

Universidad Nacional de la Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Química



Enzimas fúngicas extremófilas de aplicación

Bioteconológica:

Producción y Caracterización de

Ramnosidasas alcalofílicas de *Acremonium murorum* y  
*Acrostalagmus luteo-albus* y Poligalacturonasa acidofílica de

*Aspergillus kawachii*

*Rojas, Natalia Lorena*

**Tesis Doctoral**

2009





---

Enzimas fúngicas extremófilas de Aplicación Biotecnológica: Producción y Caracterización de Ramnosidas alcalofílicas de *Acremonium murorum* y *Acrostalagmus luteo-albus* y Poligalacturonasa acidofílica de *Aspergillus kawachii*

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 de la Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

**Tesista:** Lic. Natalia Lorena Rojas

**Director:** Dr. Roque Alberto Hours

**Co-director:** Dr. Sebastián Fernando Cavalitto



A Francis, Lucio y Norma.

A Diegui...



## **Agradecimientos:**

*A mi Director de Tesis, Dr. Roque Hours por su apoyo, por haber aceptado dirigirme, por su estímulo e interés en el éxito de mi trabajo, y principalmente por la confianza durante todo este trabajo.*

*A Tato, mi Co-Director, mi amigo, quien me alentó incondicionalmente en este tiempo, que con paciencia encauzo mis esfuerzos hasta el fin de este trabajo. Gracias infinitas por la posibilidad de trabajar en este grupo, por los ratos compartidos. Gracias por su amistad.*

*A mis compañeros de laboratorio, mis amigos con quienes compartí largas horas de trabajo, de charlas, y tantos momentos. Particularmente agradecerles a Gisel, Pame, Ceci, Betina, Ramón, Rubén, Caty, Coca, Victor, Carlitos, Oscar, Flavia, Galle, Marilyn, Laura, Julio .*

*A mis amigas Ce y Carol, con quienes compartí mi vida todo este tiempo, por sus consejos, su aliento y apoyo incondicional. Gracias por compartir sus vidas conmigo.*

*A los chicos que trabajaron junto a mi este tiempo, por la paciencia interminable, por las largas horas de trabajo compartidas, por su alegría en el laboratorio, en particular a Dolo, Mari, Lu, Gastón, Betina.*

*A mi querido Arley, por su amistad, su alegría en el trabajo cotidiano.*

*A Claudio, de quien aprendí tanto, por su asesoría, paciencia y sus aportes en todo este trabajo, pero fundamentalmente por su amistad.*

*A Daniel, quien me ha ayudado en momentos duros de este trabajo, por su asesoría y valiosos conocimientos transmitidos en este tiempo.*

*A Mercedes, por haberme escuchado y ayudado desinteresadamente en momentos de desánimo, que con inmensa paciencia me enseñó y alentó en este trabajo.*

*A toda mi familia, que siempre apoyaron y animaron mis estudios.*

*A mis amigos de siempre, por compartir nuestras vidas, por el apoyo y confianza incondicionales, por ser mis hermanos por elección, Guille, Andrés, Lupe, Marcos, Carol, Adri, Danny, Fito, Norber, Mari, Leo.*

*A mi Hermana, Norma, quien me ha apoyado infinitamente en este tiempo, que estuvo al lado mío en cada paso de mi vida, de quien aprendo día a día. Por haber confiado en mí siempre.*

*A mis papas, Lucio y Francis, quienes de sacrificio inmenso son para mi ejemplo a seguir en mi vida. Gracias por su apoyo incondicional y por lo que me han enseñado. Gracias por sus palabras, su aliento, su confianza plena. Pero por sobre todo gracias por haberme acompañado en cada paso de mi vida, estar conmigo en cada momento.*

*A Diegui, mi amor, a quien admiro profundamente. Gracias por ser quien me ha sostenido en todo este tiempo, por su aliento en los momentos más duros y su ayuda constante en la vida cotidiana. Por su incesante apoyo. Por soñar al lado mío, por vivir nuestro sueño juntos.*



*One never notices what has been done; one can only see what remains to be done...*

**Marie Curie**



Parte de los resultados obtenidos con el presente trabajo de tesis han sido publicados  
o aceptados para su publicación:

**En Revistas Científicas:**

2008 Role of PPase-SE in *Geotrichum klebahnii*, a yeast-like fungus able to solubilize pectin. Rojas, N.L.; Cavalitto, S.F.; Mignone, C.F. and Hours, R.A. Electronic Journal of Biotechnology [online]. January 15, 2008, vol. 11, no 1, 1-8. Available from: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol11/issue1/full/13/index.html> . ISSN 0717-3458.

2008 Alkaline polysaccharidases produced in solid state cultures by alkalophilic fungi Isolated from Argentina. N.L. Rojas, S.F. Cavalitto, M. Cabello, R.A. Hours and C.E. Voget. Journal of Pure and Applied Microbiology 2, (1), 1-10 (2008).



# Índice de contenidos

## CAPÍTULO 1

<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE EXTREMÓFILOS .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 ALCALÓFILOS/ACIDÓFILOS .....	7
1.1.2 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS ALCALÓFILAS Y ACIDÓFILAS .....	8
<b>1.2 <math>\alpha</math>-L-RAMNOSIDASAS.....</b>	<b>9</b>
1.2.1 SUSTRATOS DE $\alpha$ -L-RAMNOSIDASA .....	9
1.2.1.1 <i>Flavonoides</i> .....	10
1.2.1.2 <i>Terpenos</i> .....	11
1.2.1.3 <i>Saponinas</i> .....	13
1.2.2 RAMNOSIDASAS: PRODUCTOS Y APLICACIONES .....	13
<b>1.3 ENZIMAS PECTOLÍTICAS.....</b>	<b>16</b>
1.3.1 PECTINA .....	17
1.3.1.1 <i>Características generales</i> .....	17
1.3.2 CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS PECTOLÍTICAS.....	19
1.3.2.1 <i>Enzimas que atacan el esqueleto principal de los polímeros pécticos</i> .....	19
1.3.2.1.1 Poligalacturonasas .....	19
1.3.2.1.2 Polimetilgalacturonasas (.....	20
1.3.2.1.3 Pectin y pectato-liasas (.....	20
1.3.2.2 <i>Enzimas que actúan sobre el RG</i> .....	20
1.3.2.3 Enzimas que degradan las cadenas laterales de los polímeros pécticos y .....	20
1.3.2.3.1 $\alpha$ -L-Arabinofuranosidasas .....	21
1.3.2.3.2 Endo-arabinasas.....	21
1.3.2.3.3 $\alpha$ - y $\beta$ -Galactosidasas.....	21
1.3.2.3.4 Endo- y exo-galactanasas .....	21
1.3.2.3.5 Feruloil- y p-coumaril-esterasas .....	21
1.3.2.3.6 Acetil- y metil-esterasas .....	21
1.3.2.4 <i>Otras enzimas con acción sobre la pectina</i> .....	22
1.3.3 APLICACIONES DE LAS ENZIMAS PECTOLÍTICAS.....	22
1.3.4 POLIGALACTURONASA ÁCIDA DE <i>ASPERGILLUS KAWACHII</i> .....	24
<b>1.4 OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>1.5 PLAN DE TRABAJO.....</b>	<b>27</b>

1.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>2. BÚSQUEDA DE ENZIMAS ALCALOFÍLICAS PRODUCIDAS POR HONGOS FILAMENTOSOS. ....</b>	<b>33</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>36</b>
2.1.1 HONGOS SUBDIVISIÓN DEUTEROMYCOTINA: CARACTERÍSTICAS GENERALES .....	37
2.1.1.1. <i>Acremonium sp.</i> .....	38
2.1.1.2 <i>Acremonium implicatum (Gilman &amp; Abbot) Gams</i> .....	39
2.1.1.3 <i>Acrostalagmus luteo-albus (Link: Fr) Zare, Gams et Schroers</i> .....	39
2.1.1.4 <i>Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.</i> .....	40
2.1.1.5 <i>Clonostachys rosea (Link: Fr.) Schoers</i> .....	40
2.1.1.6 <i>Doratomyces stemonitis (Pers. ex Steud.) Morton &amp; G. Sm.</i> .....	41
2.1.1.7 <i>Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson</i> .....	41
2.1.1.8 <i>Volutella ciliata Alb. &amp; Schw. ex Fr.</i> .....	42
2.1.2 CULTIVOS DE HONGOS IMPERFECTOS.....	42
<b>2.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
2.2.1 REACTIVOS QUÍMICOS: .....	43
2.2.2 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	44
2.2.2.1 <i>Microorganismos:</i> .....	44
2.2.2.2 <i>Medios de mantenimiento y esporulación</i> .....	44
2.2.2.3 <i>Cultivos en medios agarizados: estudio preliminar de crecimiento en superficie</i> .....	44
2.2.2.4 <i>Fermentación en sustrato sólido (FSS)</i> .....	45
2.2.2.4.1 Producción del inóculo de conidios .....	45
2.2.2.4.2 Cultivo con Perlita .....	45
2.2.2.4.3 Procesamiento de los cultivos .....	46
2.2.3 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS .....	46
2.2.4 CARACTERIZACIÓN DE LA PERLITA .....	46
2.2.5 METODOLOGÍA ANALÍTICA .....	47
2.2.5.1 <i>Determinación de carbohidratos</i> .....	47
2.2.5.1 <i>Determinación de humedad</i> .....	47
2.2.5.2 <i>Determinación de proteína</i> .....	47
2.2.5.3 <i>Determinación de actividades enzimáticas</i> .....	47
2.2.5.3.1 Preparación de las muestras de enzima .....	47
2.2.5.3.2 Actividad glicosidasa .....	48
2.2.5.3.3 Actividad liasa .....	48
2.2.5.3.4 Medidas de actividad enzimática por incremento de poder reductor .....	48

2.2.5.4 <i>Cromatografía en capa fina</i> .....	49
2.2.5.5 <i>Cromatografía líquida de alta performance</i> .....	49
2.2.5.6 <i>Análisis del contenido de pectina en jugo V-8 clarificado</i> .....	49
2.2.6 DEFINICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	50
<b>2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>51</b>
2.3.1 ESTUDIO PRELIMINAR DE CRECIMIENTO EN MEDIOS AGARIZADOS .....	51
2.3.2 CRECIMIENTO EN FSS .....	53
2.3.2.1 <i>Propiedades de hidratación de la perlita</i> .....	53
2.3.3 SCREENING DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ALCALINAS .....	56
2.3.3.1 <i>Actividad pectolítica</i> .....	56
2.3.3.2 <i>Actividad glicosidasa</i> .....	61
2.3.4 HIDRÓLISIS DE NARINGINA CON $\alpha$ -RAMNOSIDASA ALCALINA DE <i>A. LUTEO-ALBUS</i> .....	62
2.3.4.1 <i>Purificación del sustrato</i> .....	62
2.3.4.2 <i>Reacción de hidrólisis</i> .....	62
<b>2.4 CONCLUSIONES</b> .....	<b>64</b>
<b>2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>3. RAMNOSIDASAS ALCALINAS DE <i>ACROSTALAGMUS LUTEO-ALBUS</i> Y <i>ACREMONIUM MURORUM</i>:</b> .....	<b>67</b>
<b>PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN</b> .....	<b>67</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>69</b>
<b>3.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>70</b>
3.1.1 <i>ACROSTALAGMUS LUTEO-ALBUS</i> Y <i>ACREMONIUM MURORUM</i> .....	74
<b>3.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>76</b>
3.2.1 REACTIVOS QUÍMICOS .....	76
3.2.2 MICROORGANISMOS Y PRODUCCIÓN DE INÓCULOS .....	76
3.2.3 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	76
3.2.3.1 <i>Medios Semi-sintéticos</i> .....	76
3.2.3.2 <i>Medios complejos: Optimización de la producción de Rhasa de A. luteo-albus: Diseño experimental y análisis estadístico. Diseño de superficie de respuesta.</i> .....	77
3.2.3.3 <i>Análisis de represión catabólica por carbono:</i> .....	78
3.2.3.4 <i>Procesamiento de los cultivos</i> .....	78
3.2.4 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	78
3.2.5 PURIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS .....	79
3.2.5.1 <i>Purificación de Rhasa de A. luteo-albus</i> .....	79

3.2.5.1.2 Purificación de Rhasa de <i>A. luteo-albus</i> a partir de cultivos en medio sintético .....	80
3.2.5.2 Purificación de Rhasa de <i>A. murorum</i> a partir de cultivos en medio sintético .....	81
3.2.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS Y BIOQUÍMICAS .....	82
3.2.7 PROPIEDADES DE LA ENZIMA .....	82
3.2.7.1 Relación pH-actividad.....	82
3.2.7.2 Estabilidad de las enzimas respecto a pH y temperatura.....	83
3.2.7.2.1 Rhasa de <i>A. luteo-albus</i> .....	83
3.2.7.2.2 Rhasa de <i>A. murorum</i> .....	83
3.2.7.3 Efecto de cationes.....	83
3.2.7.4 Parámetros cinéticos sobre pnp-Ram.....	84
3.2.7.5.1 Cromatografía en capa fina (CCF).....	84
3.2.7.6 Análisis de huellas peptídicas .....	84
<b>3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>86</b>
3.3.1 PARTE A: RAMNOSIDASA DE <i>A. LUTEO-ALBUS</i> .....	86
3.3.1.1 Optimización de medios complejos .....	86
3.3.1.2 Optimización de medios semi- sintéticos .....	90
3.3.1.3 Purificación de Rhasa de <i>A. luteo-albus</i> a partir de cultivos en medio complejo.....	91
3.3.1.3.1 Inactivación selectiva de la $\beta$ -glucosidasa .....	94
3.3.1.4 Purificación de Rhasa de <i>A. luteo-albus</i> a partir de cultivos en medio sintético .....	96
3.3.1.7 Caracterización bioquímica de Rhasa de <i>A. luteo-albus</i> .....	97
3.3.1.5 Caracterización del efecto del pH sobre la actividad Rhasa de <i>A. luteo-albus</i> .....	98
3.3.1.8 Parámetros cinéticos sobre pnp-Rha .....	100
3.3.1.9 Efecto de varios cationes sobre la actividad Rhasa .....	100
3.3.1.10 Especificidad de sustrato sobre ramnoglucósidos naturales.....	100
3.3.2 PARTE B: RAMNOSIDASA DE <i>A. MURORUM</i> .....	103
3.3.2.1 Optimización de la producción en diferentes medios.....	103
3.3.2.2 Purificación de la proteína con actividad ramnosidasa.....	103
3.3.2.3 Efecto del pH y la temperatura en la actividad Rhasa de <i>A. murorum</i> .....	105
3.3.2.5 Parámetros cinéticos de Rhasa utilizando pnp-Ram como sustrato .....	106
3.3.2.6 Efecto de varios cationes sobre la actividad ramnosidasa.....	106
3.3.2.7 Especificidad de sustrato sobre ramnoglucósidos naturales .....	106
3.3.3. CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA .....	108
<b>3.4 CONCLUSIONES .....</b>	<b>110</b>
<b>3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>112</b>
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>4. CLONADO Y EXPRESIÓN DE <i>PG1</i> DE <i>ASPERGILLUS KAWACHII</i> EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>.....</b>	<b>115</b>

<b>RESUMEN</b> .....	117
<b>4.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	118
4.1.1 <i>ASPERGILLUS KAWACHII</i> .....	119
1.3.4.1 <i>Enzimas de Aspergillus kawachii</i> .....	120
<b>4.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	122
4.2.1 REACTIVOS QUÍMICOS.....	122
4.2.2 CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	122
4.2.3 BÚSQUEDA DEL GEN <i>PGI</i> POR MEDIO DE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y DISEÑO DE PRIMERS .....	122
4.2.4 VECTORES .....	123
4.2.5 PURIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO DE <i>A. KAWACHII</i> .....	124
4.2.6 OBTENCIÓN DEL GEN <i>PGI</i> MEDIANTE PCR DESDE ADN GENÓMICO DE <i>A. KAWACHII</i> .....	124
4.2.7 ESTRATEGIAS DE CLONADO DE <i>PGI</i> .....	125
4.2.7.1 <i>Estrategia de clonado de pgl con intrón en PYES2</i> .....	125
4.2.7.1.1 Clonado del gen <i>pgl</i> en <i>pYES2</i> .....	125
4.2.7.1.2 Transformación y selección de clones positivos <i>E. coli</i> TOP10F'.....	125
4.2.7.1.3 Comprobación del marco abierto de lectura .....	126
4.2.7.1.4 Transformación y selección de clones positivos <i>S. cerevisiae</i> INVSc1 .....	126
4.2.7.1.5 Expresión de <i>pgl</i> en <i>pYES2</i> .....	126
4.2.7.2 <i>Estrategia de clonado de pgl sin intrón en PYES2</i> .....	126
4.2.7.2.1 Generación del inserto <i>pgl</i> sin intrón .....	126
4.2.7.2.2 Clonado del fragmento en <i>PYES2</i> .....	126
4.2.7.2.3 Transformación y selección de clones positivos de <i>E. coli</i> TOP10F'.....	127
4.2.7.2.4 Comprobación de eliminación del intrón y del marco de lectura abierto.....	127
4.2.7.2.5 Transformación y selección de clones positivos <i>S. cerevisiae</i> INVSc1 .....	127
4.2.7.2.6 Expresión de <i>pgl</i> $\Delta I$ en <i>pYES2</i> .....	127
4.2.7.3 <i>Estrategia de clonado de pgl<math>\Delta I</math> en p416 y p426</i> .....	127
4.2.7.3.1 Digestión de <i>pgl<math>\Delta I</math></i> , <i>p416</i> y <i>p426</i> y clonado .....	127
4.2.7.3.2 Transformación y selección de clones positivos <i>E. coli</i> TOP10F'.....	128
4.2.7.3.3 Comprobación del marco abierto de lectura .....	128
4.2.7.3.4 Transformación y selección de clones positivos de <i>S. cerevisiae</i> INVSc1 .....	128
4.2.7.3.5 Expresión de <i>pgl</i> en <i>p416</i> y <i>p426</i> .....	128
4.2.8 MEDIDA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	128
4.2.8.1 <i>Definición de actividad enzimática</i> .....	129
4.2.9 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.....	129
<b>4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	130
4.3.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO .....	130
4.3.2 ESTRATEGIA DE CLONADO DE <i>PGI</i> CON INTRÓN EN <i>PYES2</i> .....	132

4.3.3 ESTRATEGIA DE CLONADO DE <i>PGI</i> SIN INTRÓN EN <i>PYES2</i> .....	136
4.3.3.1 Estrategia de clonado de <i>pg1</i> sin intrón en <i>pYES2</i> .....	138
4.3.3.2 Estrategia de clonado de <i>pg1</i> en los vectores constitutivos <i>p416</i> y <i>p426</i> .....	144
<b>4.4 CONCLUSIONES .....</b>	<b>148</b>
<b>4.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>150</b>
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>5. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PG1 RECOMBINANTE. ....</b>	<b>155</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>157</b>
<b>5.1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>158</b>
<b>5.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>160</b>
5.2.1. REACTIVOS QUÍMICOS .....	160
5.2.2. MEDIOS DE CULTIVO.....	160
5.2.3. MICROORGANISMO Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA .....	160
5.2.4 CULTIVOS EN FRASCOS AGITADOS .....	162
5.2.5 CULTIVOS EN BIORREACTOR EN SISTEMA TIPO BATCH .....	162
5.2.5.1 Biorreactor.....	162
5.2.5.2 Inóculo.....	162
5.2.5.3 Medida de pH, de oxígeno disuelto y de gases .....	162
5.2.5.5 Determinación de biomasa.....	163
5.2.6 CULTIVOS EN BIORREACTOR EN SISTEMA TIPO BATCH ALIMENTADO .....	163
5.2.6.1 Biorreactor y procedimientos del cultivo .....	163
5.2.6.2 Diseño del sistema batch alimentado .....	163
5.2.6.3 Diseño de las estrategias de inducción .....	166
5.2.7 PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA .....	166
5.2.8 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y ANALÍTICAS .....	167
5.2.8.1 Medida de actividad enzimática .....	167
5.2.8.2 Técnicas bioquímicas .....	168
<b>5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>169</b>
5.3.1 CULTIVOS EN SISTEMA BATCH A ESCALA FRASCOS AGITADOS .....	169
5.3.2 CULTIVOS EN BATCH A ESCALA DE BIORREACTOR .....	172
5.3.3 CULTIVOS EN SISTEMA BATCH ALIMENTADO .....	175
5.3.4 PURIFICACIÓN DE LA <i>PG1</i> RECOMBINANTE.....	177
5.3.5 CARACTERIZACIÓN DE LA <i>PG1</i> RECOMBINANTE.....	179
5.3.5.1 Peso molecular y Punto isoeléctrico .....	179
5.3.5.2 Efecto de pH sobre la actividad enzimática .....	180

5.3.5.3. <i>Estabilidad térmica</i> .....	180
5.3.5.4. <i>Mapeo peptídico de las proteínas silvestre y recombinante</i> .....	181
<b>5.4 CONCLUSIONES</b> .....	<b>181</b>
<b>5.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>183</b>
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>185</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>187</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>189</b>
DISEÑO EXPERIMENTAL: MÉTODO DE DOEHLERT .....	191
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	<b>193</b>



**LISTA DE ABREVIATURAS**

ADN	Acido desoxirribonucleico
AGA	Acido galacturónico
AM	Agar malta
APD	Agar papa dextrosado
APG	Acido poligalacturónico
ARA	Arabinosa
BCP	Buffer citrato-fosfato
BM	Buffer MES (ácido 2-N-morfolinoetano sulfónico)
CCF	Cromatografía en capa fina
CMC	Carboximetilcelulosa
CreA	Gen de la proteína de represión catabólica por carbono
CS	Cultivo Stock
EDTA	Acido etilendiamin tetraacético
FCE	Fuente de Carbono y Energía
FN	Fuente de Nitrógeno
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatorgraphy
FSS	Fermentación en sustrato sólido
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GM	Grado de esterificación de metoxilos
Glu	Glucosa
Gluasa	$\beta$ -D-Glucosidasa
HG	Homogalacturonano
HMWM	Marcador de alto peso molecular
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LMWM	Marcador de bajo peso molecular
Man	Manosa
ME	Muestra de enzima concentrada
ONPG	<i>o</i> -nitro-fenil-glicósido
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PeL	Pectinliasa
PG	Poligalacturonasa
PL	Pectatoliasa

PME	Pectinmetilesterasa
Pnp	<i>p</i> -nitrofenol
Pnp-Glu	<i>p</i> -nitro-fenil-glucopiranosido
Pnp-Rha	<i>p</i> -nitrofenil-ramnopiranosido
PPasa	Protopectinasa
Ram	Ramnosa
RG	Ramnogalacturonano
Rhasa	$\alpha$ -L-ramnosidasa
Sac	Sacarosa
SC	Medio definido para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SE	Solución stock de enzima
Tri	Triptona
Xyl	Xilosa

# Capítulo 1

## Introducción General



La producción de enzimas constituye un desafío para la industria biotecnológica actual. A partir de la expansión y diversificación de los mercados de enzimas, los desarrollos biotecnológicos han sustentado esta creciente demanda, generando un interesante incremento en la variedad de enzimas disponibles.

Estas proteínas han sido usadas, de modo consiente o no, desde tiempos remotos. Los orígenes de la enzimología moderna se remontan al siglo XIX, cuando científicos como Payen y Pesoz demostraron que el extracto de malta contenía una sustancia termolábil capaz de convertir el almidón en azúcares fermentables (diastasa). La existencia de otras enzimas adicionales tales como pepsinas, polifenol oxidasas, peroxidasas e invertasas fue reconocida a mediados de ese siglo. Una vez que la ciencia de la enzimología estuvo establecida, los científicos de este área comenzaron a evaluar el potencial de estos catalizadores para mediar procesos industriales<sup>1</sup>.

