	-	-					0,0	5,6	-	-	-	-
T18	45,8	3250	800	26,70	12,60	4,90	0,07	0,21	0,03	0,11	0,0	5,6	63,63	290,0	185	61,0
T19	46,7	3252	799	26,60	12,76	4,88	0,06	0,21	0,03	0,11	0,0	5,7	-	293,5	194	82,1
T20	47,2	3249	800	29,10	13,41	4,38	0,06	0,19	0,03	0,10	0,0	5,7	-	333,0	192	100,5
T21	51,3	3264	798	33,80	14,29	3,63	0,05	0,17	0,03	0,08	0,0	5,3	57,92	320,0	234	209,8
T22	62,0	3315	801	34,80	14,22	3,56	0,05	0,18	0,02	0,08	0,0	5,4	59,86	326,0	355	452,0
T23	63,8	3321	800	38,20	15,50	3,13	0,04	0,14	0,02	0,07	0,0	5,3	-	354,0	347	-
T24	64,6	3324	801	38,60	15,02	3,07	0,05	0,16	0,02	0,07	0,0	5,2	-	339,5	431	439,7
T25	65,5	3314	798	39,50	-	-					0,0	5,1	57,58	317,5	250	585,7
T26	66,5	3317	799	40,30	14,33	3,58	0,05	0,18	0,03	0,08	0,0	5,0	-	333,0	396	573,2
T27	67,5	3320	802	41,80	15,08	3,38	0,05	0,16	0,02	0,08	0,0	4,9	-	326,0	325	572,4
T28	69,0	3315	800	40,80	14,44	3,52	0,05	0,17	0,02	0,08	0,0	4,8	62,63	332,5	401	622,4