A comienzos de 1970 la tecnología enzimática comenzaba a entrar en un periodo de desarrollo industrial, dirigido a la producción de diversos aminoácidos y azúcares a partir de la glucosa isomerizada. En aquel momento, los mercados Europeos y Americanos se encontraban dominados por la comercialización de las enzimas proteolíticas utilizadas en la industria de los detergentes, pero existían grandes expectativas sobre el mercado de enzimas aplicadas a la industria alimentaría, al cual se le auguraba un crecimiento importante<sup>2</sup>. En 1981 el mercado mundial del azúcar se valoró en 200 millones de dólares y en 1985 la oficina de Valores Tecnológicos de USA lo cifraban en US\$ 250 millones<sup>3</sup>. De acuerdo con estudios recientes, el Mercado de enzimas en 2008 se valoró en € 3.4 billones con un crecimiento anual de 6.5 a 10% (enzimas farmacéuticas excluidas)<sup>4</sup>.

Hoy en día, las enzimas son utilizadas rutinariamente para diversas aplicaciones, desde la manufactura de materias primas industriales hasta su utilización como agentes terapéuticos y de diagnóstico<sup>5</sup>. La tecnología enzimática se presenta como una alternativa biotecnológica basada en el desarrollo de productos de calidad homogénea, óptimo aprovechamiento de materias primas, celeridad en procesos de producción, disminución de la cantidad de residuos y del deterioro del medio ambiente. Existe una serie de preparaciones biocatalíticas para resolver cada situación concreta, debiendo considerarse en cada caso qué criterios deben manejarse en la elección del biocatalizador.

En la actualidad se producen comercialmente las siguientes enzimas:

1.- Enzimas utilizadas en la industria como: amilasas, proteasas, pectinasas, catalasas, isomerasas y penicilina acilasas.

- 2.- Enzimas utilizadas con propósitos analíticos como: glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, alcohol deshidrogenasa, hexoquinasa, muraminidasa y colesterol oxidasa.
- 3.- Enzimas utilizadas en medicina y farmacia como: asparraginasas, proteasas, lipasas glicosidasas y estreptoquinasa.

La principal ventaja que nos ofrece la aplicación de enzimas en procesos industriales se basa en su alto grado de especificidad y adaptabilidad volviendo los procesos más eficientes y menos costosos. De esta forma, es posible obtener menos subproductos indeseados y mayor capacidad de planta con un incremento en el rendimiento de producto. Debido a la creciente demanda industrial de biocatalizadores que puedan adaptarse a las distintas condiciones de los procesos industriales, se han realizado considerables esfuerzos para conseguir las enzimas adecuadas. A pesar del hecho que hasta la fecha se han identificado más de 3.000 enzimas diferentes, y muchas de ellas han encontrado utilidad en aplicaciones industriales y biotecnológicas, aún no son suficientes para satisfacer todas las demandas<sup>6</sup>. La principal causa de esto es que muchas de las enzimas disponibles no resisten las condiciones de reacción industriales. Como resultado de esto, la búsqueda, aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de sobrevivir en ambientes extremos (extremófilos) ha recibido gran atención. Estos extremófilos son una valiosa fuente de nuevas enzimas<sup>7</sup>  
<sup>8</sup>. Las condiciones extremas pueden referirse a condiciones físicas tales como temperatura, presión o radiación, o bien a condiciones geoquímicas tales como salinidad y pH. La mayoría de los extremófilos que han sido identificados a la fecha pertenecen al dominio Archea. Sin embargo, muchas eubacterias y eucariotas extremófilos han sido recientemente identificados y caracterizados<sup>6</sup>. La idea que los extremófilos son capaces de sobrevivir bajo condiciones no estándares y en ambientes no convencionales ha llevado a asumir que las propiedades de sus enzimas han sido desarrolladas y optimizadas para estas condiciones. De hecho, datos de una considerable fracción de enzimas, que han sido aisladas y caracterizadas a partir de extremófilos, avalan esta suposición.

## **1.1 Producción de enzimas de extremófilos**

El screening de la actividad funcional y la minería de datos de ADN (data mining) pueden ser muy útiles para la identificación de enzimas con aplicaciones industriales. Sin embargo, la identificación de enzimas potencialmente aplicables es sólo el primer paso. Para aprovechar completamente este conocimiento, las enzimas identificadas deben tener propiedades adecuadas para su aplicación biocatalítica. Existen dos

estrategias para la producción de enzimas desde extremófilos: la primera es por medio del aumento de la producción de biomasa del extremófilo (y consecuentemente de proteína de interés producida), y la segunda es el clonado y sobre expresión del gen que codifica para el biocatalizador en un huésped adecuado.

Como puede observarse en la Tabla 1.1, la diversidad de ambientes a los que diferentes extremófilos se han adaptado ofrece múltiples opciones interesantes para una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, para la degradación de polímeros tales como quitina, celulosa o almidón, son preferibles las enzimas activas y resistentes a altas temperaturas, condición en la que se mejoran la solubilidad y consecuentemente la accesibilidad al sustrato. Alternativamente, si uno necesita realizar una modificación estero específica de un compuesto para la síntesis de un producto relevante en la industria farmacéutica, las enzimas de microorganismos halofílicos serían la opción más adecuada debido a que la sal reduce la actividad acuosa<sup>9, 10</sup>.

### 1.1.1 Alcalófilos/Acidófilos

Las enzimas provenientes de microorganismos que pueden sobrevivir bajo condiciones extremas de pH podrían ser particularmente útiles para aplicaciones bajo estas condiciones de reacción. Si bien las proteínas intracelulares de los acidófilos y alcalófilos no necesitan adaptarse a condiciones de pH extremas debido a que el pH intracelular es neutro, las extracelulares deben funcionar en ambientes altamente ácidos o alcalinos. Las proteasas, amilasas, lipasas y otras enzimas que son resistentes y activas a altos pHs y a altas concentraciones de quelantes son muy buscadas. Esto ha llevado al screening de bacterias y Archea alcalofílicas por su habilidad de producir estas enzimas, obteniéndose varias enzimas útiles. Se han aplicado combinaciones screening de actividades y PCR basadas en homologías para encontrar y detectar proteasas alcalinas en una colección de cepas termoacidofílicas de bacterias y Archeas aisladas de ambientes calurosos<sup>11</sup>. En una búsqueda alternativa, ciertos bacilos alcalofílicos capaces de crecer a valores de pH superiores a 9 fueron usados como una fuente de proteasas alcalinas resistentes a la oxidación<sup>12</sup>. Los procesos relacionados con la hidrólisis de polímeros también requieren de biocatalizadores provenientes de acidófilos. Se han aislado varias enzimas empleadas para la hidrólisis del almidón, tales como amilasas, pululanasas, glucoamilasas y glicosidasas activas a bajos pHs<sup>13,14</sup>.

**Tabla 1.1:** Clasificación de extremófilos y ejemplos de aplicaciones de algunas de sus enzimas<sup>6</sup>

Tipo	Características de crecimiento	Enzimas	Aplicaciones
Termófilos	Temperaturas > 80 °C (hipertermófilos)	Proteasas	Detergentes, hidrólisis en alimentos, cervecería, panadería.
		Glicosil hidrolasas (amilasas, pululanasa, glucoamilasas, glucosidasas, celulasas, xilanasas)	Procesamiento de almidón, celulosa, pectina, textiles.
	60 °C < temperaturas < 80 °C (termófilos)	Quitinasas	Modificación de quitina para alimentos y productos para la salud.
		Lipasas, esterasas	Detergentes, reacciones estereo específicas (trans esterificación y síntesis orgánica).
		DNA polimerasas	Biología molecular.
		Deshidrogenasas	Reacciones de oxidación
		Proteasas	Detergentes, alimentos
Psicrófilos	Temperaturas < 15 °C	Amilasas	Detergentes y panaderías
		Celulasas	Detergentes, alimentos, textiles.
		Deshidrogenasas	Biosensores
Halófilos	Altas concentraciones de sal (2-5 M de NaCl)	Lipasas	Detergentes, alimentos, cosmética.
		Proteasas	Síntesis de péptidos
Alcalófilos	pH > 9	Deshidrogenasas	Biocatálisis en medios orgánicos.
		Proteasas	Detergentes
		Celulasas	Alimentos
Acidófilos	pH < 2-3	Amilasas	Procesamiento de almidón
		Proteasas	Alimentos
Piezófilos	Altas presiones (130 MPa)	Oxidasas	Desulfuración de carbón
		A definir	Alimentos y producción de antibióticos

### 1.1.2 Producción de enzimas alcalófilas y acidófilas

Se deben considerar diferentes aspectos al momento de elegir las cepas productoras de enzimas de interés industrial. En primer lugar, es ideal que la enzima sea exportada desde la célula al exterior (enzima extracelular). Esto hace que los procesos de

recuperación y purificación sean mucho más simples en comparación con los de las enzimas intracelulares, las cuales deben ser purificadas entre miles de proteínas y otros componentes del huésped. Por otro lado, el microorganismo productor debería tener el estatus de GRAS (Generally Recognized as Safe). Esto es muy importante cuando la enzima producida será aplicada en la industria alimentaria. En tercer lugar, el organismo debe ser capaz de producir una gran cantidad de enzima en un tiempo razonable. Las cepas industriales generalmente producen cerca de 50 g/l de proteínas extracelulares. La mayoría de las enzimas industriales son producidas por relativamente pocos microorganismos tales como hongos filamentosos (de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*) y bacterias (*Streptomyces* y *Bacillus*). La mayoría de los microorganismos empleados han sido genéticamente modificados para sobreproducir la actividad enzimática deseada y no producir reacciones laterales<sup>15</sup>.

En el presente trabajo se estudiará la producción de enzimas fúngicas extracelulares capaces de mantener su actividad en condiciones extremas de pH. Por un lado, se estudiarán dos  $\alpha$ -L-ramnosidasas (Rhasas) alcalinas producidas por los hongos filamentosos *Acrocalagmus luteo-albus* y *Acremonium murorum*. En estos casos se determinarán las mejores condiciones de producción utilizando los microorganismos silvestres, se caracterizará bioquímicamente cada una de las proteínas y se evaluará su aplicación sobre sustratos naturales. Por otro lado, una poligalacturonasa (PGasa) ácida producida por *Aspergillus kawachii*, ya caracterizada en trabajos previos<sup>16</sup>, será clonada y sobreexpresada en sistemas heterólogos empleando la información disponible acerca de su caracterización. Ambas estrategias se basan en desarrollar el proceso de producción y, finalmente, cómo recuperar, purificar y caracterizar el producto.

## 1.2 $\alpha$ -L-Ramnosidasas

Las Rhasas catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos en ramnósidos naturales o sintéticos (heteropolisacáridos, flavonoides y compuestos aromáticos) con liberación de L-ramnosa (6-deoxy-L-manosa). La existencia de una Rhasa activa a pH alcalino resulta de interés ya que algunos sustratos sobre los que actúa son más solubles en esta condición.

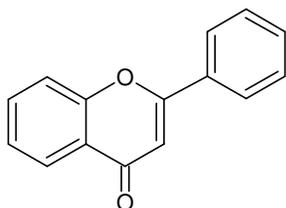
### 1.2.1 Sustratos de $\alpha$ -L-ramnosidasa

La L-ramnosa está ampliamente distribuida en plantas y bacterias, fundamentalmente como componente de las paredes celulares y de varios productos naturales. Algunos de los sustratos ramnosídicos sobre los que actúan las Rhasas son importantes

compuestos biológicamente activos. Algunos de ellos son los que se describen a continuación.

### 1.2.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas cuyo esqueleto común es el 2-fenil-1,4-benzo pireno (Figura 1.1). Este esqueleto carbonado puede estar modificado, constituyendo la porción del flavonoide que se denomina aglicón.



**Figura 1.1:** Estructura molecular del 2-fenil-1,4-benzo pireno esqueleto químico de los flavonoides

Los flavonoides están presentes en casi todas las plantas, fundamentalmente en las partes aéreas, pero varían cualitativamente de una planta a otra. Se han descubierto más de 4.000 y están recibiendo gran atención por parte de la comunidad científica, debido a que se les atribuyen propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y como protectores de vasos sanguíneos. Estas propiedades biológicas los señalan como posibles opciones para el tratamiento de enfermedades vasculares<sup>17</sup>.

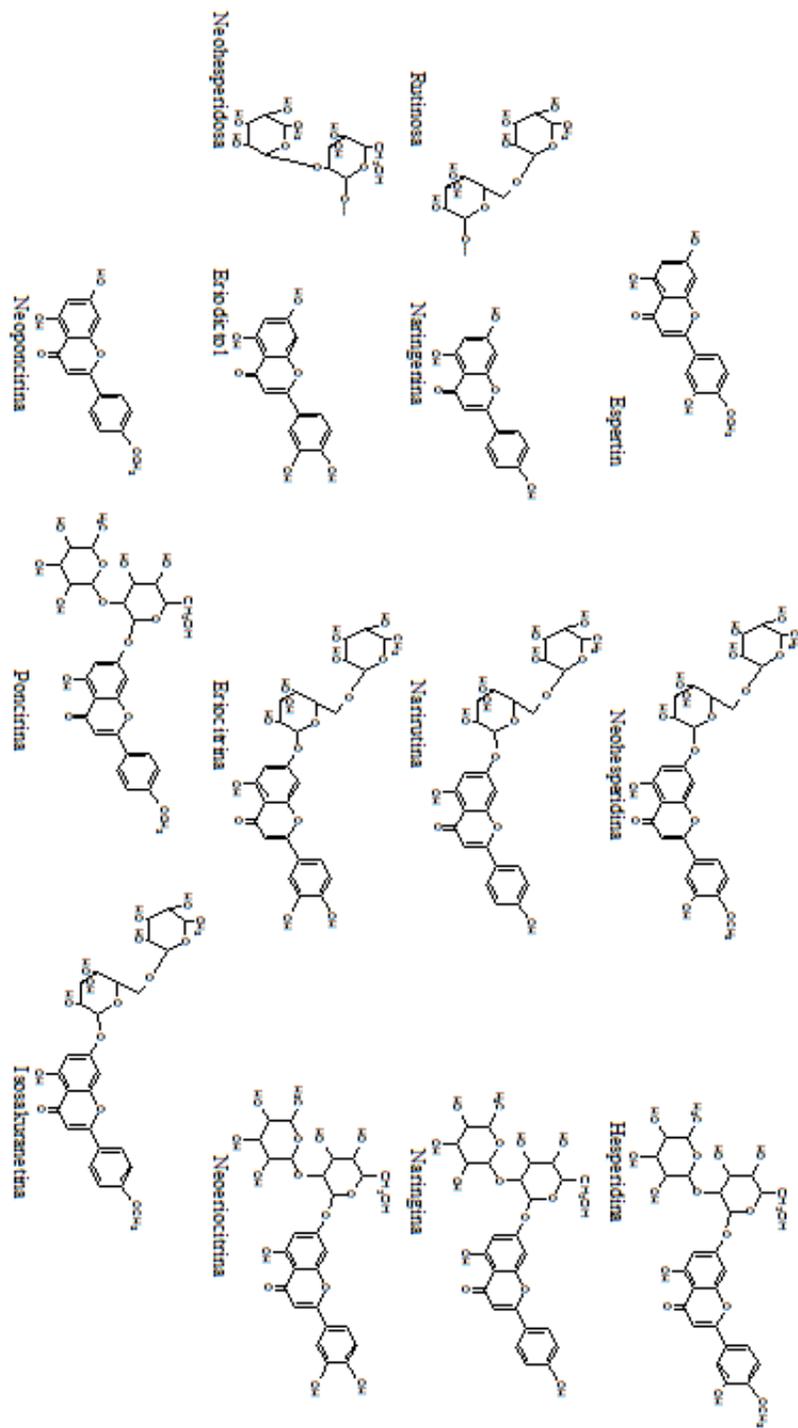
La L-ramnosa se encuentra formando parte de flavonoides presentes en las plantas del género *Citrus*. Entre los flavonoides glicosilados más importantes de dicho género se encuentran la naringina, hesperidina, narirutina y diosmina.

Las diferentes variedades de naranja contienen los aglicones flavonados hesperetina y naringenina, pero estos rara vez se encuentran como moléculas libres, sino que suelen estar glicosilados por los disacáridos rutinosa o neohesperidosa. De las posibles combinaciones entre estos aglicones y los disacáridos surgen los distintos flavonoides glicosilados (Figura 1.2). Los flavonoides glicosilados presentes en la naranja dulce (*C. sinensis* L. Osbeck) son hesperidina y narirutina, mientras que en la naranja agria o de Sevilla (*C. aurantium* L.) los dos flavonoides predominantes son neohesperidina y naringina. La diferencia más significativa entre estos flavonoides glicosilados de naranjas dulces y agrias se encuentra en las propiedades de sus azúcares, las cuales influyen su sabor. El disacárido rutinosa (6-O- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -

D-glucosa), presente en naranjas dulces y mandarinas, provee a estos frutos de un sabor neutro. Este disacárido se puede encontrar unido al aglicón hesperitina formando la hesperidina o unido al aglicón naringenina para dar naringina. En cambio el disacárido neohesperidosa (2-O- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -D-glucosa) es abundante en el pomelo (*C. paradisi* Macfadyen) y naranjas agrias e imparte un sabor amargo a los glucósidos neohesperidina y naringina de los que forma parte <sup>18</sup>.

#### 1.2.1.2 Terpenos

El aroma característico de los vinos está dado por una serie de componentes volátiles, entre ellos terpenoles. La existencia en la uva de una fracción no volátil e inodora, capaz de ser revelada por vías químicas o enzimáticas, fue demostrada por primera vez por Cordonnier y Bayonove<sup>19</sup>. Posteriormente, varios investigadores han mostrado que los principales terpenoles y polioles terpénicos están presentes en las uvas Moscatel en forma de glicósidos. Los azúcares que constituyen estos precursores son glucosa, arabinosa, ramnosa y apiosa. Todas las variedades de uva poseen este tipo de precursores, pero la variedad moscatel es la más rica, teniendo en general mayor cantidad de precursores glicosilados que aromas libres. Los diglicósidos no aromáticos contienen fundamentalmente 6-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosil- $\beta$ -D-glucopiranosidos y 6-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosidos <sup>20, 21</sup>.



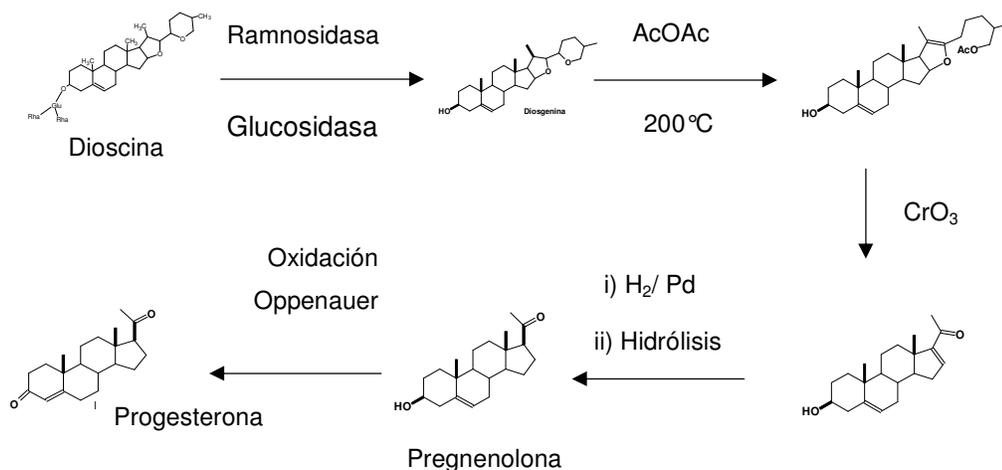
**Figura 1.2** Flavonoides presentes en Citrus, disacáridos y aglicones que los componen.

### 1.2.1.3 Saponinas

Las saponinas son una serie de productos naturales de origen vegetal con características físicas, químicas y biológicas comunes: son agentes tensioactivos, hemolíticos y tóxicos para animales (y el hombre) por vía endovenosa. A través de su hidrólisis se generan azúcares y aglicones (sapogeninas). Los azúcares presentes más comunes son: D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-fucosa y los ácidos galacturónico y glucurónico.

Las saponinas se encuentran clasificadas como saponinas esteroidales o triterpénicas. Las primeras se dividen a su vez en ácidas, básicas y neutras. Las saponinas triterpénicas se subdividen en tetracíclicas y pentacíclicas. Las saponinas esteroidales están menos distribuidas en la naturaleza que las saponinas triterpénicas pentacíclicas. Se encuentran con más frecuencia en Monocotiledóneas, especialmente en las familias *Dioscóraceae*, *Amarilidáceae* y *Liliáceae*. Una parte importante de las saponinas esteroidales son derivados del núcleo espirostan.

Un ejemplo de una saponina esteroide es la dioscina, que posee dos moléculas de ramnosa y una de glucosa. Por hidrólisis de los azúcares se obtiene diosgenina, compuesto utilizado en la industria farmacológica para la síntesis de hormonas esteroides (Figura 1.3). Este compuesto se obtiene del Ñame (*Dioscorea spp*), árbol originario de México.



**Figura 1.3:** Síntesis de progesterona a partir de Dioscina por vía mixta: enzimática y química.

### 1.2.2 Ramnosidasas: Productos y aplicaciones

Se ha reportado la producción de Rhasa por tejidos de mamíferos, plantas, bacterias y

hongos. Las Rhasas fúngicas reportadas poseen actividad a pH ácido. Unas pocas, de origen bacteriano, poseen actividad en medio alcalino débil, pero son intracelulares <sup>22</sup>. <sup>23</sup>. En la Tabla 1.2 se indican algunas Rhasas reportadas y sus aplicaciones. En el caso de la industria juguera, es empleada para la reducción del amargor de jugos de pomelo debido a que este sabor depende mayoritariamente de la presencia de naringina, la cual es hidrolizada a prunina (cuyo sabor amargo es mucho menor que el de la naringina) y ramnosa. La naringina es soluble a partir de pH 9, por lo cual es conveniente que la Rhasa utilizada para su hidrólisis sea activa a pH básico. Utilizando naringina como sustrato pueden obtenerse L-ramnosa y prunina si la enzima no posee actividad  $\beta$ -glucosidasa, o ramnosa, glucosa y naringenina si la enzima posee las dos actividades como es el caso de las naringinasas. La opción más interesante es la primera, ya que la prunina tiene actividad antiviral <sup>24</sup>, puede ser utilizada como edulcorante para diabéticos <sup>25</sup> y además se ha demostrado su capacidad de protección de la mucosa gástrica en modelos animales. Por otro lado, la L-ramnosa es un químico fino que se utiliza tanto en ámbitos científicos e industriales como reactivo químico y como material de partida en la síntesis de compuestos orgánicos. Particularmente, se la usa en la producción de compuestos odorantes y saborizantes (Furaneol™) de alto valor agregado. La ramnosa se obtiene comercialmente a partir de flavonoides tales como quercitrina (de corteza de arce), naringina (de cáscara de citrus) o rutina mediante hidrólisis química, con una serie de inconvenientes (uso de sustancias tóxicas o corrosivas y producción de grandes cantidades de efluentes contaminantes).

**Tabla 1.2:** Algunas  $\alpha$ -L-ramnosidasas de diferentes microorganismos y su aplicación.

$\alpha$ -L-ramnosidasa (Origen)	Sustrato	Aplicación	Fuente
<i>Aspergillus niger</i>	Ruscósidos, desglucoruscina	Industria farmacéutica (anti-inflamatorios)	Pisvejková <i>et al</i> <sup>26</sup>
<i>Penicillium sp.</i>	Terpenoles glicosilados	Industria alimenticia (vitivinícola).	Maicas <i>et al</i> <sup>21</sup>
<i>Acremonium persicinum</i> <i>Aspergillus aculeatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Emericella nidulans</i> ,	Flavonoides: naringina, hesperidina, narirutina. Glicósidos: quercitrina, ginsenosido, etc.	Industrias farmacéutica, alimenticia.	Monti <i>et al</i> <sup>27</sup>

Otra alternativa de producción de L-ramnosa es a partir de polisacáridos de plantas o microorganismos que la contengan en su estructura o bien a partir de ramnolípidos de origen microbiano <sup>28-30</sup>. En ambos casos, el costo del proceso en su totalidad es alto y

el mismo conlleva a problemas similares a los antes descritos. En el caso que el sustrato sea la hesperidina también se libera una molécula de ramnosa, siendo el otro producto de la reacción el aglicón flavonoide hesperitina unido a una molécula de glucosa. En resumen, en el caso de los flavonoides siempre se libera una molécula de ramnosa más un  $\beta$ -D-glicósido.

En la industria vitivinícola la Rhasa es usada para incrementar el aroma de vinos mediante la hidrólisis de compuestos aromáticos terpénicos<sup>31</sup>.

La industria farmacéutica la emplea para la producción de antibióticos<sup>32</sup>. El derivado deglicosilado (sin ramnosa) del antibiótico cloropolisporina resulta en un potente antibiótico con acción sobre bacterias Gram positivas resistentes a otras drogas tales como meticilinas y otros antibióticos beta lactámicos. También es utilizada en la síntesis de sapogeninas y diosgeninas, precursores en la síntesis de drogas esteroides<sup>33</sup>. La obtención y evaluación de nuevos compuestos farmacológicos a partir de compuestos naturales como saponinas y glicósidos pueden llevarse a cabo sometiendo a los compuestos naturales a hidrólisis controladas por Rhasa. Esta estrategia es utilizada en la síntesis de sapogeninas y diosgeninas, precursores en la síntesis de drogas esteroides. Las saponinas esteroides son de gran interés e importancia por su relación con compuestos como las hormonas sexuales, cortisona, esteroides diuréticos, vitamina D, inmunomoduladores e inhibidores de la agregación plaquetaria. Algunas son utilizadas como material de partida para la síntesis de estos compuestos. Por ejemplo, la diosgenina es la principal sapogenina empleada por la industria y se obtiene por hidrólisis de la dioscina liberando dos moléculas de ramnosa y una de glucosa<sup>33</sup>. La mayoría de los ñames de los que se aíslan contienen una mezcla de sapogeninas en forma glicosídica. Hasta 1970 se usó la diosgenina aislada del ñame de México (tubérculo de *la Dioscorea mexicana*). Luego, la gran demanda de contraceptivos orales condujo a la búsqueda de nuevas fuentes de saponinas esteroidales precursoras, que por hemisíntesis pudieran conducir a la obtención de hormonas.

Otro sustrato potencial es el glicósido natural llamado desglucoruscina, que posee propiedades farmacológicas importantes como el tratamiento de insuficiencias circulatorias crónicas y se encuentra en investigación su actividad citostática en células de leucemia HL-67<sup>27</sup>. La hidrólisis del desglucoruscina mediante Rhasa da como productos de reacción ramnosa y desramnodesglucoruscina, este segundo con potenciales propiedades farmacológicas.

### 1.2.3 Ramnosidasas alcalinas de *A. luteo-albus* y *A. murorum*

A pesar del interés industrial, muy pocas preparaciones crudas de Rhasa se encuentran comercializadas. Hasta ahora, las más comunes son las llamadas naringinasas, que poseen también actividad  $\beta$ -glucosidasa. La presencia de esta segunda actividad enzimática es un inconveniente en la producción de ramnosa y prunina.

La mayoría de las reacciones descritas previamente se realizan a pH neutro o ácido. Sin embargo, los flavonoides son más solubles a pH alcalino por lo que las Rhasas alcalinas de *Acrostalagmus luteo-albus* y *Acremonium murorum* pueden resultar de gran utilidad en la obtención enzimática de ramnosa y prunina.

Un hábitat de estos hongos filamentosos es el suelo que constituye el ecosistema de los bosques de tala (*Celtis tala*) y coronillo (*Scutia buxifolia*) situados en la región costera de la provincia de Buenos Aires (partidos de Magdalena y Punta Indio). En estos suelos, con alto porcentaje de carbonato de calcio y pH entre 7,2 y 9,0, *A. luteo-albus* y *A. murorum* se desarrollan demostrando que poseen la capacidad de crecer en medios netamente alcalinos<sup>2,3</sup>. Esta característica hizo interesante realizar un screening de enzimas alcalofílicas producidas por *A. luteo-albus* (Capítulo 2). Los resultados del screening de enzimas producidas en cultivos en medios agarizados y por fermentación en sustrato sólido de diversos hongos aislados del ecosistema citado anteriormente<sup>3</sup>, mostraron que *A. luteo-albus* es una fuente importante de enzimas alcalinas: poligalacturonasas, pectin y pectato liasas, ramnogalacturanasa, celulasa, xilanasas,  $\beta$ -D-glucosidasa y Rhasa. Del mismo modo, en un trabajo paralelo, *A. murorum* ha sido sometido a un screening de enzimas, encontrándose que además de la actividad Rhasa, presenta alta actividad queratinolítica, por lo cual es considerado de potencial interés para el aislamiento de proteasas alcalinas que degraden eficientemente queratina<sup>34, 35</sup>.

## 1.3 Enzimas pectolíticas

Las enzimas pectolíticas o pécticas, llamadas comúnmente pectinasas, constituyen un complejo sistema de enzimas que incluye hidrolasas, liasas y oxidasas, que intervienen en la degradación o modificación de la pectina.

Las enzimas pectolíticas o pécticas, se encuentran en la mayoría de las plantas superiores y son producidas también por hongos filamentosos<sup>44</sup>, bacterias<sup>45 46</sup> y algunas levaduras e insectos<sup>47</sup>. Las pectinasas son en su mayor parte extracelulares, pero otras se localizan intracelularmente y son las responsables del metabolismo de

los productos de degradación generados por la acción de las pectinasas extracelulares. Mucho se ha avanzado en el conocimiento de las enzimas involucradas en la biosíntesis de la pectina. Estas incluyen las transferasas, que cumplen la función de unir las unidades monoméricas, incorporar los sustituyentes y generar la estructura final <sup>48</sup>. El estudio de las sustancias pécticas y las pectinasas está indisolublemente ligado al avance y mejoramiento de los métodos analíticos usados para determinar estructuras complejas de carbohidratos <sup>49</sup>.

### 1.3.1 Pectina

#### 1.3.1.1 Características generales

Las pectinas son heteropolisacáridos complejos que contienen dos regiones bien definidas: la región lisa y la región pilosa <sup>36</sup>. La primera, región denominada “lisa” o también homogalacturonano (HG), está compuesta principalmente por los esqueletos de restos de AGA. Los grupos carboxilos del AGA pueden estar parcialmente esterificados con metanol, y parcial o completamente neutralizados por una o más bases. De acuerdo a la American Chemical Society (EE.UU.) la denominación general de las sustancias pécticas abarca a los ésteres de metoxilos (la pectina), las cadenas no metoxiladas (los ácidos pécticos) y las sales (los pectatos), junto con ciertos polisacáridos neutros (arabinanos, arabinogalactanos y galactanos) que no poseen el esqueleto de poligalacturonano pero que están normalmente asociados a la pectina. Otro término definido dentro de las sustancias pécticas es el de la protopectina, una sustancia péctica insoluble en agua que está presente en tejidos vegetales, la cual origina pectina o pectatos solubles mediante depolimerización controlada <sup>37</sup>.

La esterificación con metanol es una característica muy importante que modifica las propiedades estructurales y funcionales de la pectina. El porcentaje de restos de AGA esterificados varía enormemente dependiendo de la fuente de la cual se haya extraído, e incluso dentro del mismo tejido vegetal.

Como parámetro de la cantidad de grupos esterificados con metanol se usan alternativamente dos criterios distintos, a saber: el grado de esterificación (GE) y el contenido de metoxilos. El GE se define como la cantidad de grupos carboxilos pertenecientes a los restos de AGA esterificados, en relación a su número total. El contenido de metoxilos se calcula relacionando la masa total de grupos metoxilos con la masa total de restos de AGA (esterificados o no). Un GE de 100 % (todos los grupos carboxilos neutralizados con metanol) corresponde a un contenido de metoxilo de 16,32 %. En relación a esta propiedad se diferencian dos categorías de pectinas: las

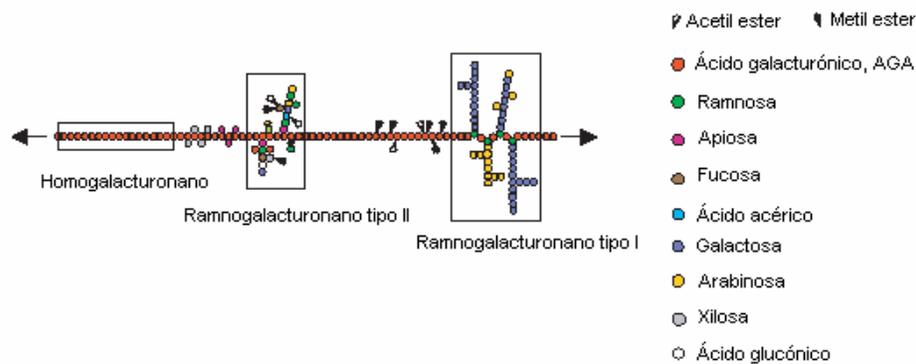
que poseen un contenido de metoxilos mayor del 8 % ( $GE > 50 \%$ ) son denominadas pectina de alto metoxilo (HM), y las que presentan un contenido de metoxilos menor que 8 % ( $GE < 50 \%$ ), son llamadas pectinas de bajo metoxilo (LM)<sup>38</sup>. Las pectinas HM sólo gelifican en presencia de concentraciones relativamente altas de azúcar y en medio ácido. Por el contrario, en las pectinas LM la gelificación se produce en ausencia de azúcar pero en presencia de concentraciones de iones, particularmente divalentes (i.e.  $Ca^{+2}$ ).

La segunda región definida dentro de la estructura de la pectina es la región “pilosa”, también denominada ramnogalacturonano (RG), dentro de la cual a su vez pueden distinguirse dos tipos de estructuras diferentes.

a) El RG tipo I es una región que se caracteriza por la presencia de dímeros de AGA y L-ramnosa unidos entre si ( $AGA-\alpha(1\rightarrow2)-Ram-\alpha(1\rightarrow4)-AGA-Ram$ ; forma piranósica)<sup>39 40</sup>. A estos residuos de ramnosa se unen cadenas de D-galactosa unidas por enlaces  $\beta-1,4$ , o en otros casos cadenas de L-arabinosa, unidas por enlaces  $\alpha-1,5$ . A partir de estos azúcares pueden originarse otras ramificaciones del mismo tipo, o en ocasiones formadas por otros azúcares como D-xilosa, D-glucosa, D-manosa, L-fucosa y ácido D-glucurónico, dependiendo del vegetal de origen de la pectina. Estas ramificaciones representan un 20-40 % de la cadena total<sup>41 42</sup>.

b) El RG tipo II está conformado por cadenas laterales de diferentes azúcares unidos directamente a los residuos de AGA<sup>39</sup>. El RG tipo II puede ser considerado incluso como una modificación estructural del HG y normalmente está en una posición adyacente al RG tipo I.

En la Figura 1.4 se muestra una estructura esquemática de la pectina, y se identifican claramente las regiones principales que la conforman.



**Figura 1.4:** Estructura esquemática de la pectina<sup>43</sup>.

### 1.3.2 Clasificación de las enzimas pectolíticas

Hasta hace poco, las revisiones bibliográficas sobre enzimas pécticas solamente describían las enzimas que actuaban sobre el HG<sup>50, 50, 51</sup>, pero recientemente se han descubierto varias enzimas que actúan sobre la región RamnoGalacturonano I (RG I)<sup>52,53,54</sup>. Las enzimas que actúan sobre el HG y el RG I pueden ser divididas a su vez en enzimas depolimerizantes y desesterificantes. Las enzimas depolimerizantes se clasifican de acuerdo a los siguientes criterios: 1) tipo de ruptura de los enlaces glicosídicos: hidrolítico o transeliminativo, 2) mecanismo de la reacción: tipo exo o endo, y 3) preferencia de actividad respecto del grado de esterificación metílica del sustrato (alto o bajo). Las enzimas desesterificantes se clasifican de acuerdo al tipo de grupo éster que hidrolizan, ya sea metil-, acetyl- o feruil-éster.

La clasificación de las pectinasas mencionada se refiere a la acción de estas enzimas sobre sustratos solubles. Algunos autores han descrito una clase adicional de pectinasas teniendo en cuenta su acción sobre sustratos insolubles; son las denominadas protopectinasas (PPasas). Estas son definidas como enzimas capaces de degradar "protopectina" (la pectina insoluble del tejido vegetal) generando pectina soluble de alto peso molecular<sup>38</sup>. Sin embargo, después de la caracterización de varias PPasas, se determinó que su mecanismo de acción es similar al descrito para las pectinasas caracterizadas con sustratos solubles (hidrolíticas, transeliminativas, específicas de la región HG o del RG I). Mas aún, se ha demostrado que el gen que codifica la actividad "protopectinasa" de *Geotrichum klebahnii* muestra una consistente homología con las clásicas PGasas<sup>55;56</sup>. Por lo tanto, si bien en diversas revisiones bibliográficas se incluyen a las PPasas como grupo adicional dentro de la clasificación de las enzimas pécticas, no existirían razones para considerarlas como tal y la actividad "protopectinasa" debe considerarse como una actividad natural de ciertas enzimas pectolíticas, aunque algunas de ellas puedan ser más eficientes que otras en hidrolizar protopectina<sup>52</sup>. Un importante paso para la clasificación de las glicosidasas ha sido su agrupación en 28 familias sobre la base de similitudes en la secuencia. En esta agrupación se incluye las pectinasas<sup>57</sup>.

La clasificación de las pectinasas se puede detallar como sigue:

#### 1.3.2.1. Enzimas que atacan el esqueleto principal de los polímeros pécticos

1.3.2.1.1 Poligalacturonasas (PGasas; EC 3.2.1.15): actúan básicamente sobre el HG hidrolizando las uniones glicosídicas entre residuos no esterificados y pueden ser divididas en tres grupos de acuerdo a su acción sobre el sustrato ácido poligalacturónico (APG): endo-PGasas que atacan el sustrato en forma aleatoria

generando mezclas de oligómeros, tri y digalacturonatos y AGA; las *exo*-PGasas tipo I (galacturonano  $\alpha$ -(1→4)-galacturonosidasa) que liberan AGA del extremo no reductor y las *exo*-PGasas tipo II (*exo*-poli- $\alpha$ -galacturonosidasa) que liberan digalacturonato del extremo no reductor. Las *endo*-PGasas y *exo*-PGAsa tipo I fueron identificadas en varios hongos filamentosos y han sido estudiadas extensamente <sup>58</sup>.

1.3.2.1.2 Polimetilgalacturonasas (*EC*. 3.1.1.11): esta enzima degradaría el HG altamente metoxilado, aunque su existencia es fuente permanente de controversia. Algunos reportes sobre la presencia de dicha actividad enzimática se atribuyen en realidad a la actividad de la PGasa contaminada con pectin-metilesterasa <sup>50</sup>.

1.3.2.1.3 Pectin y pectato-liasas (*EC*. 4.2.2.2 y *EC* 4.2.2.10): estas enzimas degradan el HG mediante un mecanismo de transeliminación, introduciendo un doble enlace entre el C-4 y el C-5 del extremo no reductor formado en la reacción. Las HG liasas se dividen en aquellas que degradan pectina con bajo grado de metoxilación (pectato-liasas, PL) y las que hidrolizan pectina altamente metoxilada (pectin-liasas, PeL). No se han encontrado liasas en plantas y la fuente más común de estas enzimas son las bacterias y hongos filamentosos, en particular los fitopatógenos. Las pectato-liasas requieren  $\text{Ca}^{+2}$  para su actividad, pero no así la PeL. Otras liasas descritas son la *exo*-pectatoliasa y las oligogalacturonato liasas, las cuales a diferencia de las *exo*-poligalacturonasas y las oligogalacturonato hidrolasas, atacan el sustrato desde el extremo reductor <sup>59</sup>.

#### 1.3.2.2 Enzimas que actúan sobre el RG:

La primera descripción de una enzima capaz de degradar la cadena principal del RGI fue hecha en 1990 y se denominó ramnogalacturonasa (RGasa, *EC* no asignado). El nombre actual es  $\alpha$ -D-galactopiranosilurónico-(1,2)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil hidrolasa, que se abrevia RG-hidrolasa. La enzima hidroliza la unión AGA-Ram en el esqueleto principal del RG. Más recientemente se han descrito otras enzimas que degradan RG: RG-liasa, que corta la unión Ram-AGA del esqueleto principal y dos enzimas que actúan en forma *exo*: RG-ramnohidrolasa, que remueve una Ram terminal del extremo no reductor del RG, y RG-galacturonanhidrolasa, que remueve AGA terminal del extremo no reductor de RG <sup>49</sup>.

1.3.2.3 Enzimas que degradan las cadenas laterales de los polímeros pécticos y remueven sustituyentes de la cadena principal (enzimas accesorias).

Estas están involucradas en la degradación de las ramificaciones o en la desesterificación de la pectina y se han denominado enzimas accesorias. Algunas de estas enzimas actuarían también sobre otros polisacáridos constituyentes de la pared celular, en particular la hemicelulosa, dependiendo el enlace específico que la enzima

reconoce. La mayor parte de las enzimas auxiliares o accesorias se han estudiado en bacterias y hongos filamentosos, en particular los del género *Aspergillus*<sup>60</sup>. Entre las enzimas accesorias tenemos:

1.3.2.3.1  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidasas (*EC* 3.2.1.55) y arabinoxilanolhidrolasa (*EC* 3.2.1.55): las primeras son más bien inespecíficas y remueven residuos Ara unidos por enlaces  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3- y  $\alpha$ -1,5- de diversos sustratos, entre ellos los arabanos laterales de las pectinas. La segunda es muy específica de residuos Ara unidos a xilosa y es una enzima involucrada en la degradación de la hemicelulosa.

1.3.2.3.2 Endo-arabinasas (*EC* 3.2.1.99): hidrolizan en forma aleatoria las uniones  $\alpha$ -1,5 de los arabinanos, potenciando la acción de las arabinofuranosidasas.

1.3.2.3.3  $\alpha$ - y  $\beta$ -Galactosidasas (*EC* 3.2.1.22 y *EC*.3.2.1.23): remueven residuos Gal de los galactanos laterales de las pectinas.

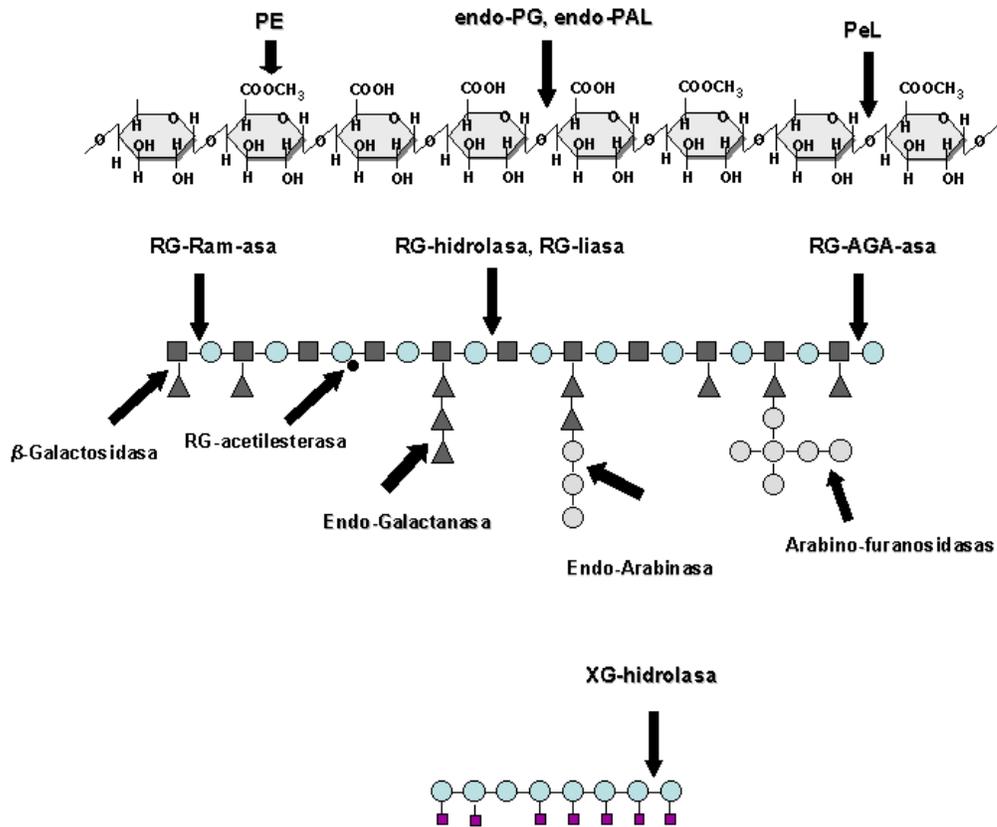
1.3.2.3.4 Endo- y exo-galactanasas (*EC* 3.2.1.164 y *EC*. 3.2.1.145): junto a la  $\beta$ -galactosidasas, son requeridas para la degradación completa de las cadenas laterales de galactano y arabinogalactano presente en las pectinas. Si bien los enlaces presentes en estas estructuras son del tipo  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,4- o  $\beta$ -1,5-, la mayoría de las endo-galactanasas estudiadas muestran preferencia por las uniones  $\beta$ -1,4. La única exo-galactanasa descrita libera Gal de galacto-oligosacáridos y posee actividad transferasa.

1.3.2.3.5 Feruloil- y p-coumaril-esterasas (*EC* 3.1.1.73): estas enzimas remueven los residuos feruloil- y coumaroil- que se encuentran esterificando al O-5 en xilanos y al O-3 en Ara u O-6 en Gal de las pectinas. Debido a la propiedad de estos residuos de producir entrecruzamiento entre la pectina y xilano con los otros polisacáridos de la pared como lignina, la acción de estas enzimas es importante para la integridad de la pared. Están muy difundidas en bacterias y hongos filamentosos.

1.3.2.3.6 Acetil- y metil-esterasas (*EC* 3.1.1.6 y *EC* 3.1.1.11): las pectin acetil o metil esterases remueven grupos acetilo y metilo de la región del HG, y han sido encontradas en plantas superiores, numerosos hongos filamentosos, levaduras y bacterias. También se ha descrito una ramnogalacturonano acetil esterasa que remueve acetilos del RG y es esencial para la acción de la RG-hidrolasa. Otra esterasa muy estudiada es la acetil-xilano esterasa, que remueve los grupos acetilo que esterifican el O-3 de la cadena principal del xilano y facilita la degradación de este polímero por las endoxilanasas.

### 1.3.2.4 Otras enzimas con acción sobre la pectina

Incluyen la galacturónico oxidasa o ácido urónico oxidasa, la cual oxida el AGA en presencia de oxígeno a ácido galactárico y  $H_2O_2$ ; las transferasas que contribuyen a la síntesis de los polisacáridos pécticos (se estima que se requieren más de 53 enzimas para llevar a cabo dicho proceso) y el conjunto de enzimas intracelulares responsables del metabolismo de los ácidos urónicos y otros. El papel exacto de la oxidasa no ha sido descrito, pero se postula que está involucrada en la modificación de componentes de la pared celular vía oxidación del AGA como defensa del vegetal <sup>61</sup>. Aún no ha sido descrita esta enzima en microorganismos.



**Figura 1.5:** Polímeros estructurales de la pectina y sitio de ataque de las pectinasas <sup>49</sup>.

### 1.3.3 Aplicaciones de las enzimas pectolíticas

Las enzimas pectolíticas se han aplicado en la industria de bebidas y alimentos por más de 60 años.

La aplicación más tradicional de las pectinasas es en la clarificación de jugos. El jugo que resulta luego del prensado de la fruta, por ejemplo de manzana o uva, es turbio

debido a la presencia de fragmentos de pared celular y a complejos formados por proteínas positivamente cargadas rodeadas de una capa de pectina con carga negativa. La repulsión de estos complejos entre si los mantiene en suspensión<sup>64</sup>. El agregado de una mezcla de PGasa y PME o bien de PeL sola, produce la degradación de la capa externa de pectina, promoviendo la interacción electrostática de los complejos, su precipitación y la consiguiente clarificación del jugo. En algunos casos, la pérdida de turbidez del jugo es indeseable, como en los jugos cítricos destinados al consumo. Cuando los frutos se exprimen, la PME endógena demetoxila la pectina y promueve su interacción con el  $\text{Ca}^{+2}$  presente en el jugo, dando lugar a la precipitación del pectato de calcio y la consiguiente autoclarificación. La degradación parcial de la pectina mediante el uso selectivo de una PGasa o PeL genera productos de bajo peso molecular no precipitables con el calcio y de este modo evita la autoclarificación<sup>65</sup>.

Otra aplicación es el llamado enzimado de pulpa (pulp enzyming). En este caso, las pectinasas se adicionan a la masa prensada de frutas, las que generalmente contienen mucha pectina, por ej.: frutillas, cerezas, grosellas, frambuesas e incluso manzanas y uvas. Las pectinasas degradan la pectina que causa la gelificación de la pulpa, facilitando el proceso de filtración. Este proceso se ha aplicado también para aumentar el rendimiento del prensado en la producción de aceites de oliva, palma y coco.

Otro proceso de gran interés es la maceración, cuyo objetivo es degradar la laminilla media del tejido vegetal para producir células libres relativamente intactas<sup>47, 66</sup>. Dicho proceso fue originalmente desarrollado para obtener bebidas viscosas, turbias y con pulpa, llamadas néctares. Algunas de las frutas usadas para estos productos son las peras, duraznos, damascos, papaya, maracuyá y guayaba. De igual modo, la maceración es empleada para obtener purés de vegetales como zanahorias, morrones u otros, con alto contenido de sólidos, pigmentos y vitaminas, que se emplean en la alimentación de bebés y adultos mayores, y como aditivos alimentarios. Las enzimas preferentemente empleadas para la maceración de los tejidos vegetales, son las PGasas y PeL. En este proceso, la presencia de PME (tanto endógena como exógena) es indeseable pues la acción de esta enzima transformaría el proceso de maceración en un enzimado de pulpa<sup>67</sup>.

A través de la acción combinada de pectinasas y celulasas se puede lograr la degradación completa de la pared celular dando lugar a la lisis y la consiguiente liberación del jugo celular. Este proceso, conocido como licuefacción, se aplica a la producción de jugos de frutas difíciles de filtrar como mango, banana o guayaba. Este proceso presenta una restricción importante, el uso de celulasas purificadas en la

elaboración de alimentos no es aceptado por las agencias regulatorias. Un proceso alternativo muy difundido es el llamado licuefacción del orujo (pomace liquefaction), que involucra el prensado de la pulpa y la obtención de jugo y el respectivo orujo. Luego el orujo se diluye en agua, se licuefacta y se vuelve a filtrar obteniéndose un segundo jugo. Esta alternativa es corrientemente empleada en la elaboración de jugos de manzana y ananá.

Además de los procesos mencionados, las pectinasas son empleadas como auxiliares tecnológicos en alimentos, para el desgomado y biorefinado (bioscouring) de fibras textiles, producción de papel, tratamiento de madera, alimentación animal, producción de detergentes y tratamiento de aguas residuales<sup>68,69, 70</sup>. Son también empleadas como herramientas analíticas en Fitoquímica, en particular en estudios sobre la estructura de la pared celular vegetal, química de polisacáridos, y para la producción de oligosacáridos y polisacáridos con propiedades farmacológicas<sup>71, 72</sup>.

#### 1.3.4 Poligalacturonasa ácida de *Aspergillus kawachii*

La fuente principal de la producción de enzimas pécticas son hongos del género *Aspergillus*<sup>62</sup>. Estos microorganismos, como otros, producen diferentes enzimas pécticas en respuesta a las condiciones de cultivo, obteniéndose al final de la fermentación un cultivo que contiene una mezcla compleja de enzimas que degradan tanto pectina como otros polisacáridos de la pared celular. Mediante el clonado de los genes correspondientes y su sobre expresión, estas enzimas pueden producirse en concentraciones equivalentes a mg/l o g/l de proteína enzimática<sup>63</sup>. Los procesos con cepas recombinantes permiten a la vez obtener cultivos en los cuales la proteína de interés es producida con un mínimo o nula presencia de otras enzimas, lo cual facilita enormemente el proceso de recuperación. Al disponer de enzimas puras en cantidades industriales, se pueden formular mezclas óptimas para cada aplicación particular (tailor-made), lo cual es muy ventajoso en comparación con el uso de mezclas complejas, muchas veces incompletamente caracterizadas, obtenidas mediante el cultivo con cepas nativas en procesos tradicionales.

*Aspergillus kawachii* es un hongo filamentoso empleado tradicionalmente para la producción de shochu (aguardiente japonés) que se caracteriza por producir enzimas extracelulares con la interesante propiedad de ser activas y estables a pH más ácidos que sus equivalentes producidas por otros microorganismos<sup>73</sup>. Varias de ellas (xilanasas, amilasas) han sido purificadas y parcialmente caracterizadas bioquímica y genéticamente<sup>74, 75</sup>. Se ha determinado que *A. kawachii* produce, según las condiciones de cultivo, al menos 4 distintas PGasas (Contreras, comunicación

personal) que poseen propiedades bioquímicas ligeramente distintas. La productividad de PGasas que produce *A. kawachii* es muy baja aun luego de la optimización de los medios de cultivo (con lo que puede aumentarse en 10 o 20 veces)<sup>76</sup> por lo que se dificulta la caracterización bioquímica y aplicación industrial de las mismas. Una alternativa para subsanar este déficit, es clonar a la proteína en un vector de expresión heterólogo y sobreexpresarla.

## 1.4 Objetivos

En la actualidad los procesos enzimáticos han ido reemplazando algunos de los procesos químicos tradicionales, por cuestiones económicas, ecológicas o por especificidad. Sin embargo, muchas de las enzimas disponibles no soportan las condiciones de reacción industriales. Como resultado de esto, los microorganismos extremófilos son una valiosa fuente de nuevas enzimas. En base a lo expuesto, se plantearon los siguientes objetivos:

- Realizar un screening de actividades enzimáticas de ocho cepas de hongos alcalino-tolerantes o alcalofílicos aislados localmente, focalizando el mismo en las enzimas que degradan pared celular vegetal.
- Estudiar la producción y purificación de las Rhasas producidas por *A. luteo-albus* y por *A. murorum* a los efectos de optimizar la cantidad de enzima producida y de esta forma poder contar con suficiente cantidad de proteína para caracterizarlas bioquímicamente.
- Determinar la capacidad de las Rhasas en estudio para hidrolizar sustratos naturales en condiciones de alcalinidad.
- Desarrollar diferentes estrategias de clonado del gen que codifica para la poligalacturonasa ácida (PG1) de *A. kawachii*.
- Analizar la expresión de PG1 activa en cada caso, y caracterizar la proteína obtenida a los efectos de evaluar su posible aplicación en procesos biotecnológicos.
- Estudiar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante en un medio de cultivo sintético y su capacidad de producir PG1 recombinante.
- Determinar las mejores condiciones de producción de la enzima recombinante en sistemas batch y batch alimentado.
- Purificar y caracterizar la proteína obtenida respecto de las características de la enzima silvestre.

## 1.5 Plan de Trabajo

1. Búsqueda bibliográfica. Estudio y análisis del estado del arte sobre los diferentes aspectos a desarrollar.
2. Screening de las actividades enzimáticas empleando sustratos y condiciones de reacción específicos a pH 9,5. Estudio preliminar de los requerimientos nutricionales de los hongos para seleccionar un medio base de cultivo. Elección del sistema de cultivo para inducir las enzimas (Fermentación en Sustrato Sólido). Cultivo de los hongos en un medio de referencia con una fuente simple de carbono (como glucosa) y en medios con pectina y extractos vegetales como potenciales inductores de la actividad enzimática.
3. Ramnosidasa alcalina de *A. luteo-albus*: Optimización de medios complejos y sintéticos. Desarrollo de estrategias de purificación de la enzima. Determinación de la estabilidad enzimática y de las condiciones óptimas de reacción. Estudio de las características bioquímicas de la enzima: PM, pl, parámetros cinéticos, efecto de diferentes cationes sobre la actividad enzimática. Análisis de la especificidad de la enzima sobre ramnoglucósidos naturales.
4. Ramnosidasa alcalina de *A. murorum*: Optimización de la producción en diferentes medios. Purificación de la proteína con actividad ramnosidasa. Determinación de las condiciones óptimas de reacción y caracterización bioquímica de la enzima: PM, pl Parámetros cinéticos, efecto de varios cationes sobre la actividad, especificidad sobre ramnoglucósidos naturales. Caracterización proteómica de las dos ramnosidasas.
5. Clonado de la poligalacturonasa ácida de *A. kawachii* en *S. cerevisiae*: Análisis Bioinformático. Clonado de pg1 con intrón en pYES2. Estrategia de clonado y sobre expresión de pg1 sin intrón en pYES2. Clonado de pg1 en los vectores constitutivos p426 y p416.
6. Estudio de la producción de la poligalacturonasa ácida recombinante: Cultivos a escala frasco agitado. Cultivos en batch y batch alimentado a escala de biorreactor. Desarrollo de estrategias de purificación de la PG1 recombinante y caracterización bioquímica de la misma: determinación de PM y pl, efecto de pH sobre la actividad enzimática y estabilidad térmica. Mapeo peptídico.

## 1.6 Referencias Bibliográficas

1. Headon,D. & Walsh,G. The industrial production of enzymes. *Biotech Adv* 12, 635-646 (1994).
2. Dunnill,P., Langley,B.W., Hartley,B.S., & Gould,P. Immobilized Cell and Enzyme Technology [and Discussion] in *New Horizons in Industrial Microbiology* 409-420 (The Royal Society, 1980).
3. Gasesa,P. & Hubble,J. *Tecnología de las enzimas* Zaragoza, 1990).
4. Tramoy,P. Review on The Enzyme Market. Life science On line . 2008. Ref Type: Magazine Article
5. Walsh,G. & Headon,D. *Protein Biotechnology*(Wiley, Chicester, UK, 1994).
6. Van den Burg,B. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology* 6, 213-218 (2003).
7. Herbert,R.A. A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends Biotechnol* 10, 395-401 (1992).
8. Madigan, .T., & Marris,B.L. Extremophiles. *Sci Am*66-71 (1997).
9. Sellek G.A. & Chaudhuri J.B. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme Microb Technol* 25, 471-482 (1999).
10. Marhuenda-Egea F.C., Piere-Velazquez S., Cadenas C., & Cadenas E. An extreme halophilic enzyme active at low salt in reversed micelles. *J. Biotechnol.* 93, 159-164 (2002).
11. Kocabiyik S & Erdem B Intracellular alkaline proteases produced by thermoacidophiles: detection of protease activity by gelatin zymography and polymerase chain reaction (PCR). *Bioresource Technol* 84, 29-33 (2002).
12. Saeki,K. *et al.* A novel species of alkaliphilic Bacillus that produces an oxidatively stable alkaline serine protease. *Extremophiles* 6, 65-72 (2002).
13. Bertoldo C & Antranikian G Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic Archaea and bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 6, 151-160 (2002).
14. Serour E & Antranikian G Novel thermoactive glucoamylases from the thermoacidophilic Archaea *Thermoplasma acidophilum*, *Picrophylus torridus* and *Picrophilus oshhimae*. *Antonie Leeuwenhoek* 81, 73-83 (2002).
15. Kammonen,J., Tururen,O., & Leisola,M. Protein engineering of Industrial enzymes in *Enzyme Technology* (eds. Pandey,A., Webb,C., Soccol,C.R. & Larroche,C.) 580-600 2009).
16. Contreras Esquivel,J.C. & Voget,C.E. Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *J Biotechnol* 110, 21-28 (2004).

17. Garcia Mesa M. *et al.* Plantas cítricas en el tratamiento de enfermedades vasculares. *Rev Cubana Angiol y Circ Vasc* 3, 39-46 (2002).
18. Peterson, J. *et al.* Flavonones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, S74-S80 (2006).
19. Cordonnier, R.E. & Bayonove, C. Mise en évidence dans la baie de raisin var. Muscat d'Alexandrie de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *C. R. Acad. Sci.* 278, 3387-3390 (1974).
20. Lorenzo Bürger, D.A., Bordeu Schwarze, E., & Belancic Majcenovic, A. Evaluación analítica y sensorial de aromas en vinos Carménère producidos con cuatro cepas de levaduras. 2007. Pontificia Universidad católica de Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
21. Maicas, S. & Mateo, J.J. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 322-335 (2005).
22. Birgisson, H. *et al.* Two new thermostable α-L-rhamnosidases from a novel thermophilic bacterium. *Enzyme Microb Technol* 34, 561-571 (2004).
23. Miake, F. *et al.* Purification and characterization of intracellular α-L-rhamnosidase from *Pseudomonas paucimobilis* FP2001. *Arch Microbiol* 173, 65-70 (2000).
24. Kaul, T., Middleton, E., & Ogra, P. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol.* 15, 71-79 (1985).
25. Roitner, M., Schalkhammer, T., & Pittner, F. Preparation of prunin with the help of immobilized naringinase pretreated with alkaline buffer. *Appl Biochem Biotech* 9, 483-488 (1984).
26. Pisvejcová, A. *et al.* α-L-Rhamnosidases and their use in selective trimming of natural compounds. *An. Chem. Listy* 97, 363-520 (1989).
27. Monti, D., Pisvejcová, A., Kren, V., Lama, M., & Riva, S. Generation of an α-rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products. *Biotechnol Bioeng* 87, 763-771 (2004).
28. Linhardt, R.J., Bakhit, R., Daniels, L., Mayerl, F., & Pickenhagen, W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. *Biotechnol Bioeng* 33, 365-368 (1989).
29. Lang, S. & Wullbrandt, D. Rhamnose lipids - biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 22-32 (1999).
30. Maier, R. & Soberón-Chávez, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 625-633 (2000).
31. Spagna, G., Barbagallo, R.N., Martino, A., & Pifferi, P.G. A simple method for purifying glycosidases: α-L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine. *Enzyme Microb Technol* 27, 522-530 (2000).
32. Sankyo. Preparation of antibiotic chloropolysporin-C. 63[146], 797. 1988.  
Ref Type: Patent

33. Elujoba,A. & Hardman,R. Diosgenin production by acid and enzymatic hydrolysis of fenugreek. *Fitoterapia* 58, 299-303 (1987).
34. Eliades,L., Cabello,M., Voget,C.E., & Galarza,B. Actividad queratinolítica en hongos alcalofílicos y alcalino-tolerantes aislados de suelo. *Revista Argentina de Microbiología* 39, 112 (2007).
35. Elíades,L.A. Estudio de la micobiota alcalofílica y alcalino-tolerante del suelo de los bosques de Celtis tala Gill [ex Planch] y Scutia buxifolia Reiss en el Partido de Magdalena, provincia de Buenos Aires. 2009. Facultad de Ciencias Naturales y Museo Universidad Nacional de La Plata - Argentina.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
36. de Vries,J.A., Rombouts,F.M., Voragen,A.G., & Pilnik W. Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydr Polymers* 2, 25-33 (1982).
37. Jayani,R.S., Saxena,S., & Gupta,R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem* 40, 2931-2944 (2005).
38. Sakai,T., Sakamoto,T., Hallaert,J., & Vandamme,E.J. Pectin, pectinase, protopectinase: production, properties, and applications. *Adv Appl Microbiol* 39, 213-294 (1993).
39. Aspinall,G.O. *Chemistry of cell wall polysaccharides, The Biochemistry of plants*(Academic Press, New York, 1980).
40. McNeil,M., Darvill,A.G., Fry,S.C., & Albersheim,P. Structure and function of the primary cell wall of plants. *Ann. Rev. Biochem* 53, 625 (1984).
41. Darvill,A.G., McNeil,M., Albersheim,P., & Delmer,D.P. *The primary cell walls of flowering plants, the biochemistry of plants.*(Academic press, New York, 1980).
42. Darvill,A.G., McNeil,M., & Albersheim,P. Structure of plant cell walls VIII: a new pectic polysaccharide. *Plant Physiol.* 62, 418 (1978).
43. Willats,W.G.T., Knox,J.P., & Mikkelsen,J.D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* 17, 97-104 (2006).
44. McFeeters,R.F., Hankin L., & Lacy G.H. Pectinolytic and pectolytic microorganisms in *Compendium of methods for the microbiological examinations of food.* (eds. Vanderzant C & Splittstoesser D.) 213-223 1992).
45. Collmer,A. & Keen,N.T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review Phytopathology* 24, 383-409 (1986).
46. Hugouvieux-Cotte-Pattat,N., Condemine,G., Nasser,W., & Reverchon,S. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrisanthemi*. *Annual Review Microbiology* 50, 213-257 (1996).
47. Pilnik W. & Rombouts,F.M. Pectic Enzymes in *Enzymes and Food Processing.* (eds. Birch,G.G., Blakebrough,N. & Parker,K.J.) 105-128 (Applied Science Publishers LTD, London, 1981).
48. Darvill,A. *et al.* Oligosaccharins: oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. *Glycobiology* 2, 181-198 (1992).

49. Voragen,A.G., Beldman,G., & Schols,H.A. Chemistry and enzymology of pectins in *Advanced Dietary Fibre Technology* (eds. McCleary,B.V. & Prosky,L.) 379-398 (Blackwell Science, 2001).
50. Rombouts,F.M. & Pilnik W. Pectic enzymes in *Microbial enzymes and Bioconversions, Economis Microbiology* (ed. Rose,A.H.) (Academic Press, London, 1980).
51. Fogarty,W. & Kelly,C.T. Pectic enzymes in *Microbial Enzymes and Biotechnology* (ed. Fogarty,W.) 131-182 (Applied Science, New York, 1983).
52. Schols,H.A. Structural characterization of pectic hairy regions isolated from apple cell walls. 1-155. 1995. Wageningen Agricultural University. The Netherlands.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
53. Mutter,M. New rhamnogalacturonan degrading enzymes from *Aspergillus aculeatus*. 1997. Wageningen University. The Netherlands.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
54. Vlugt-Bergmans,C.J.B., Meeuwsen,P.J.A., Voragen,A.G.J., & Ooyen,A.J.J.v. Endo-xylogalacturonan hydrolase, a novel pectinolytic enzyme. *Applied Enviromental Microbiology* 66, 36-41 (2000).
55. Iguchi,K., Hirano,H., Kishida,M., Kawasaki,H., & Sakai,T. Cloning of a Protopectinase gene of *Trichosporon penicillatum* and its expression in *Sacharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143, 1657-1664 (1997).
56. Parenicová,L., Benen,J., Kester,H., & Visser,J. pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* 345, 637-644 (2000).
57. Henrissat,B. & Bairoch,A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293, 781-788 (1993).
58. Parenicová,L. Pectinases of *Aspergillus niger*: a molecular and biochemical characterisation. 2000. Wageningen Agricultural University. The Netherlands.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
59. Wang,M.C. & Keen,N.T. Purification and characterization of endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 141, 749-757 (1970).
60. de Vries,R.P. Accesory enzymes from *Aspergillus* invloved in xylan and pectin degradation. 1999. Wageningen Agricultural University. The Netherlands.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
61. Expression systems. *Curr Opin Biotechnol* 8, 641-658 (1997).
62. Voragen,A.G. & Pilnik W. Pectin-degrading enzymes in fruit and vegetable processing. *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*93-115 (1989).
63. Dalbøge,H. Expression cloning of fungal enzyme genes: a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. *FEMS Microbiol Rev* 21, 29-42 (1997).

64. Pilnik W. & Rombouts, F.M. Utilization of pectic enzymes in food production in *Food Science and Technology* (eds. Chiba, H., Fujimaki, M., Iwai, K., Mitsuda, H. & Morita, Y.) 269-277 (Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1979).
65. Bonnin, E. *et al.* *Aspergillus niger* I-1472 and *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533, selected for the biotransformation of ferulic acid to vanillin, are also able to produce cell wall polysaccharide-degrading enzymes and feruloyl esterases. *Enzyme Microbiology and Technology* 28, 70-80 (2001).
66. Renard, C., Voragen, A.G., Thibault, J.F., & Pilnik W. Studies in apple protopectin. V: structural studies on enzymically extracted pectin. *Carbohydr Polymers* 16, 137 (1991).
67. Pilnik W. & Voragen, A.G. The significance of endogenous and exogenous pectic enzymes in fruit and vegetable processing in *Food enzymology* (ed. Fox, P.F.) 303-336 (Elsevier Applied Science, New York, 1991).
68. Shivakumar, P.D., Nand, A., & Krishna, P. Anaerobic degradation of pectin by mixed consortia and optimization of fermentation parameters for higher pectinase activity. *Lett Appl Microbiol* 20, 117-119 (1995).
69. Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N., & Beg, Q.K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 409-418 (2002).
70. Rättö, M. & Viikari, L. Pectinases in wood debarking in *Pectins and Pectinases* (eds. Voragen, A.G.J. & Visser, J.) 979-982 The Netherlands, 1996).
71. McCleary, B.V. Enzymatic modification of plant polysaccharides. *Int J Biol Macromol* 8, 349-354 (1986).
72. Yamada, H. Pectic polysaccharides from chinese herbs: structure and biological activity. *Carbohydr Polymers* 25, 269-276 (1994).
73. Contreras Esquivel, J.C., Hours, R.A., Voget, C.E., & Mignone, C.F. *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. *J Biosci Bioeng* 88, 48-52 (1999).
74. Mikami, S., Iwano, K., Shinoki, S., & Shimada, T. Purification and some properties of acid-stable  $\alpha$ -amylases from shoshu koji (*Aspergillus kawachii*). *Agric. Biol. Chem.* 51, 2495-2501 (1987).
75. Ito, K., Ogasawara, H., Sugimoto, T., & Ishikawa, T. Purification and properties of acid-stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci Biotechnol Biochem* 56, 547-550 (1992).
76. Cavalitto, S.F. & Mignone, C.F. Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Process Biochem* 42, 175-179 (2007).



## Capítulo 2

**B**úsqueda de enzimas alcalofílicas producidas  
por hongos filamentosos.



## Resumen

Se llevó a cabo un screening de actividades enzimáticas de un grupo de hongos filamentosos aislados de suelos con alto porcentaje de carbonato de calcio y pH entre 7,2 y 9,0, que constituyen el ecosistema de bosques nativos xéricos dominados por tala y coronillo. El estudio preliminar del crecimiento de cada una de las cepas fúngicas en distintos medios alcalinos agarizados (con glucosa o sacarosa como FCE y triptona o peptona como FN) arrojó valores de  $\mu$  entre  $0,0063 \pm 0,0016$  y  $0,0068 \pm 0,0013 \text{ h}^{-1}$ . Luego, se realizaron fermentaciones en sustrato sólido (FSS) utilizando perlita embebida con diferentes medios de cultivo (con glucosa, pectina o jugo V8 como FCE y triptona como FN) como soporte. La perlita fue caracterizada en cuanto a su capacidad de adsorción y desorción de agua, encontrándose que, para lograr un valor de  $a_w$  de 0,98 como mínimo aceptable para los cultivos, la humedad del soporte no debe ser inferior a 6 g de  $\text{H}_2\text{O}$  / g de sólido seco. En las condiciones de FSS propuestas, todos los hongos crecieron eficientemente en el medio con glucosa. En el medio con pectina sólo dos hongos mostraron alta capacidad de asimilarla y en el medio con jugo V8 el consumo de azúcares totales fue elevado en casi todos los casos.

El screening de actividades enzimáticas pécticas determinó la presencia de actividades alcalinas tales como: pectin liasa, poligalacturonasa y ramnogalacturonasa. También fueron detectadas actividades alcalinas de xilanasa y celulasa en diferentes medios. Por otro lado, a partir de la determinación de actividades glicosidasas, se comprobó la ausencia de actividad  $\beta$ -galactosidasa en todas las cepas y presencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa en algunos de los cultivos. El hallazgo más importante, sin embargo, fue la determinación de la presencia de actividad Rhasa a pH 9,5 en cultivos de *A. luteo-albus*. Esta enzima resultó inducible por naringina (0,83 y 2,83 mU/ml en ausencia y presencia de naringina, respectivamente) y fue empleada para hidrolizar este sustrato natural. Estos resultados sugieren su potencial catalítico para hidrolizar flavonoides en condiciones alcalinas, siendo este el primer reporte de una Rhasa con esta propiedad. Esta enzima presenta posibles aplicaciones tecnológicas en procesos relacionados con la producción de ramnosa y la hidrólisis de sustratos sintéticos y naturales.

## 2.1 Introducción

Los avances de la Biotecnología de las últimas décadas, especialmente en Genética e Ingeniería de proteínas, han otorgado a las enzimas un rol fundamental dentro de los procesos industriales<sup>1</sup>. Actualmente existe una tendencia creciente a reemplazar algunos procesos químicos tradicionales por procesos biotecnológicos, que impliquen el uso de microorganismos y/o enzimas (biocatalizadores), ya que no sólo constituyen una alternativa menos agresiva para el medio ambiente, sino que también pueden ser económicamente más viables<sup>2</sup>. Un biocatalizador debe ser efectivo bajo las condiciones de trabajo del proceso en cuestión para que pueda ser utilizado y tenga un impacto positivo significativo sobre el mismo. Por lo expuesto, el desarrollo de productos enzimáticos de origen microbiano usualmente recae en el screening inicial de un gran número de microorganismos adaptados a distintas condiciones ambientales a los efectos de conseguir enzimas con características físicas y bioquímicas aptas para la aplicación particular que se desea realizar. En una etapa posterior, el biocatalizador se purifica, se determinan sus propiedades más relevantes y se investiga la factibilidad técnica del proceso enzimático. Esta etapa suele complementarse con el desarrollo de técnicas de biología molecular para el clonado y sobreexpresión del gen que codifica la proteína enzimática con varios fines, tales como la producción de biocatalizador en cantidad adecuada (mg/l o g/l de proteína enzimática) para ensayos en mayor escala, simplificar el proceso de purificación y aumentar la actividad y estabilidad del biocatalizador (ingeniería de proteínas). Finalmente, la adopción de un nuevo proceso enzimático dependerá de varios factores, como por ejemplo el impacto en la calidad y costo del producto final y ventajas ambientales por sustitución de etapas químicas contaminantes.

El presente capítulo está relacionado con la etapa inicial del desarrollo de los procesos enzimáticos, es decir el screening de actividades enzimáticas. El objeto de estudio lo constituyen un grupo de hongos filamentosos que fueron aislados por la Dra. Marta Cabello del Instituto Spegazzini (UNLP)<sup>3</sup> de los suelos que constituyen el ecosistema de los bosques nativos xéricos dominados por *Celtis tala* Gill ex Planch. (Fam. Ulmaceae) «tala» y *Scutia buxifolia* Reiss (Fam. Rhamnaceae) «coronillo» que comprenden la comunidad boscosa más importante de la región pampeana. En estos suelos, con alto porcentaje de carbonato de calcio y pH entre 7,2 y 9,0, habitan especies de la microbiota fúngica con capacidad de crecer en medios netamente alcalinos (pH 9-10). Esta capacidad adaptativa hace suponer que tengan la propiedad de segregar enzimas alcalino-tolerantes y/o alcalino-activas, requeridas para la degradación de los sustratos presentes en el suelo. Hasta el momento no se habían

realizado estudios sobre qué tipo de enzimas producen estos microorganismos. Se ha estudiado en detalle la producción de enzimas alcalinas por parte de un grupo de hongos y Actinomycetes aislados de suelo y hojarasca de Tailandia. Este estudio tuvo como objetivo la búsqueda de organismos productores de enzimas alcalinas para aplicación biotecnológica<sup>4</sup>.

Resultó, por lo tanto, de interés realizar un screening de actividades enzimáticas alcalinas, focalizándolo principalmente en aquellas enzimas involucradas en la degradación de la pared celular vegetal, particularmente glicosidasas en general y pectinasas en particular, ya que las mismas presentan un potencial interés tecnológico.

### 2.1.1 Hongos Subdivisión Deuteromycotina: Características Generales

También denominada Fungi Imperfecti (hongos imperfectos), esta subdivisión clasifica a numerosos hongos cuya reproducción sexual no ha sido aún observada<sup>5</sup>. A excepción de las levaduras esporógenas la mayoría de las especies se reproducen por conidios, observándose que los estados conidiales son muy similares a los presentes en algunos Ascomycotinos bien conocidos. Esto permite suponer que los hongos imperfectos representan estados conidiales de Ascomycota (o más raramente Basidiomycota) cuyos estados ascígeros (desarrollo del asco) se forman tan raramente en la naturaleza que no han sido hallados, o bien han desaparecido del ciclo biológico en la evolución de estos organismos.

Con excepción del talo de las levaduras esporógenas, el talo de los Fungi Imperfecti está constituido por un micelio bien desarrollado. Los conidios generalmente son llevados por conidióforos, que pueden producirse en forma laxa e indiscriminada en las hifas somáticas o bien agruparse para constituir varios tipos de cuerpos fructíferos asexuales o conidiomas. Los caracteres básicos utilizados en la clasificación de estos hongos son la forma de reproducción; ontogenia en la producción de esporos, forma, color y tabicamiento de los conidios.

Los hongos objeto de nuestro estudio son precisamente Fungi Imperfecti, los cuales se pueden clasificar según la capacidad de crecimiento a distintos valores de pH en: a) alcalino-tolerantes, que crecen tanto a pH 9-10 como a pH 6, y b) alcalofílicos, que crecen solamente a pH 9-10. En la Tabla 2.1 se indican algunos de estos hongos, aislados de suelos de bosques perturbados y no perturbados por la acción humana, así como su contribución al índice de biodiversidad. Algunas especies, como *Paecilomyces lilacinum* y *Doratomyces stemonitis*, se encontraron en gran abundancia en ambos tipos de suelo, mientras que otros como *Acrostalagmus luteo-albus*

aparecían en forma escasa. Algunas especies fueron notablemente afectadas por el impacto de la actividad del hombre sobre el bosque. Tal es el caso de *Clonostachys rosea*, que predomina en bosques alterados, y *Beauveria bassiana*, cuya presencia en los bosques alterados es prácticamente nula. Otros hongos estudiados que no figuran en la Tabla 2.1 fueron *Volutella ciliata* y *Acremonium implicatum*.

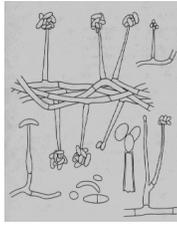
**Tabla 2.1** Clasificación de algunos hongos objeto de nuestro estudio<sup>3</sup>.

	Contribución al índice de biodiversidad	
	Bosque no disturbado	Bosque disturbado
<b>Hongos alcalino-tolerantes</b>		
<i>Paecilomyces lilacinum</i>	0,27	0,25
<i>Clonostachys rosea</i>	0,08	0,19
<b>Hongos alcalofílicos</b>		
<i>Doratomyces stemonitis</i>	0,23	0,13
<i>Acremonium sp.</i>	0,12	0,07
<i>Acrostalagmus luteo-albus</i>	0,02	0,009
<i>Beauveria bassiana</i>	0,009	-

A continuación se describen sucintamente las características de los géneros mencionados anteriormente.

#### 2.1.1.1. *Acremonium sp.*

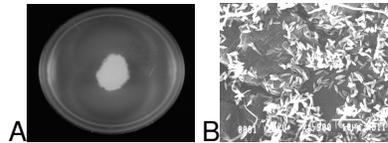
Son hongos filamentosos cosmopolitas comúnmente aislados de restos vegetales o del suelo. Las colonias de *Acremonium* crecen moderadamente rápido, con textura compacta y aterciopelada. El color de las mismas es blanco o gris pálido con un reverso incoloro; pueden ser planas o plegadas presentando ocasionalmente cierto relieve en el centro. *Acremonium* posee hifas tabicadas hialinas, comúnmente muy angostas. Las fiálides, que crecen directamente en el extremo de las hifas, son solitarias, no ramificadas y erectas. Éstas se separan de las hifas por medio de un tabique y se vuelven cónicas hacia el ápice. En dicho ápice se encuentran los conidios, fusiformes, que usualmente aparecen como clústers en esferas unidos a un material gelatinoso. Dichos conidios pueden ser unicelulares o multicelulares, dependiendo de la especie a la que pertenezcan<sup>6,7</sup>.



**Figura 2.1:** *Acremonium sp.* Los conidios aparecen como clústers en esferas unidos a un material gelatinoso. Imagen tomada de Department of Botany, University of Toronto. David Malloch. <http://www.botany.utoronto.ca>

### 2.1.1.2 *Acremonium implicatum* (Gilman & Abbot) Gams

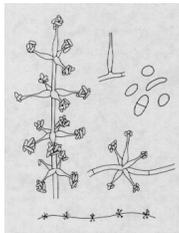
Este hongo endófito fue previamente conocido como *Paecilomyces terricola* y como *A. terricola* W. Gams.<sup>8</sup> Se ha reportado su aislamiento de suelos y de una variedad de sustratos vegetales<sup>9</sup>. Este hongo forma asociaciones endofíticas con especies de *Brachiaria*, protegiéndola de hongos patógenos que causan enfermedades en las hojas<sup>10</sup>.



**Figura 2.2:** *A. implicatum* A: cultivo puro del endófito aislado de *Brachiaria arrecta* luego de 27 días de incubación a 28°C en agar papa. B: Conidios de *Acremonium implicatum*, aislado de *Brachiaria arrecta* CIAT 16845, obtenido por microscopía electrónica de barrido<sup>10</sup>.

### 2.1.1.3 *Acrostalagmus luteo-albus* (Link: Fr) Zare, Gams et Schroers

*Acrostalagmus* es un hongo filamentososo habitante del suelo y restos de plantas cuyas colonias suelen ser blancas al iniciar el crecimiento, pero se convierten en rojas con el paso del tiempo. Algunas especies de *Acrostalagmus* pueden ser patógenas de artrópodos, plantas y otros hongos. Presenta conidióforos hialinos, simples o ramificados. La ramificación de los conidióforos aparece como una estructura con forma de rueda con un eje central. De los conidióforos surgen las fiálides, que en este caso son muy largas y también están dispuestas en forma de verticilo alrededor del mismo. Los conidios son unicelulares, ovalados o piriformes. Pueden ser solitarios o formar clusters en las puntas de los ápices.



**Figura 2.3:** *Acrostalagmus luteo-albus*: la ramificación de los conidióforos aparece como un verticilo. Imagen tomada de Department of Botany, University of Toronto. David Malloch. <http://www.botany.utoronto.ca>

#### 2.1.1.4 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

*Beauveria bassiana* es un hongo deuteromiceto que crece de forma natural en los suelos de todo el mundo. Su poder entomopatógeno lo hace capaz de parasitar a insectos de diferentes especies, causando la conocida enfermedad blanca de la muscardina. Actualmente es utilizado como insecticida biológico o biopesticida, controlando un gran número de parásitos de las plantas como son las orugas, las termitas, las moscas blancas, los áfidos, los escarabajos o los tisanópteros. Este hongo filamentoso hialino, usualmente se presenta en el suelo o en restos vegetales. El crecimiento de *B. bassiana* resulta en colonias blancas, amarillentas o rosadas con aspecto de algodón. Presenta hifas transparentes, tabicadas, con contorno regular y algunas ramificaciones. Las células conidiogénicas en las hifas tienen forma de botella con filamentos angostos y zigzagueantes en el ápice y suelen formar clusters muy densos. Lateralmente al filamento, los conidios se producen en cada punto de inflexión durante un proceso denominado crecimiento simpodial.



**Figura 2.4:** *Beauveria bassiana*, la formación de densos clusters dificulta la visualización de la estructura y disposición de conidios. Imagen tomada de <http://rosaspool.blogspot.com/2009/05/beauveria-bassiana.html>.

#### 2.1.1.5 *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schoers

*Clonostachys rosea*, antes conocido como *Gliocladium roseum*<sup>11</sup>, es una especie de hongo de la familia Bionectriaceae. Coloniza plantas vivientes como un endófito, digiere el material del suelo como un saprófito y también es un conocido parásito de otros hongos y nematodos. Produce un gran número de compuestos orgánicos volátiles que son tóxicos para organismos tales como hongos, bacterias e insectos. Se encuentra ampliamente distribuido en suelos y produce colonias blancas o amarillentas de rápido crecimiento y expansión. Este microorganismo presenta hifas tabicadas y transparentes, conidióforos erectos y ramificados en sus ápices que dan lugar a la formación de fíalides, y conidios unicelulares ovoides o cilíndricos acumulados en esferas terminales simples. Las hifas, conidióforos y fíalides de *C. rosea* son similares a las de *Penicillium*. Sin embargo, mientras que los conidios de *Penicillium* producen cadenas, los de *C. rosea* convergen en una gota mucosa para formar una estructura con forma de esfera.

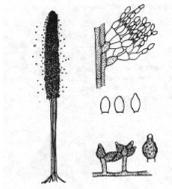


**Figura 2.5:** *Clonostachys rosea* mostrando dos tipos de conidióforos. Los primarios, tipo *Verticillium*, son los primeros en formarse, luego surgen conidióforos más complejos tipo *Penicillium*. Fuente:

[http://www.tamagawa.ac.jp/sisetu/gakujutu/alsrc/tama\\_kin/slide08E.htm](http://www.tamagawa.ac.jp/sisetu/gakujutu/alsrc/tama_kin/slide08E.htm)

#### 2.1.1.6 *Doratomyces stemonitis* (Pers. ex Steud.) Morton & G. Sm.

*Doratomyces* es un género que suele habitar el suelo y restos vegetales. Se caracteriza por un crecimiento que resulta en colonias negras o castaño oscuras. Presenta conidióforos castaños oscuros unidos en un fascículo para formar una estructura fructífera compuesta denominada sinema. La parte superior del sinema está cubierta por anélicos con forma de botella de los que surgen las cadenas de conidios grises o castaños.



**Figura 2.6:** *Doratomyces stemonitis*: Se observan conidios oscuros surgiendo del sinema. Imagen tomada de Department of Botany, University of Toronto. David Malloch. <http://www.botany.utoronto.ca>

#### 2.1.1.7 *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson

*Paecilomyces lilacinus* es un hongo filamentoso saprófito que ha sido aislado de una amplia variedad de hábitats, incluyendo suelos, bosques, desiertos y sedimentos de estuarios, siendo frecuentemente detectado en la rizósfera de diferentes cereales. Esta especie es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas (de 8 a 38°C) y también presenta una amplia tolerancia a pHs extremos y variedad de sustratos. *P. lilacinus* forma un micelio denso que da origen a los conidióforos. Estos soportan las fiáldes divergentes y las largas cadenas de conidios elípticos. Las esporas germinan cuando las condiciones nutricionales y ambientales apropiadas están disponibles. Las colonias en agar malta crecen bastante rápido, llegando a un diámetro de 5–7 cm dentro de los 14 días a 25°C. Las hifas vegetativas son lisas, hialinas y de 2,5–4,0 µm de espesor. Los conidióforos, que surgen de las hifas sumergidas, son de 400–600 µm de longitud<sup>12, 13</sup>.



**Figura 2.7:** Filiadas largas y divergentes, cadenas de conidios elípticos nacidos de estructuras fructíferas complejas características de *Paecilomyces lilacinus*; 460 ×<sup>14</sup>.

### 2.1.1.8 *Volutella ciliata* Alb. & Schw. ex Fr.

Este género de hongos habita el suelo y restos de vegetales. Presenta ramificaciones alrededor del esporodoquio (cuerpo fructífero asexual pequeño compuesto por un estroma que carga una capa compacta de conióforos en su superficie). Dichas ramificaciones actúan como un escudo contra depredadores. Los conidios suelen estar envueltos en una sustancia muy viscosa.



**Figura 2.8:** *Volutella ciliata* surgiendo de restos de una hoja. Imagen tomada de <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCE2002/volutell.htm>

### 2.1.2 Cultivos de hongos imperfectos

Los hongos pueden cultivarse *in vitro* sobre la superficie de medios agarizados, o bien sobre medios particulados sin agua libre, sistema que se denomina fermentación en sustrato sólido (FSS). Alternativamente, se los puede cultivar en medios líquidos (cultivos sumergidos) donde el micelio se encuentra completamente disperso en el medio acuoso. Desde el punto de vista fisiológico, la FSS es el sistema de cultivo que probablemente mejor refleje las condiciones ambientales que estos hongos encuentran en el suelo. Los hongos filamentosos se adaptan fácilmente a este tipo de sistema, ya que su crecimiento en forma de hifas los favorece desde el punto de vista de la colonización y el aprovechamiento de nutrientes disponibles. La FSS se puede realizar empleando sustratos naturales con alta capacidad de adsorber agua, como granos (arroz, cebada), residuos agroindustriales (afrechos, pomazas de frutas) o bien utilizando un soporte poroso inerte impregnado con medio nutritivo. Algunos soportes empleados a tal fin son la perlita, cáñamo, pajas de trigo y/o arroz, etc. La elección del soporte depende de su capacidad de absorción de agua, porosidad y tamaño de partícula, factores que cumplen un rol fundamental en el control de humedad, temperatura y aireación del sustrato. En el presente trabajo se adoptó la FSS como sistema de cultivo empleando un sustrato inerte poroso, perlita, impregnado con un medio nutritivo alcalino. De este modo se trató de simular el ambiente calcáreo de los suelos que habitan los microorganismos en estudio <sup>15</sup>.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Reactivos químicos:

Pectina cítrica (85 % de AGA anhidro, grado de metoxilación GM, 53 % y 93 %), APG (sal sódica, 90 % de AGA anhidro), xilano de madera de haya, AG de madera de alerce, pnp-Glu, ONPG, pnp-Ram, 3-fenil-fenol (*m*-hidroxidifenilo); CMC y AGA monohidrato fueron obtenidos de Sigma Chemicals (St. Louis, MO, EE.UU.). APD fue de Merck, peptona de soja de Oxoid y triptona de Difco. El AM fue de Britania (Argentina).

El RG de soja fue obtenido de Megazyme (Irlanda). Este sustrato es preparado a partir de fibras de soja mediante la hidrólisis exhaustiva con enzimas pécticas, celulasas y proteasas. El producto comercial tiene bajo contenido de Ara y Gal debido al tratamiento enzimático efectuado con  $\beta$ -galactosidasa y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa que remueven las cadenas laterales. Esto aumenta el contenido relativo de residuos Xil que se encontrarían unidos al AGA en el xilogalacturonano o a Ram en el RG. En la Tabla 2.2 se presenta la composición del RG comercial según indicación del fabricante.

**Tabla 2.2:** Composición de ramnogalacturonano de soja (moles %).

Azúcar	Moles (%)
Acido galacturónico	48
Ramnosa	18,5
Arabinosa	6,5
Galactosa	1,1
Xilosa	25,2

El jugo V-8®, adquirido localmente, es producido y distribuido por Campbell Soup Company, EE.UU. El mismo se clarificó por adición de CaCO<sub>3</sub> (12,5 g/l) y centrifugación.

Para la FSS se utilizó perlita expandida de uso agrícola (PERLOME®), provista por Laboratorios Biagro S.A. (Argentina), como material inerte. Perlita es un nombre genérico que designa un cierto tipo de roca o vidrio natural. Su principal característica es que al ser calentada a temperaturas superiores a 800°C sufre un proceso de expansión (por evaporación del agua ligada) que incrementa su volumen entre 4 y 20

veces respecto al original (perlita expandida). El material resultante es de color blanco, posee alta porosidad, pH neutro y puede absorber varias veces su peso en agua. El producto comercial se tamizó, utilizándose la fracción que pasa malla de 2 mm (+80) y se retiene en malla de 1,18 mm (-100). La densidad aparente del material resultó ser de 0,16 g/cm<sup>3</sup>.

La naringina técnica (85 % p/p, de pureza) fue provista gentilmente por el Dr. Guillermo Ellenriedel de la Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta. Esta naringina debió ser purificada antes de emplearla como sustrato. Para tal fin, se llevó a cabo una recristalización disolviendo 470 mg de naringina técnica en 5 ml de etanol (96 %, v/v) a 75°C en un vial cerrado. Dicha mezcla fue centrifugada para remover la fracción insoluble y cristalizada a partir del sobrenadante. Luego de secado a 110°C, se obtuvo un sólido cristalino blanco con un punto de fusión de 170°C. Como el valor de bibliografía del punto de fusión para naringina dihidrato es de 171°C<sup>16</sup>, se asume que el producto obtenido posee un alto grado de pureza. Finalmente, el grado de purificación del sustrato fue verificado por medio de TLC, empleando metanol como sistema de corrida. La naringina obtenida fue disuelta en buffer Tris-HCl (20 mM, pH 9,5) a una concentración de 1 mg/ml para ser usada como sustrato.

## 2.2.2 Medios y condiciones de cultivo

### 2.2.2.1 Microorganismos:

Diferentes especies fúngicas (*Acremonium implicatum* LPS cult # 764, *Acremonium sp.*, *Acrostalagmus luteo-albus* LPS cult # 748, *Beauveria bassiana* LPS cult # 803, *Clonostachys rosea* cult # 930, *Doratomyces stemonitis* LPS cult # 984, *Paecilomyces lilacinus* LPS cult # 792 y *Volutella ciliata* LPS cult # 766) fueron utilizadas para este estudio. Todas las cepas empleadas fueron proporcionadas por la Dra. Marta Cabello del Instituto Spegazzini, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Las mismas fueron recibidas como cultivos en tubos con medio agarizado.

### 2.2.2.2 Medios de mantenimiento y esporulación

Agar Malta (AM): 2 % de extracto de malta, 1,5 % de agar; pH: 7,5.

Agar papa dextrosa (APD): según especificaciones del producto, pH 7,5.

### 2.2.2.3 Cultivos en medios agarizados: estudio preliminar de crecimiento en superficie

El crecimiento de las cepas fúngicas fue evaluado en cuatro medios en los que se variaba alternativamente la FCE y/o la FN (cuya composición se tomó de Contreras y col. <sup>17</sup>) con el propósito de establecer un medio apropiado para su cultivo. Para inhibir la posible contaminación bacteriana se adicionaron estreptomycin (100 ppm) y cloranfenicol (40 ppm). La composición del medio base se describe a continuación:

Medio base, MB (g/l): FCE 5,0, FN 2,5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5, KCl 0,5,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01, ácido cítrico 0,01, agar 14; solución buffer 100 ml; solución de antibióticos 4 ml. El pH final del medio fue 9,0.

Solución buffer <sup>3</sup> (g/l):  $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  0,9;  $Na_2CO_3$  1,0. Solución de antibióticos (g/l): estreptomina 25,0 y cloranfenicol 10,0.

Como FCE y FN se emplearon las siguientes combinaciones: glucosa/triptona, glucosa/peptona de soja, sacarosa/triptona y sacarosa/peptona de soja, respectivamente.

Los cultivos se desarrollaron en cajas de Petri ( $\varnothing = 9$  cm) conteniendo 20 ml de medio AM o APD, inoculadas con cada una de las cepas. Luego de 10 días de crecimiento, se tomaron porciones de 5 mm de lado de la parte periférica de cada colonia y se transfirieron al centro de nuevas cajas de Petri conteniendo el medio en estudio. El desarrollo de la colonia fue evaluado midiendo el crecimiento radial (en mm) a las 120, 168, 240 y 269 h, bajo condiciones controladas de temperatura (30°C) y en oscuridad. El ensayo fue realizado por triplicado para cada uno de los medios.

#### 2.2.2.4 Fermentación en sustrato sólido (FSS)

##### 2.2.2.4.1 Producción del inóculo de conidios

Los conidios fueron obtenidos en cajas de Petri con 20 ml de medio AM o APG inoculadas con cada cepa. Luego de incubar durante 10 días a 30°C en oscuridad, los conidios fueron resuspendidos con 10 ml de solución estéril de Tween 80 (0,05 %, p/v) y contados en cámara de Neubauer.

##### 2.2.2.4.2 Cultivo con Perlita

La FSS usando perlita se realizó en cajas de Petri conteniendo 2,5 g de sustrato inerte e esterilizadas por autoclavado (30 min a 121°C). Una vez seca, la perlita fue impregnada con 15 ml de medio nutritivo conteniendo triptona y diferentes FCEs (glucosa, pectina y V-8) e inoculado con conidios en una concentración final de  $10^6$  conidios/ml. Las cajas fueron incubadas a 30°C en atmósfera saturada de humedad durante 72 h. Transcurrido dicho período, se realizó el correspondiente procesamiento de cada cultivo. La composición de los medios empleados se detalla a continuación:

Medio Glucosa, MG (g/l): glucosa 5,0, triptona 2,5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5, KCl 0,5,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01, ácido cítrico 0,01. Solución buffer 100 ml; solución de antibióticos 4 ml. El pH final del medio fue 9,0-9,5 antes de autoclavar.

Medio Pectina, MP: idem MG reemplazando la glucosa por pectina cítrica (53 % grado de esterificación).

Medio con V-8, MV8: idem MG pero reemplazando la glucosa por jugo V-8 clarificado en concentración equivalente a 3,0 g/l de azúcares totales.

En todos los casos, la glucosa, pectina, jugo V-8 clarificado, la FN junto con las sales y la solución buffer fueron esterilizados por separado en autoclave por 30 min a 121°C. Por otro lado, los antibióticos fueron esterilizados por filtración. Luego de la esterilización, y una vez reconstituidos los medios, el pH de los mismos osciló entre 8,9 y 9,1.

#### 2.2.2.4.3 Procesamiento de los cultivos

Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 5 g de cada cultivo y se resuspendieron en 10 ml de agua. La suspensión fue agitada durante 30 min, se determinó el pH y se filtró a través de papel de celulosa (Whatman # 40). Se reservaron 3,5 ml del filtrado para liofilizar con el objetivo de concentrar el extracto y el resto del filtrado fue congelado para su posterior análisis. Los liofilizados fueron conservados refrigerados. El resto de medio sólido fue empleado para las determinaciones de humedad. También se tomaron muestras al inicio del cultivo, las cuales se procesaron del modo antes descrito. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

### 2.2.3 Conservación de las cepas

De los cultivos originales se sembraron placas con medio APD o AM (según la cepa) e incubaron a 30°C durante 7 días. Los conidios producidos fueron resuspendidos en una solución crioprotectora conteniendo leche descremada (Molico, 10 %, p/v) e inositol trifosfato (5 %, p/v) y liofilizados en ampollas de vidrio. Al final del proceso, las ampollas con el liofilizado fueron saturadas con N<sub>2</sub> a los efectos de excluir la posible presencia de O<sub>2</sub> y vapor de agua, selladas y conservadas a 5°C. Para el desarrollo de los cultivos, las cepas liofilizadas fueron recuperadas por medio de rehidratación lenta con agua estéril seguida por plaqueo en medio de mantenimiento. Este cultivo, denominado cultivo stock (CS), fue conservado refrigerado por un período no mayor de 2 meses; transcurrido este tiempo fue desechado. Todos los cultivos previamente mencionados se iniciaron a partir del CS.

### 2.2.4 Caracterización de la perlita

La máxima capacidad de absorción de agua de la perlita empleada fue determinada por gravimetría, empleándose una técnica análoga a la que se usa para medir la capacidad de campo de un suelo. Para determinar las isotermas de

adsorción/desorción de agua, la perlita seca fue autoclavada 20 min a 121°C (condiciones empleadas para la esterilización del medio de cultivo). Para el ensayo de desorción, la perlita fue impregnada con agua destilada (7 ml de agua / g de material autoclavado) e incubada a 25°C en recipientes herméticos bajo distintas condiciones de humedad relativa del aire hasta lograr el equilibrio (15 días). Para la isoterma de adsorción el material seco fue incubado en las mismas condiciones que en la isoterma de desorción. Las distintas condiciones de humedad relativa fueron obtenidas empleando soluciones de glicerol, para lo cual la fracción molar de agua (humedad relativa) fue calculada empleando la ley de Raoult:

$$a_w = n_1 / (n_1 + n_2)$$

donde:

$n_1$ : moles de agua

$n_2$ : moles de glicerol

El contenido de agua del material, una vez establecido el equilibrio, fue determinado por gravimetría a 80°C y expresado como g agua/g de material seco. Todos los resultados son representativos de al menos dos experimentos similares.

## 2.2.5 Metodología Analítica

### 2.2.5.1 Determinación de carbohidratos

La glucosa fue determinada con el kit enzimático de glucosa oxidasa/peroxidasa (Wiener, Argentina); la pectina por el método del *m*-hidroxidifenilo empleando AGA como patrón<sup>18</sup> y los azúcares totales por la técnica del fenol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> empleando glucosa como patrón<sup>19</sup>.

### 2.2.5.1 Determinación de humedad

El contenido de agua de los cultivos fue determinado por gravimetría a 80°C.

### 2.2.5.2 Determinación de proteína

La proteína soluble fue determinada por la técnica de Bradford<sup>20</sup>.

### 2.2.5.3 Determinación de actividades enzimáticas

#### 2.2.5.3.1 Preparación de las muestras de enzima

Cada muestra liofilizada fue resuspendida en 350 µl de agua bidestilada (concentración 10 x respecto del extracto) y centrifugada a 10.000 g durante 5 min a 4°C para eliminar cualquier resto de material insoluble. El sobrenadante o muestra de enzima (ME) fue conservado en baño de hielo hasta el momento de su utilización.

#### 2.2.5.3.2 Actividad glicosidasa

Las actividades  $\beta$ -D-glucosidasa,  $\alpha$ -L-ramnosidasa y  $\beta$ -galactosidasa fueron determinadas con pnp-Glu, pnp-Ram y ONPG, respectivamente. Estos compuestos al ser hidrolizados desarrollan en medio alcalino un color amarillo por la aparición del anión *p*-nitrofenolato u *o*-nitrofenolato. La adsorción alcanza su máximo valor a pH 10. En principio, se empleó el test de placa con agarosa para la determinación cualitativa de cada una de las actividades glicosidasas. Para ello se utilizaron placas de Petri conteniendo 9 ml de gel de agarosa al 2,4 % en buffer Tris-HCl (150 mM, pH 9,0), suplementado con 0,2 % (p/v) del sustrato correspondiente y 0,03 % (p/v) de azida de sodio como conservante para evitar posible desarrollo microbiano. Una vez formado el gel, se realizaron 7 perforaciones ( $\varnothing = 2$  mm) en cada una de las placas con el fin de sembrar las ME. La reacción fue desarrollada a 37°C durante 3 h. La presencia de halos amarillos alrededor de cada celda fue considerada como indicativa de la hidrólisis del correspondiente sustrato cromogénico.

Estos ensayos también fueron desarrollados en solución utilizando una mezcla de reacción conteniendo 30  $\mu$ l de la solución del sustrato correspondiente (5 mM en buffer Tris-HCl 150 mM, pH 9,0), 260  $\mu$ l de buffer Tris-HCl (150 mM, pH 9,5) y 10  $\mu$ l de ME. La reacción se detuvo mediante el agregado de 400  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,5 M) transcurrido un tiempo fijo o bien se siguió una cinética en espectrofotómetro (Beckman DU 640) durante 60 min. En ambos casos se midió la absorbancia a 420 ó 405 nm. El *o*-nitrofenolato o el *p*-nitrofenolato liberados se evaluaron a 420 nm ( $\epsilon = 4.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y a 405 nm ( $\epsilon = 18.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), respectivamente.

#### 2.2.5.3.3 Actividad liasa

Las actividades de PeL y PL fueron espectrofotométricamente determinadas a 235 nm<sup>21</sup>. Como sustratos fueron empleados pectina (GE 93 %) al 2 % en buffer Tris-HCl (100 mM, pH 9,0) para PeL o APG al 2 % en buffer Tris-HCl (100 mM, pH 9,0 conteniendo 2 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) para PL. Para efectuar la reacción se mezclaron 280  $\mu$ l de sustrato y 20  $\mu$ l de ME. La concentración de productos insaturados fue estimada a partir de la absortividad a 235 nm ( $\epsilon = 5.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### 2.2.5.3.4 Medidas de actividad enzimática por incremento de poder reductor

La actividad enzimática sobre sustratos poliméricos fue calculada a partir del incremento de extremos reductores medido por la técnica de Somogyi-Nelson<sup>22,23</sup> empleando azúcares apropiados como patrones para las curvas de calibración. Se prepararon soluciones al 0,4 % en agua deionizada de cada uno de los siguientes

sustratos: CMC; Xil; AGA, Pectina (GE 93 %); APG y RG. Las mezclas de reacción contenían: 95 µl de solución de sustrato, 95 µl de buffer Tris-HCl (100 mM, pH 9) y 10 µl de ME. Las reacciones se desarrollaron durante 3 h, y transcurrido dicho periodo, se determinó la concentración de reductores producidos. En todos los casos se analizaron los correspondientes blancos de muestra y de sustrato.

#### *2.2.5.4 Cromatografía en capa fina*

La CCF se efectuó en placas de aluminio de tamaño variable de acuerdo al número de muestras a sembrar, con Silicagel 60 (F254s, Merck) como soporte. Se empleó la técnica ascendente utilizando como solvente de corrida una solución conteniendo acetato de etilo / ácido fórmico / ácido acético / agua (10 / 1,1 / 1,1 / 2,7, v/v/v/v). Para la corrida, se sembraron 10 µl de muestra. Los solventes se eliminaron por evaporación y la detección de los productos de reacción se realizó pulverizando sobre la placa una solución al 3 % de ácido fosfomolibdico y 10 % de ácido sulfúrico en etanol (96 % v/v). Las placas fueron calentadas por 5 min a 105°C para desarrollar color <sup>24</sup>. Finalmente, se realizó un ensayo en HPCCF (cromatografía en capa fina de alta performance) empleando placas de vidrio Silicagel 60 F254s HPTLC (Merck) en las mismas condiciones que la CCF.

#### *2.2.5.5 Cromatografía líquida de alta performance*

Los azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) en el jugo V-8 clarificado se determinaron por HPLC empleando un sistema modular (Waters HPLC) equipado con una bomba (Modelo 1525), un detector de IR (Modelo 2414) y una columna (Shodex SC 1011). El volumen de inyección fue de 10 µl y las muestras se eluyeron con H<sub>2</sub>O grado HPLC a un flujo de 1 ml/min a 85°C. Los azúcares fueron identificados y cuantificados por comparación de los tiempos de retención con sus respectivos patrones.

#### *2.2.5.6 Análisis del contenido de pectina en jugo V-8 clarificado*

La pectina soluble en el jugo V-8 clarificado fue precipitada con 3 volúmenes de HCl (0,05 N) frío en etanol (96 % v/v). La muestra se mantuvo por 60 min en baño de agua/hielo y se centrifugó (5.000 g, 4°C, 10 min). El pellet obtenido fue lavado con la misma solución precipitante antes utilizada y disuelto finalmente en agua. El contenido en pectina fue determinado como se describió precedentemente.

### 2.2.6 Definición de actividad enzimática

Se definió a la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que genera un  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto en las condiciones de reacción establecidas. Todas las actividades se midieron a  $37^\circ\text{C}$ .

## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Estudio preliminar de crecimiento en medios agarizados

Se realizó un estudio preliminar de crecimiento de cada una de las cepas fúngicas en distintos medios agarizados a los efectos de establecer la composición más adecuada del medio de cultivo a emplear en los futuros estudios empleando FSS. Las cepas fúngicas fueron cultivadas en MB conteniendo 4 combinaciones diferentes de FCE y de FN. El crecimiento de las colonias, en cada caso, fue estimado midiendo el aumento del diámetro de las mismas en función del tiempo. A partir del crecimiento radial de las colonias, se comprobó que todas las cepas crecieron en los medios ensayados.

Resultó interesante estimar el crecimiento radial en forma cuantitativa. Para tal fin se empleó el modelo de Pirt<sup>25</sup>, quién desarrolló un modelo general de crecimiento de colonias bacterianas usando un razonamiento similar a aquel aplicado al crecimiento en pellets en cultivos sumergidos. El mismo fue redefinido por Trinci<sup>26</sup> para el crecimiento de hongos filamentosos. En dicho modelo, se asume que inicialmente el crecimiento de la masa de una colonia es exponencial, es decir:

$$x_t = x_0 e^{\mu t} = (\pi H d r_0^2) e^{\mu t}$$

donde:

$r_0$  es el radio de colonia a  $t = t_0$ ,

$H$  es la altura de colonia, y

$d$  la densidad de colonia

Aplicando logaritmos, esta ecuación resulta en:

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t = \ln r_0^2 \pi H d + \mu t$$

Entonces:

$$\ln r_t = \ln r_0 + \frac{1}{2} \mu t$$

Una vez que la colonia alcanza un tamaño tal que la difusión de los nutrientes hacia el centro disminuye hasta ser menor que la demanda, el crecimiento exponencial cesará

en el centro. Es decir, si bien la parte periférica de la colonia seguirá creciendo a máxima velocidad, el centro de la misma habrá dejado de crecer. Debido a que en este caso sólo se realizó un análisis comparativo, se tomaron en cuenta únicamente los valores iniciales del diámetro de colonia para estimar  $\mu$ , es decir la fase logarítmica de crecimiento. A partir de dichas correlaciones se obtuvieron valores de  $\mu$  entre  $0,0063 \pm 0,0016$  y  $0,0068 \pm 0,0013 \text{ h}^{-1}$  para las cepas en estudio. En todos los casos, no se encontraron diferencias substanciales (SD comparativamente baja) entre los valores de  $\mu$  de las 8 cepas cuando se usó el mismo medio de cultivo. Por lo tanto, se calculó el promedio de  $\mu$  de todas las cepas para comparar el crecimiento fúngico en los diferentes medios testeados (Tabla 2.3).

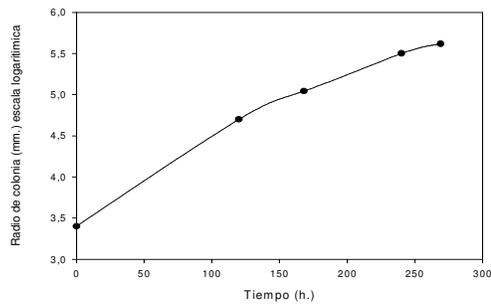
**Tabla 2.3:** Velocidades específicas de crecimiento (para todos los hongos estudiados) determinadas con diferentes combinaciones de FCE y FN

Medio		Promedio de velocidad específica de crecimiento $\pm$ SD ( $\text{h}^{-1}$ )
FCE	FN	
Glu	Tri	$0,0068 \pm 0,0013$
Sac	Tri	$0,0064 \pm 0,0016$
Glu	Pep	$0,0064 \pm 0,0013$
Sac	Pep	$0,0063 \pm 0,0016$

*Glu, glucosa; Tri, triptona; Sac: sacarosa, Pep: peptona.*

A partir de los resultados obtenidos se puede asumir que todos los hongos estudiados tienen requerimientos nutricionales similares. En general, la mayor velocidad de crecimiento fue observada en el medio glucosa/triptona, por lo cual este medio fue seleccionado como medio de referencia para la FSS. En la Figura 2.9 se muestra una curva típica de crecimiento de *A. luteo-albus* en el medio glucosa/triptona.

Si bien los valores de  $\mu$  son algo inferiores a los reportados para otros hongos como *Penicillium* y *Aspergillus*, los mismos se encuentran dentro del rango característico reportados para hongos filamentosos en general<sup>26</sup>. Esto demuestra la adaptación de los hongos en estudio a crecer en medio alcalino.



**Figura 2.9:** Curva de crecimiento de *Acrostalagmus luteo-albus* en medio agarizado conteniendo glucosa y tristona, determinado midiendo el aumento del diámetro de la colonia en función del tiempo.

## 2.3.2 Crecimiento en FSS

### 2.3.2.1 Propiedades de hidratación de la perlita

Un aspecto crítico de la FSS es el control de la actividad acuosa ( $a_w$ ) del medio, ya que en este tipo de cultivos la mayor parte del agua se encuentra adsorbida al material sólido poroso. La disminución de  $a_w$  a valores debajo del óptimo afecta marcadamente el crecimiento de los hongos (y microorganismos en general) lo que se manifiesta en una extensión de la fase de latencia, disminución de la velocidad específica de crecimiento y reducción de la producción de biomasa. Si bien los hongos pueden tolerar valores de  $a_w$  del orden de 0,95, en este trabajo se asumió como valor mínimo aceptable para el crecimiento un valor de  $a_w$  de 0,98 para evitar efectos adversos sobre el crecimiento fúngico y la producción de enzima.

Como es sabido, todo cuerpo poroso en contacto con el ambiente adsorbe o pierde humedad si no hay una igualdad entre las presiones parciales de vapor del aire circundante y del cuerpo húmedo. Mientras que los valores de la presión de vapor sean diferentes, habrá una transferencia de humedad del cuerpo al medio circundante o viceversa. La importancia o magnitud de esta diferencia depende esencialmente de la humedad relativa (HR) del aire <sup>27</sup>. Cabe destacar que durante este proceso la temperatura del cuerpo poroso tiende a alcanzar la temperatura seca del ambiente. Se concluye de lo anterior que existe una relación directa entre la temperatura, la humedad de un ambiente dado y la humedad de equilibrio del material. Se llega de esta forma a la noción de equilibrio higroscópico que en realidad corresponde al equilibrio entre las presiones parciales de vapor del aire del ambiente y del producto húmedo. Por definición, la  $a_w$  del sólido es el valor de la HR con la cual está en equilibrio y corresponde a la disponibilidad del agua para intervenir en reacciones de cualquier tipo <sup>28</sup>. En general, el contenido de agua en equilibrio varía según provenga de un proceso de desorción o adsorción, fenómeno conocido como histéresis <sup>29</sup> y depende a su vez de la micro y macroporosidad del sólido. Para caracterizar la perlita

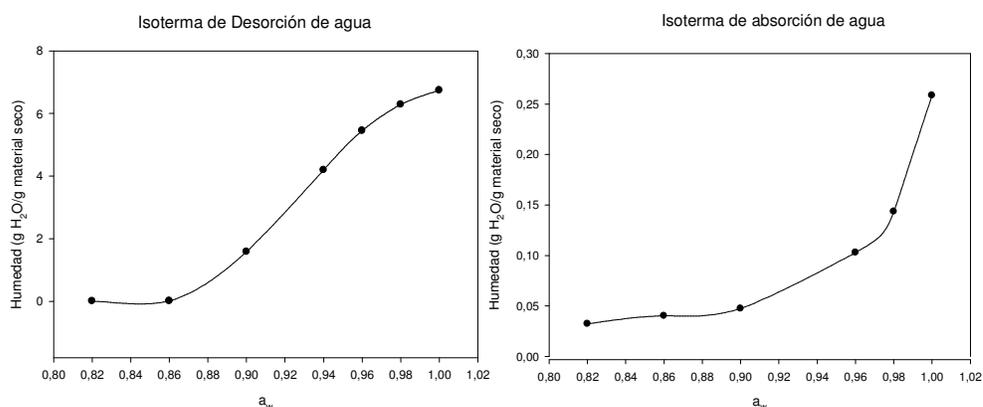
utilizada en relación a sus propiedades de hidratación (relación entre contenido de agua y  $a_w$ ), se determinaron la máxima capacidad de adsorción de agua y las isotermas de adsorción y desorción en el rango de  $a_w$  de 1,0 a 0,9.

La máxima capacidad de adsorción de agua empleando la técnica por gravedad resultó ser de 7,5 ml/g de perlita. En la Tabla 2.4 se muestran los valores de humedad en equilibrio para los procesos de adsorción y desorción de agua.

**Tabla 2.4:** Valores de humedad en equilibrio de perlita a 25°C. Perlita comercial tamizada (+80 / -100), autoclavada (30 min a 121°C) y seca. Para la isoterma de desorción, 1 g de perlita se impregnó con 7 ml de agua.

Actividad acuosa	Humedad de la perlita (g H <sub>2</sub> O / g seco)	
	Adsorción	Desorción
1	0,258	6,74
0,98	0,078	6,29
0,96	0,038	5,46
0,94	0,036	4,19
0,90	-	1,58

En la Figura 2.10 se observan los perfiles de adsorción y desorción de agua correspondientes a dicho material.



**Figura 2.10:** Isotermas de desorción y adsorción de agua en Perlita. La perlita seca autoclavada impregnada con agua destilada (7 ml de agua / g de material autoclavado) e incubada a 25°C en recipientes herméticos bajo distintas condiciones de humedad relativa del aire obtenidas empleando soluciones de glicerol.

Tal como era de esperarse, la humedad del sólido en equilibrio es menor durante la adsorción que en la desorción. Los procesos son opuestos, pero no reversibles por un

camino común, verificándose de este modo el fenómeno de histéresis. A partir de estos resultados debe tenerse en cuenta que para lograr un valor de  $a_w$  de 0,98 como mínimo aceptable para los cultivos, la humedad del soporte no debe ser inferior a 6 g de H<sub>2</sub>O / g de sólido seco.

### 2.3.2.1 Crecimiento fúngico en medio con perlita

En la Tabla 2.5 se presentan los datos de las FSS luego de 3 días de cultivo empleando perlita impregnada con cada uno de los medios descriptos anteriormente.

**Tabla 2.5:** Datos de los cultivos de los hongos en perlita. La concentración inicial de fuente de carbono fue la siguiente: glucosa 5 g/l; pectina (expresada como ácido galacturónico) y carbohidratos totales (V-8) ~ 3,0 g/l. La humedad inicial fue de 6,3 g de agua por gramo seco.

Cepa	Fuente de carbono	pH del cultivo		Humedad final (g/g)	Fuente de carbono final (mg/l)
		Inicial	Final		
<i>Acremonium sp</i>	Glucosa	9,23	8,85	5,980	0
	Pectina	9,44	8,74	6,011	3054
	V-8	9,26	8,9	6,023	207
<i>Acremonium implicatum</i>	Glucosa	9,14	8,97	6,088	0
	Pectina	9,11	8,91	6,043	2397
	V-8	9,17	9,01	6,056	271
<i>Acrostalagmus luteo-albus</i>	Glucosa	9,19	9,04	5,990	0
	Pectina	9,28	8,99	6,074	226
	V-8	9,35	9,08	5,989	197
<i>Beauveria bassiana</i>	Glucosa	9,31	8,93	5,986	0
	Pectina	9,52	9,12	6,044	2767
	V-8	9,3	9,03	6,048	410
<i>Clonostachys rosea</i>	Glucosa	9,31	8,94	6,058	0
	Pectina	9,52	8,96	6,055	151
	V-8	9,3	9,09	6,054	328
<i>Doratomyces stemonitis</i>	Glucosa	9,14	8,83	5,992	0
	Pectina	9,11	8,73	5,975	2155
	V-8	9,17	8,95	6,034	284
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Glucosa	9,23	9,19	6,019	0
	Pectina	9,44	9,3	6,074	1915
	V-8	9,26	9,27	6,018	268
<i>Volutella ciliata</i>	Glucosa	9,19	8,84	6,041	0
	Pectina	9,28	9,03	6,050	2229
	V-8	9,35	8,98	5,965	1069

Todos los cultivos se iniciaron con aproximadamente 6,3 g agua/g perlita seca y con un pH de alrededor de 9,3. Los datos muestran claramente la efectividad del sistema empleado en cuanto al control de los parámetros de cultivo durante el crecimiento fúngico y que las condiciones de cultivo elegidas fueron las adecuadas ya que los valores de pH se mantuvieron en el rango alcalino y los valores finales de humedad fueron del orden de 6 g de agua / g seco (valor mínimo aceptable preestablecido). Bajo estas condiciones, todos los hongos crecieron eficientemente en el medio con glucosa, como lo demuestra el consumo de dicha FCE (superior al 95 % en todos los casos).

Por otro lado, se observó que sólo dos hongos, *A. luteo-albus* y *C. rosea*, mostraron alta capacidad de asimilar pectina (consumo 90-95 %), mientras que su consumo fue parcial en los cultivos de *A. implicatum*, *D. stemonitis*, *P. lilacinus* y *V. ciliata*, y casi nulo en *Acremonium sp* y *B. bassiana*.

El análisis por HPLC de los carbohidratos solubles en el jugo V-8 clarificado reveló la presencia de glucosa (1,44 g/l), fructosa (1,51 g/l) y sacarosa (0,05 g/l). En los medios con jugo V8 el consumo de azúcares totales fue elevado (> 90 %) excepto en el cultivo de *V. ciliata*, lo cual indica que los hongos metabolizan fácilmente los azúcares simples presentes en este jugo, en consistencia con el crecimiento de los hongos en el medio con glucosa. *Volutella ciliata* parece ser capaz de asimilar algunos pero no todas las FCE presentes en el medio V-8.

### 2.3.3 Screening de actividades enzimáticas alcalinas

#### 2.3.3.1 Actividad pectolítica

El screening de actividades enzimáticas alcalinas en cultivos fúngicos fue llevado a cabo utilizando sustratos pécticos (pectina, APG y RG) y no pécticos (CMC y Xil). En la Tabla 2.6 se muestran los valores de actividades enzimáticas alcalinas recuperadas de las FSS usando diferentes medios sobre pectina altamente esterificada y APG, determinados por incremento de absorbancia a 235 nm (actividad liasa) y sobre estos sustratos y RG, por aumento de poder reductor (actividad pectinasa, PGasa y RGasa, respectivamente).

La presencia de actividades enzimáticas capaces de degradar pectina altamente esterificada fue observada principalmente en los cultivos de *A. luteo-albus*. La actividad de PeL fue remarcable en algunos casos: *C. rosea* y *D. stemonitis* en medio V-8, y en los cultivos de *P. lilacinus* en medio pectina.

Cuando se comparan los valores de actividad de PeL con los de pectinasa puede asumirse que la actividad PeL es la principal responsable de la degradación de pectina. Debe notarse que la actividad pectinasa a la que nos referimos es la

combinación de diferentes actividades enzimáticas que resultan en la degradación de pectina (determinada por la medida de la formación de grupos reductores) independientemente del mecanismo involucrado. En algunos casos, la actividad pectinasa fue detectada a pesar que la actividad PeL fue baja (*A. implicatum*, *C. rosea* y *V. ciliata*) o nula (*P. lilacinus*) en medio glucosa. Estos resultados (actividad pectinasa relativamente alta con baja o nula PeL) podrían ser explicados por la potencial presencia de una pectin esterasa, enzima no medida en el presente trabajo. Consecuentemente, las actividades de PL y/o PGasa podrían contribuir significativamente a la actividad pectinasa. Estos resultados coinciden con la capacidad de los hongos filamentosos en estudio de usar pectina como FCE. *A. luteo-albus* y *C. rosea* muestran la mayor actividad degradante de pectina así como también la mayor capacidad de crecer en pectina como única FCE. La alta actividad PGasa encontrada en los cultivos de *A. luteo-albus*, independientemente del medio empleado, sugiere una presencia constitutiva de dicha enzima en su pool pectolítico. Las actividades de PeL y PL fueron bajas en casi todos los hongos en el medio glucosa comparadas con aquellas encontradas en los medios con pectina o V-8. Se encontraron resultados similares en la actividad PGasa (a excepción de *A. implicatum*, *A. luteo-albus* y *C. rosea*). La represión por glucosa podría explicar este efecto: los azúcares simples tales como glucosa, arabinosa y galactosa han sido reportados como supresores de la síntesis de pectinasas alcalinas, posiblemente por un fenómeno de represión catabólica.<sup>30</sup> Sin embargo, la situación es más compleja en el medio V-8 debido a la presencia de una mezcla compleja de diferentes FCE, algunas de ellas posiblemente implicadas en la derrepresión de genes o actuando como inductores de la actividad enzimática. Es conocido que la inducción de pectinasas puede estar dada por la expresión constitutiva a bajos niveles de al menos alguno de los genes estructurales. Las cantidades basales de actividad pectinasa podrían producir cantidades traza de productos de degradación que son químicamente modificados resultando en potentes inductores de la actividad en el jugo V-8 conteniendo pectina (o fragmentos de su degradación parcial). Los altos niveles de PeL en *Acremonium sp.*, *C. rosea* y *D. stemonitis* en medio V-8 en comparación con aquellos encontrados en medio con glucosa y pectina podrían estar relacionados con el mecanismo de inducción recientemente mencionado.

La presencia de la actividad de PL es muy interesante debido a que esta enzima es producida principalmente por hongos fitopatógenos (además de varios grupos de bacterias, en particular Actinomicetes) pero no por hongos alcalinofílicos saprótrofos como los estudiados en este trabajo. Hasta el presente se consideraba que las PLs

eran secretadas principalmente por hongos fitopatógenos y su acción resultaba en la maceración de tejidos vegetales concomitante con la invasión del tejido huésped. La acción de PLs en fitopatógenos resulta no sólo en la degradación de la pared celular vegetal sino también en la activación de sistemas de defensa aparentemente a través de la liberación de oligogalacturónidos que funcionan como elicitores de defensa. En el caso de los hongos alcalinofílicos saprótrofos, las PLs alcalinas podrían contribuir a la descomposición de los depósitos vegetales presentes en el suelo degradando polímeros de pectina con propósitos nutricionales.

Las PGasas, PeL y PL son enzimas pectolíticas que actúan sobre el HG o la región lisa de la molécula de pectina. En este trabajo se intentaron detectar las actividades enzimáticas que degradan las cadenas principales de RG utilizando una preparación comercial de RG de soja como sustrato. El RG forma parte de las regiones pilosas en polímeros de pectina y la degradación del esqueleto de esta región es llevada a cabo por enzimas denominadas ramnogalacturonasas (RGasas). Las RGasas atacan los enlaces entre los residuos de AGA y los residuos de Ram en el RG. La actividad de RGasa en la que nos referimos aquí se corresponde a la capacidad de degradar RG independientemente de que el mecanismo involucrado sea hidrolítico o transeliminativo. La presencia de una actividad RGasa en los cultivos de *A. implicatum* en medio Glu, *A. luteo-albus* en todos los medios y *C. rosea* en medio V-8 es altamente remarcable, indicando que los mecanismos de inducción-represión de esta enzima en los tres hongos es diferente.

La actividad de RGasa en preparaciones comerciales suele ser limitada, estando restringida a aplicaciones en medios con pHs neutros o ácidos. En la literatura se menciona a la RGasa II de *A. aculeatus*<sup>31</sup>, que muestra una actividad óptima en el rango de pH entre 3 y 4 estando por debajo del pH de la mayoría de los materiales vegetales y del necesario para los procesos industriales que requieren de dicha actividad enzimática. Por otra parte, la RGasa de *Trametes sanguinea*<sup>32</sup> ha sido empleada a pH: 5,0. Por lo tanto, es importante proveer de una nueva variedad de RGasas (con respecto a su modo de acción y rango de pH y temperatura en el cual sean estables y activas). De este modo, su uso sería posible bajo diferentes condiciones en procesos industriales, particularmente en tecnología de alimentos, tales como la modificación de paredes celulares vegetales (liquefacción de frutos, vegetales, cereales, etc.). Por lo anterior, surge la necesidad de RGasas activas bajo condiciones alcalinas. Las actividades de RGasas alcalinas aquí descritas serían las primeras reportadas hasta el presente, con capacidad de degradar RG a pH: 9.

**Tabla 2.6:** Actividades enzimáticas producidas por las cepas en estudio en distintos medios de cultivo (mU/ml).

Extracto		Sustrato				
		Pectina (93 % GE)		Acido poligalacturónico		Ramnogalac-turonano
Hongo	Medio de cultivo	Pectin-liasa**	Pectinasa*	Pectato-liasa**	Poligalac-turonasa*	Ramnogalac-turonasa*
<i>Acremonium sp.</i>	Glucosa	0,98	1,1	0,41	<1,0	<1,0
	Pectina	ND	1,7	7,28	<1,0	2,3
	V-8	7,94	4,5	0,82	<1,0	<1,0
<i>A. implicatum</i>	Glucosa	0,74	5,6	0,49	1,5	8,4
	Pectina	3,76	<1,0	3,19	<1,0	<1,0
	V-8	5,48	<1,0	10,55	<1,0	<1,0
<i>A. luteo-albus</i>	Glucosa	22,9	11,0	1,23	8,2	6,0
	Pectina	38,45	12,5	16,5	10,3	10,0
	V-8	49,1	10,1	5,65	8,7	7,3
<i>B. bassiana</i>	Glucosa	0,74	1,2	1,80	<1,0	<1,0
	Pectina	1,88	1,7	6,87	<1,0	4,0
	V-8	1,96	<1,0	7,69	1,4	1,5
<i>C. rosea</i>	Glucosa	1,31	2,0	<1.	1,6	<1,0
	Pectina	4,83	<1,0	1,31	<1,0	<1,0
	V-8	18,25	<1,0	1,55	<1,0	12,3
<i>D. stemonitis</i>	Glucosa	ND	<1,0	1,23	<1,0	<1,0
	Pectina	ND	<1,0	9,82	<1,0	<1,0
	V-8	12,93	1,6	5,15	<1,0	<1,0
<i>P. lilacinus</i>	Glucosa	ND	3,4	ND	<1,0	1,5
	Pectina	16,69	1,4	2,78	<1,0	<1,0
	V-8	0,82	2,9	1,88	<1,0	<1,0
<i>V. ciliata</i>	Glucosa	0,90	2,4	1,15	1,2	<1,0
	Pectina	2,70	1,4	3,52	7,0	<1,0
	V-8	4,91	1,6	2,70	<1,0	<1,0

\*Actividades medidas por incremento de absorbancia a 235 nm, \*\* Actividades medidas por incremento del poder reductor empleando el método de Somogyi-Nelson. Nota: Debido a la sensibilidad del método de medida, para el caso de pectinasas, poligalacturonasas y RGAsas no se detallan las unidades de actividad cuando esta es inferior a 1 mU. Del mismo modo, para las actividades pectin liasa y pectato liasa, los valores de mU menores que 10 están muy cercanos al error experimental y son medidas que deben ser confirmadas. ND: No detectado.

En la Tabla 2.7 se detallan los valores de actividades enzimáticas alcalinas detectadas sobre sustratos poliméricos no pécticos, tales como CMC y Xil, los cuales representan el resto de los carbohidratos componentes de la pared celular vegetal.

**Tabla 2.7:** Resultados de actividad enzimática (mU/ml) en ensayo sobre sustratos poliméricos no pécticos.

Extracto		Sustrato	
Cepa	Medio de cultivo	Carboximetil-celulosa*	Xilano*
	Glucosa	0,16	0,96
<i>Acremonium. sp</i>	Pectina	8,76	15,66
	V-8	3,46	14,70
	Glucosa	5,36	18,90
<i>A. implicatum</i>	Pectina	1,31	26,13
	V-8	0,30	29,20
	Glucosa	31,67	12,55
<i>A. luteo-albus</i>	Pectina	41,98	10,38
	V-8	35,44	2,64
	Glucosa	3,34	0,80
<i>B. bassiana</i>	Pectina	0,04	2,86
	V-8	12,27	3,39
	Glucosa	8,05	8,69
<i>G. roseum</i>	Pectina	1,80	9,43
	V-8	3,08	0,06
	Glucosa	0,52	1,92
<i>D. stemonitis</i>	Pectina	0,16	10,00
	V-8	2,66	11,37
	Glucosa	4,34	8,91
<i>P. lilacinum</i>	Pectina	0,05	0,32
	V-8	3,71	6,84
	Glucosa	0	0
<i>V. ciliata</i>	Pectina	2,9	1,90
	V-8	3,8	1,99

\* Actividades medidas por incremento del poder reductor empleando el método de Somogyi-Nelson.

A diferencia de lo que ocurre con la pectina, estos hongos presentan una mayor capacidad de degradar enzimáticamente CMC y Xil. En este sentido es interesante destacar la actividad celulolítica alcalina producida por *B. bassiana* en medio V-8 y de *A. luteo-albus* en todos los medios estudiados. También la presencia de actividades xilanolíticas alcalinas producida por *Acremonium sp.* y por *D. stemonitis* en los medios Pec y V-8, la de *A. luteo-albus* en medios Glu y Pec y principalmente la de *A. implicatum* en todos los medios. Se podrían asumir diferentes patrones de inducción-represión: la actividad celulasa está baja represión catabólica por glucosa en *Acremonium sp.* y *V. ciliata* pero no en el caso de *A. implicatum* y *C. rosea*. Además, las actividades xilanasas alcalinas fueron reprimidas fuertemente por glucosa en *Acremonium sp.*, *B. bassiana* y *D. stemonitis*.

### 2.3.3.2 Actividad glicosidasa

Los ensayos de actividad glicosidasa, empleando la técnica de difusión en placa, mostraron ausencia de actividad  $\beta$ -galactosidasa en todas las cepas y presencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa en los cultivos de *A. implicatum*, *A. luteo-albus*, *C. rosea*, *D. stemonitis* y *P. lilacinus*. El hallazgo más importante, sin embargo, fue la determinación de la presencia de actividad Rhasa a pH 9,5 en los cultivos de *A. luteo-albus* en los medios Pec y V8. Debido a lo interesante de esta observación se decidió estudiar en mayor detalle dicha actividad producida por *A. luteo-albus*.

La actividad Rhasa medida con pnp-Ram indica una enzima con capacidad para hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -(1-2) y  $\alpha$ -(1,6) entre ramnosa y glucosa de los flavonoides naringina y hesperidina, diferente a la que libera ramnosa terminal del RG. Es interesante destacar que estos flavonoides son poco solubles en medio ácido (pH 5,0-6,0), condición en la cual actúan la mayoría de las ramnosidasas reportadas, siendo en este sentido altamente deseable una Rhasa alcalina que actúa en condiciones de alta solubilidad del sustrato. Por lo tanto, resultó importante verificar la actividad Rhasa sobre estos flavonoides en condiciones alcalinas. En base a este objetivo, se decidió verificar la hidrólisis de naringina en medio alcalino.

Por otra parte, y considerando que la enzima podría ser inducible, se realizaron cultivos en presencia de naringina como potencial inductor, empleando como FCE al jugo V-8. En estos cultivos se adicionó naringina (grado técnico) al medio en una concentración de 1,25 g/l. Para facilitar su incorporación, esta se disolvió primero en el buffer fosfato/carbonato, obteniendo una solución que se esterilizó por filtración. A continuación, se reconstituyeron los medios, se impregnó la perlita y el cultivo se desarrolló durante 72 h, siguiendo el mismo procedimiento de extracción que el

realizado en los cultivos descritos precedentemente. Los resultados de la actividad Rhasa (evaluados por cinética midiendo el cambio de la  $A_{405}$ ) en el extracto crudo mostraron valores de 0,83 y 2,83 mU/ml en ausencia y presencia de naringina, respectivamente. Esto demuestra que la Rhasa alcalina de *A. luteo-albus* es inducible por naringina y que este a su vez es un sustrato potencial para la enzima.

### 2.3.4 Hidrólisis de naringina con $\alpha$ - ramnosidasa alcalina de *A. luteo-albus*

#### 2.3.4.1 Purificación del sustrato

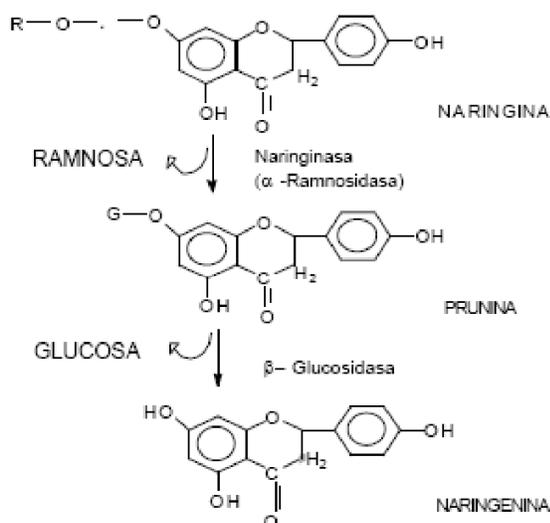
Luego de recristalizar la naringina y determinar su punto de fusión, se verificó la pureza del producto por medio de un análisis en TLC. La Figura 2.11 muestra los resultados obtenidos en dicho análisis.



**Figura 2.11:** TLC: Análisis de la purificación de Naringina. Calle izquierda: naringina recristalizada (200  $\mu$ g). Calle derecha: naringina grado técnico (200  $\mu$ g).

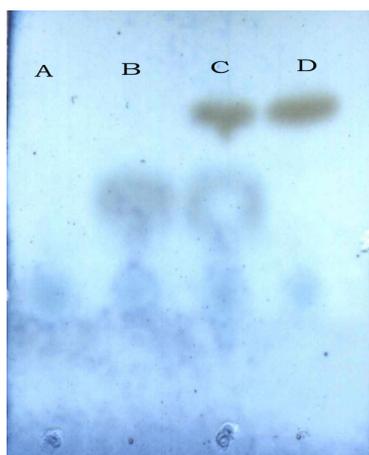
#### 2.3.4.2 Reacción de hidrólisis

La reacción se realizó a 37°C incubando 580  $\mu$ l de sustrato con 10  $\mu$ l de enzima (0,46 mU). El curso de la hidrólisis se evaluó midiendo el incremento de poder reductor (por Somogy-Nelson); indicativo de la aparición de ramnosa libre. También se determinó la liberación de glucosa (Glicemia enzimática), como indicador de actividad  $\beta$ -D-glucosidasa. Las muestras se tomaron a intervalos de 60 min (tiempo total de incubación 180 min), deteniendo la reacción por calentamiento (1 min a 100°C). El esquema de la reacción se muestra en la Figura 2.12.



**Figura 2.12:** Esquema de la hidrólisis enzimática de naringina a partir de una naringinasa.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento neto de azúcares reductores de 78 mg/l y ausencia de glucosa luego de 180 min de reacción. Estos valores indican un 24 % de hidrólisis del sustrato. Para confirmar la formación de ramnosa durante la hidrólisis, los productos de reacción se analizaron mediante CCF. En la Figura 2.13 se muestra dicho análisis, donde se comprueba que el poder reductor generado en la reacción se debe a la liberación de ramnosa, y que el orden de su concentración se encuentra en el rango esperado. La pequeña mancha que se observa debajo de la naringina en la muestra hidrolizada, probablemente corresponda a la prunina, el otro producto de la reacción de hidrólisis. Este análisis fue confirmado mediante HPCCF empleando las mismas condiciones de corrida (figura no mostrada).



**Figura 2.13:** Análisis en CCF de la hidrólisis de naringina con ramnosidasa alcalina de *A. luteo-albus*. Condiciones de reacción: naringina purificada 1,0 mg/ml en Tris-HCl (20 mM, pH 9,5). Ramnosidasa 0,46 mU, 3 h de incubación. CCF: solvente de desarrollo: acetato de etilo / ácido fórmico / ácido acético / agua (10 / 1,1 / 1,1 / 2,7, v/v/v/v). Revelador: ácido fosfomolibdico. Calles: A buffer Tris-HCl (20 mM, pH 9,5) 10  $\mu$ l; B Ramnosa: 2  $\mu$ g en buffer; C. muestra hidrolizada 12  $\mu$ l; D: sustrato sin hidrolizar: 10  $\mu$ g.

## 2.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que la FSS utilizando perlita impregnada con diferentes medios es un sistema de cultivo adecuado para simular ambientes naturales a fin de estudiar la producción de enzimas fúngicas extracelulares. Todos los hongos estudiados metabolizaron glucosa y los azúcares simples presentes en un extracto vegetal, pero mostraron diferencias significativas en su capacidad para crecer en pectina. Esto demuestra que su perfil metabólico es heterogéneo. Además, cabe destacar que los mismos pueden ser empleados como fuentes alternativas de actividades enzimáticas alcalinas con potenciales aplicaciones industriales. En particular, *A. luteo-albus* resultó el hongo más interesante debido a que ha demostrado poseer una gran versatilidad respecto al crecimiento y la producción de enzimas alcalinas extracelulares. Presenta el pool de actividades enzimáticas alcalinas degradadores de pectina más rico entre los hongos estudiados, además de actividades de celulasa y xilanasas. Este hongo también presenta la capacidad de degradar arabinogalactano bajo condiciones alcalinas (dato no mostrado). En otras palabras, este hongo es capaz de depolimerizar las ramificaciones laterales de las regiones pilosa y lisa de la pectina. Esto es un hecho remarcable considerando su bajo índice de biodiversidad. A partir de estos resultados es posible concluir que este hongo filamentoso está altamente adaptado para degradar paredes celulares vegetales en ambientes alcalinos.

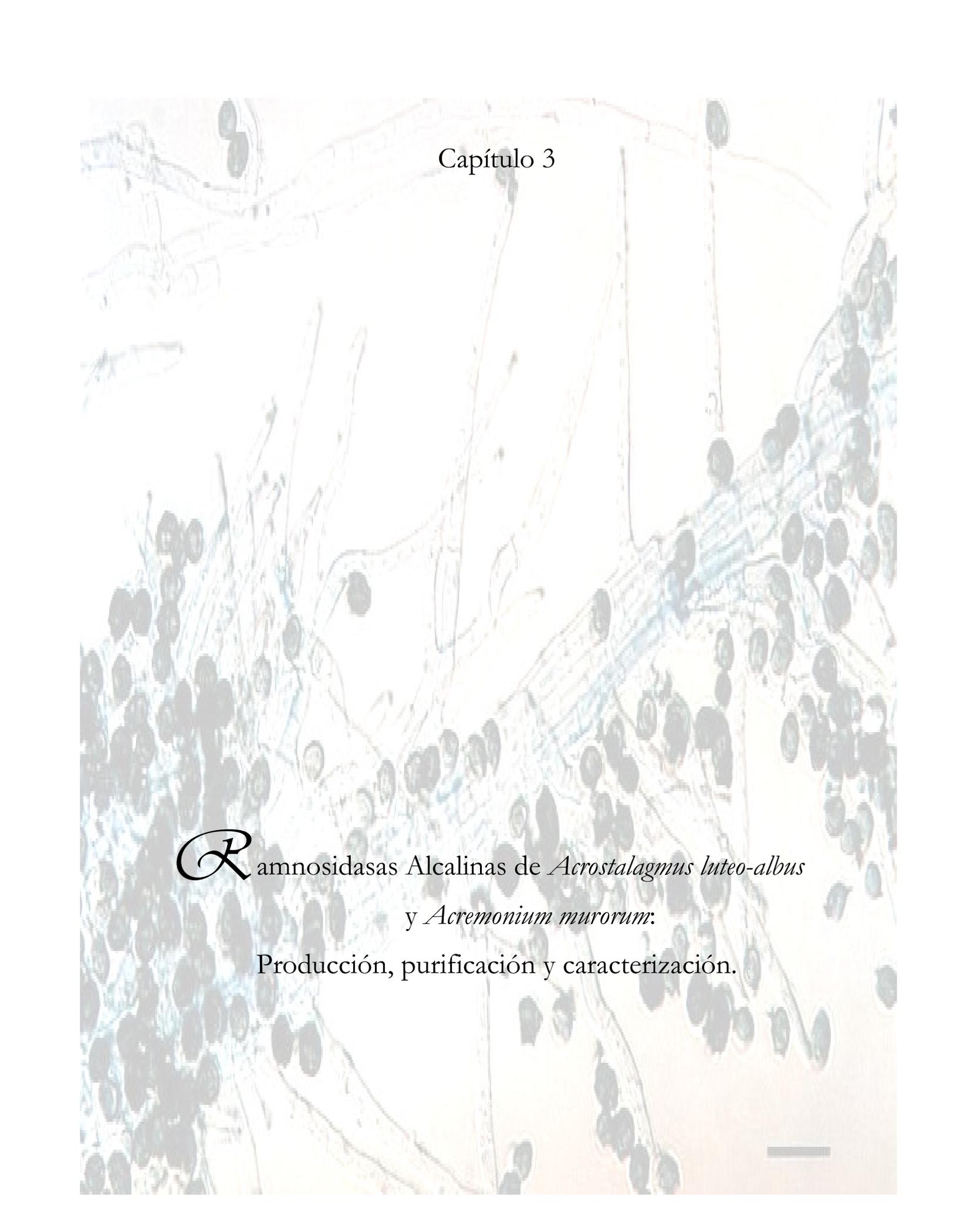
Aun son escasos los reportes sobre la aplicación de pectinasas alcalinas por lo que el desarrollo del uso de estas enzimas es todavía incipiente. Por lo tanto, es dable considerar las potenciales aplicaciones biotecnológicas de las pectinasas alcalinas de *A. luteo-albus*, particularmente en el enriado de fibras de lino, yute, cáñamo y ramio para la manufactura de productos textiles.

La Rhasa alcalina de *A. luteo-albus* hidroliza naringina a pH 9,5, lo que sugiere su potencial catalítico para hidrolizar flavonoides en condiciones alcalinas, siendo este el primer reporte de una Rhasa con esta propiedad. Esta enzima presenta posibles aplicaciones tecnológicas en procesos relacionados con la producción de ramnosa y la hidrólisis de sustratos sintéticos y naturales.

## 2.5 Referencias Bibliográficas:

1. Alkorta,I., Garbisu,C., LLama,M.J., & Serra,J.L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochem* 33, 21-28 (1998).
2. Viikari,L., Tenkanen,M., & Suurnäkki,A. Biotechnology in the pulp and paper industry. *Progress in Biotechnology* 21, 523-546 (2001).
3. Cabello,M. & Arambarri,A. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed Celtis tala and Scutia buxifolia forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). *Microbiol. Res.* 157, 1-11 (2002).
4. Meenakshi,V.R. Biodiversity and germoplasm collection of alkalophilic fungi and actinomycetes for biotechnology application. ed. National Chemical Laboratory. Project Completion Report, 421.(2004).  
Ref Type: Report
5. Rivera Coto,G. *Conceptos introductorios a la fitopatología* Editorial Universidad Estatal a distancia, San José, Costa Rica, (1991).
6. Collier,L., Balows A., & Sussman M. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections* (1998).
7. Larone.D.H. *Medically Important Fungi - A guide to Identification* Washington D.C., (1995).
8. Miller,J.H., Giddens,J.E., & Foster,A.A. A survey of the fungi of forest and cultivated soils of Georgia. *Mycologia* 49, 808 (1957).
9. Bilgrami,R.S. & Prasad,K. Biocontrol of wilt of Saccharum officinarum and enhancement of biomass and sucrose content by VAM. No. 2.7.17. 1998. Int. Congr. Plant Pathol.  
Ref Type: Conference Proceeding
10. Kelemu,S., White,J.F., & Rao,I.M. The role of endophytic fungi in Brachiaria, a tropical forage grass. 2008. International Grassland Congress.  
Ref Type: Conference Proceeding
11. Schroers H.J., Samuels G., Seifert K., & Gams W. Classification of the mycoparasite Gliocladium roseum in Clonostachys as C. rosea, its relationship to Bionectria ochroleuca, and notes on other Gliocladium-like fungi. *Mycologia* 91, 365-385 (1999).
12. Samson,R. Paecilomyces and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology* 6, (1974).
13. Anderson,T.-H., Domsch,K.H., & Gams,W. *Compendium of Soil Fungi*.1995).
14. Carey J., D'Amico,R., SuttonD., & Rinaldi M.G. Paecilomyces lilacinus Vaginitis in an Immunocompetent Patient. *Emerging Infectious Diseases* 9, 1155-1158 (2003).
15. Pandey,A. Solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13, 81-84 (2004).
16. Smith,A.R., Budavari,S., & Merck &Co *The Merck Index (English)* (United States pharmaceutical company Merck & Co.,2001).

17. Contreras Esquivel,J.C., Hours,R.A., Voget,C.E., & Mignone,C.F. *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. *J Biosci Bioeng* 88, 48-52 (1999).
18. Blumenkrantz,N. & Asboe-Hansen,G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54, 484-489 (1973).
19. Dubois,M., Gilles,K., Hamilton,J., Krobers,P., & Smith,F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28, 350-356 (1956).
20. Bradford,M.M. 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 (1976).
21. Albersheim,P. Pectin lyase from fungi. *Methods Enzymol* 8, 628-631 (1966).
22. Somogyi,N. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19-23 (1952).
23. Nelson,N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 376-380 (1944).
24. Lojkowska E, Masclaux C, Boccara M, Robert-Baudouy J, & Hugouvieux-Cotte-Pattat N. Characterization of the pelL gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol Microbiol* 16, 1183-1195 (1995).
25. Pirt,S.J. A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi. *J Gen Microbiol* 47, 181-197 (1967).
26. Trinci,A.P.J. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *J Gen Microbiol* 57, 11-24 (1969).
27. Aeberhard,R.e.al. Determinación de las isotermas de sorción de materiales constructivos porosos e higroscópicos (madera) . Grupo de Investigación de Energías Renovables (GIDER) - Departamento de Termodinámica.Facultad de Ingeniería . 2000. Ref Type: Unpublished Work
28. Ruiz de Adana Santiago,M. Aplicacion de la Dinamica de Fluidos computacional al control de las mermas de vino en naves de crianza climatizadas. 2002. Universidad de La Rioja. Ref Type: Thesis/Dissertation
29. Badui Dergal Salvador *Química de los alimentos*.1993).
30. Beg,Q.K., Bhushan,B., Kapoor,M., & Hoondal,G.S. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 24, 396-402 (2000).
31. Schols,H.A., Posthumus,M.A., & Voragen,A.G. Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process. *Carbohydr Res* 206, 117 (1990).
32. Sakamoto,T., Yoshinaga,J., Shogaki,T., & Sakai,T. Studies on protopectinase-C mode of action: analysis of the chemical structure of the specific substrate in sugar beet protopectin and characterization of the enzyme activity. *Biosci. Biotech. Biochem* 57, 1832-1837 (1993).

A microscopic image of plant tissue, likely a leaf cross-section, showing various cellular structures. The image is overlaid with a light gray grid. The text "Capítulo 3" is centered at the top. The main title and subtitle are centered in the lower half of the image. A small black horizontal bar is located in the bottom right corner.

Capítulo 3

*R*amnosidas Alcalinas de *Acrostalagmus luteo-albus*  
y *Acremonium murorum*:

Producción, purificación y caracterización.



## Resumen

En el presente capítulo se describen la producción, purificación y caracterización parcial de las  $\alpha$ -L-ramnosidasas (Rhasas) producidas por *Acrostalagmus luteo-albus* y por *Acremonium murorum*. Para maximizar la producción de la Rhasa de *A. luteo-albus* se variaron las concentraciones de harina de soja (HS) y triptona acorde a un diseño de Doehlert. Se observó que los máximos en la producción de la enzima ocurren a concentraciones bajas de triptona y altas de HS. Por otro lado, la ramnosa resultó ser el mejor inductor para la producción de esta Rhasa, en tanto que la presencia de glucosa inhibe su producción. Esta proteína fue purificada tanto desde cultivos en medios complejos como sintéticos mediante diferentes estrategias. Si bien la presencia de pigmentos producidos durante la fermentación dificultó este proceso, fue posible obtener una fracción electroforéticamente homogénea partiendo desde medio sintético. La caracterización bioquímica de esta proteína indicó un PM de 109 KDa, un pI de 4,6, y un pH óptimo de 6,0. Los parámetros cinéticos calculados fueron:  $V_{m\acute{a}x}$  111,1 U/mg y  $K_m$  6,2 mM. La actividad fue inhibida completamente por  $Zn^{+2}$ . Esta enzima demostró capacidad para hidrolizar hesperidina, naringina y quercitrina. Asimismo, se analizaron las condiciones de crecimiento de *A. murorum* encontrando que el hongo creció adecuadamente con todas las FCE ensayadas: naringina, HS, pectina cítrica, jugo V-8 y ramnosa. No obstante, la producción de Rhasa fue notoria únicamente en el medio con ramnosa, obteniéndose ~ 150 mU/ml luego de 25 días de cultivo, con un bajo nivel de producción de  $\beta$ -glucosidasa. La síntesis de Rhasa en *A. murorum* es inhibida por glucosa. Luego, esta proteína fue purificada y caracterizada bioquímicamente, determinando que su PM es de 100 kDa, pI de 4,5. La enzima mostró un máximo de actividad a 60°C y pH 8,0. Los parámetros cinéticos calculados fueron:  $V_{m\acute{a}x}$  147,1 U/mg y  $K_m$  3,9 mM. El  $Zn^{+2}$  inhibe completamente la actividad Rhasa en coincidencia con lo encontrado para Rhasa de *A. luteo-albus*. Esta enzima mostró la capacidad de hidrolizar naringina y quercitrina, pero no hesperidina. Finalmente, se analizaron los mapas trípticos de ambas proteínas y, empleando la herramienta MASCOT4, se realizaron búsquedas bioinformáticas a fin de identificarlas. Sin embargo, en las bases de datos actuales, no fue posible identificar a ninguna proteína de manera estadísticamente significativa. Esto probablemente puede deberse a que los genomas de las especies involucradas no están aún disponibles o bien a que el número de mapas peptídicos de otras Rhasas es aun limitado como para hallar homologías.

### 3.1 Introducción

La ramnosa es un monosacárido de seis carbonos que pertenece al grupo de las metilpentosas (o bien de las desoxihexosas). En la naturaleza se encuentra fundamentalmente en la forma de L-ramnosa (6-desoxi-L-manosa) en su configuración piranosa, siendo extremadamente raro encontrar formas D. En relación al C-anomérico, la ramnosa se encuentra tanto en la forma  $\alpha$  como  $\beta$ , predominando la primera. Su nombre proviene de la planta de la cual se aisló por primera vez, la especie *Rhamnus frangula* y se halla ampliamente distribuida en la naturaleza, fundamentalmente combinada en glicósidos y en polisacáridos. En la Tabla 3.1 se indican algunos de los compuestos naturales en los que se encuentra ramnosa y el tipo de enlace de la unión glicosídica.

**Tabla 3.1:** Compuestos naturales que contienen ramnosa.

Tipo de compuesto	Glicósido o polímero	Ubicación principal	Enlaces de la L-ramnosa
	Naringina	Frutos de citrus (1,5-1,8 % del peso fresco de la cáscara de pomelo)	$\alpha$ -(1-2)
	Hesperidina	Cáscara de naranja	$\alpha$ -(1-6)
Flavonoides	Neohesperidina	Naranja amarga ( <i>Citrus aurantium</i> )	(2-O- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -D-glucosa)
	Narirutina	Frutos de citrus	$\alpha$ -(1-6)
	Nuercitrina	Frutos de citrus	Directo al aglicón
	Rutina	Alforfón, cáscaras de manzana	$\alpha$ -1,6
Heteropolímeros	Sustancias pécticas: esqueleto del RGI	Pared celular vegetal	AGA- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)-Ram- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)-AGA-Ram- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Gal
	Sustancias pécticas: cadenas laterales del RGII	Pared celular vegetal	$\alpha$ -(1-2), $\alpha$ -(1-3), $\alpha$ -(1-5) y $\beta$ -(1-5)
Saponinas (glicósidos de esteroides)	Dioscina	Plantas de la familia de las Pitas y de la familia de las Liliáceas (yuca)	$\alpha$ -(1,2) y $\alpha$ -(1,4)
Terpenos	Terpenos glicosilados	Bayas de uva	$\alpha$ -(1-6)

La enzima ramnosidasa (Rhasa) denominada  $\alpha$ -L-ramnopiranosidasa (EC 3.2.1.40) cataliza la ruptura hidrolítica de enlaces glicosídicos de la L-ramnosa (6-deoxy-L-manosa) en ramnósidos naturales o sintéticos tales como heteropolisacáridos, flavonoides y compuestos aromáticos (geraniol, nerol, etc.). Se han descrito principalmente tres tipos de Rhasas: las  $\alpha$ -L-ramnosidasas ( $\alpha$ -Rhasa) y las  $\beta$ -L-ramnosidasas ( $\beta$ -Rhasa) que catalizan la hidrólisis de residuos terminales de ramnosa no reductores de  $\alpha$ -L-ramnósidos y  $\beta$ -L-ramnósidos, respectivamente, y las endo-Rhasas que actúan clivando las uniones específicas entre residuos de ramnosa.

Las  $\alpha$ -Rhasas han sido encontradas en varias plantas y microorganismos así como en tejidos animales. Las  $\beta$ -Rhasas sólo se han descrito en *Klebsiella aerogenes*<sup>11</sup>, mientras que las endo-Rhasas parecen ser propias de los bacteriófagos<sup>12</sup>. Dentro de los microorganismos capaces de producir  $\alpha$ -Rhasas se pueden mencionar a las bacterias y hongos, pero cabe destacar que existe una diferencia entre las  $\alpha$ -Rhasas fúngicas y bacterianas. Dicha diferencia radica en la estabilidad a valores extremos de pH. Las Rhasas microbianas reportadas son generalmente de origen fúngico y poseen actividad a pHs ácidos<sup>1,2,3,4,5</sup>. Unas pocas, de origen bacteriano, poseen actividad en medio alcalino débil<sup>6,7</sup> pero son intracelulares. En la Tabla 3.2 se muestran las características de algunas  $\alpha$ -Rhasas reportadas.

Las Rhasas hidrolizan la mayoría de los enlaces presentes en los ramnósidos naturales, sin embargo no actúan sobre las uniones glicosídicas del RGI de la pectina cuyo esqueleto está formado por la repetición del disacárido (1-2)- $\alpha$ -L-Ram-(1-4)- $\alpha$ -D-AGA-(1-2). Este enlace de ramnosa es hidrolizado por dos enzimas específicas diferentes: ramnogalacturonano-hidrolasa y ramnogalacturonano-liasa. Sin embargo, la  $\alpha$ -L-ramnosa presente en las cadenas laterales del RGII sí son susceptibles a la acción de las Rhasas. La hidrólisis enzimática del enlace glicosídico es llevada a cabo mediante una catálisis ácida que requiere dos residuos críticos: un donador de protones y un nucleófilo/base, siendo estos residuos aún no identificados en las  $\alpha$ -Rhasas. Dicha hidrólisis ocurre con inversión de la configuración en el carbono 1; lo cual indica un mecanismo de desplazamiento molecular sencillo ( $SN_2$ ) y el posible empleo de grupos carboxílicos (de los ácidos aspártico o glutámico) en el sitio activo como sucede en general con las enzimas de tipo glicosidasas. Por ejemplo, los espectros parciales de  $^1H$ -NMR del curso estereoquímico de la hidrólisis de pnp-Rha catalizada por la  $\alpha$ -Rhasa de *A. aculeatus* indican que durante los primeros minutos de la hidrólisis aparece un doblete asignado como el protón anomérico de la  $\beta$ -L-ramnosa; luego de varios minutos, la mutrorotación de  $\beta$ -L-Rha inicialmente liberado lleva a la aparición de un nuevo doblete correspondiente al protón anomérico de  $\alpha$ -L-Ramnosa.

Luego de 10 min de reacción la relación de los anómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ - es de 1:10, y luego de 20 h de reacción, la relación de equilibrio mutrotacional ( $\alpha$ : $\beta$ ) observado es de 3:2. Por este motivo, se deduce que la Rhasa de *A. aculeatus* cataliza la hidrólisis con la inversión de la configuración anomérica.

**Tabla 3.2:** Propiedades generales de algunas Rhasas microbianas purificadas <sup>8</sup>

Microorganismo	Inductor	pH óptimo	Temp. óptima (°C)	PM (kDa)	pI	Localización	Referencia
<i>Absidia sp.</i>	Ginseng G. pentaphyllum	4,0	53	n.d	n.d.	Extracelular	Yu <i>et al.</i> , 2002 <sup>9</sup>
<i>Absidia sp.</i>	Ginseng	5,0	68	n.d.	n.d.	Extracelular	Yu <i>et al.</i> , 2004 <sup>9</sup>
<i>A. aculeatus</i>	Hesperidina	4,5–5	n.d.	92	6,2	Extracelular	Manzanares <i>et al.</i> , 2003 <sup>10</sup>
		4,5–5	n.d.	85	5,2-5,9	Extracelular	
<i>A. nidulans</i>	Ramnosa	4,5–6	60	102	5	Extracelular	Manzanares <i>et al.</i> , 2000 <sup>2</sup>
<i>A. niger</i>	Hesperidina	4,5	65	85	4,5–5,2	Preparación comercial	Kurosawa <i>et al.</i> , 1973 <sup>11</sup> ; Manzanares <i>et al.</i> , 1997 <sup>12</sup>
<i>A. terreus</i>	Ramnosa	4	44	96	4,6	Extracelular	Gallego <i>et al.</i> , 2001 <sup>13</sup>
<i>Penicillium sp.</i>	Naringina	3,5	57	90	n.d.	Preparación comercial	Romero <i>et al.</i> , 1985 <sup>14</sup> ; Young <i>et a.</i> , 1989 <sup>15</sup>
<i>Pichia angusta</i>	Ramnosa	6	40	90	4,9	Intracelular	Yanai and Sato, 2000 <sup>16</sup>
<i>Streptomyces avenae</i>	Almidón	n.d.	n.d.	110	n.d.	Extracelular	Hughes <i>et al.</i> , 2004 <sup>17</sup>
<i>Bacillus sp.</i>	Gelano	6,5-7	40	98	n.d.	Intracelular	Hashimoto <i>et al.</i> , 2003 <sup>18</sup>
		6,5-7	40	106	n.d.	Intracelular	
<i>Bacteroides sp.</i>		7	n.d.	120	4,2	Intracelular	Jang and Kim, 1996 <sup>19</sup>
<i>Clostridium stercorarium</i>		7,5	60	95	n.d.	Intracelular	Zverlov <i>et al.</i> , 2000 <sup>1</sup>
<i>S. paucimobilis</i>	Ramnosa	7,8	45	112	7,1	Intracelular	Miake <i>et al.</i> , 2000 <sup>6</sup>
<i>Thermomicrobia bacterium</i>		7,9	70	104	4,6	Intracelular	Birgisson <i>et al.</i> , 2005 <sup>7</sup>
		5-6,9	70	107	4,5	Intracelular	

(n.d.: no determinado)

Tal como fue detallado previamente en la Introducción, la Rhasa es utilizada en diferentes aplicaciones industriales, debido a que dependiendo del sustrato sobre el que actúe puede generar diferentes productos de interés industrial. Sin embargo, a pesar de la existencia de este interés en la aplicación industrial de esta enzima, se han llevado a cabo relativamente pocos estudios en relación a su caracterización y purificación, en comparación con otras glicosidasas.

Comercialmente, la actividad Rhasa más conocida es la denominada naringinasa, que consiste en un complejo enzimático que contiene dos tipos de actividades:  $\alpha$ -Rhasa y  $\beta$ -Gluasa. Este complejo cataliza la degradación de naringina en glucosa, ramnosa y naringenina. La presencia de la actividad Gluasa en una preparación de Rhasa no resulta conveniente en la manufactura de ramnosa a partir de naringina, debido a la formación concomitante de glucosa, que debe ser eliminada en un paso adicional. Existen diferentes alternativas para evitar dicha producción de glucosa. Una de ellas es contar con microorganismos productores de pooles enzimáticos conteniendo actividad Rhasa pero libres de Gluasa. En el caso de pooles enzimáticos conteniendo ambas actividades enzimáticas, el camino implica la separación y/o inactivación selectiva de Gluasa con mantenimiento de la actividad Rhasa. En este último caso se hace necesario optimizar las condiciones de cultivo para promover la formación de Rhasa y reprimir la de Gluasa.

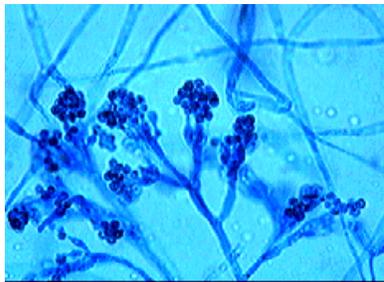
Las Rhasas actualmente disponibles en el mercado presentan actividad a pHs ácidos pero los sustratos de dichas enzimas son muy poco solubles a estos valores de pH. Por lo tanto, el uso de Rhasas activas a valores de pH alcalinos permitiría la hidrólisis de soluciones mucho más concentradas de sustratos. Tal como fue indicado en el capítulo anterior, un estudio preliminar sobre las enzimas extracelulares producidas por hongos alcalino tolerantes aislados de suelos alcalinos de los partidos de Magdalena y Punta Indio (Pcia. de Bs. As.) demostró la presencia de una cepa fúngica capaz de producir Rhasas activas en condiciones alcalinas que hidrolizan ramnósidos sintéticos y naturales a pH 9,5 cuyo potencial industrial es altamente remarcable. Por otra parte, en nuestro laboratorio se realizó un screening complementario (no incluido en este trabajo de Tesis) de otros hongos aislados del mismo hábitat, producto del cual se encontró una nueva cepa fúngica (*Acremonium murorum*) capaz de producir una actividad Rhasa alcalina<sup>20, 21</sup>.

En este capítulo se describe la producción, purificación y caracterización parcial de las Rhasas producidas por *A. luteo-albus* y por *A. murorum* con el objetivo de optimizar la cantidad de enzima producida. Luego se determinarán la capacidad de estos biocatalizadores para hidrolizar sustratos naturales en condiciones alcalinas.

### 3.1.1 *Acrostalagmus luteo-albus* y *Acremonium murorum*

*A. luteo-albus* y *A. murorum* se clasifican dentro de los Deuteromicetes u hongos imperfectos, dentro del phyla Ascomicota. Su clasificación sistemática se basa en elementos morfológicos, conidios y su formación. La mayoría de estas especies son hongos saprófitos, obtienen su alimento a partir de restos vegetales absorbiendo sustancias orgánicas e inorgánicas disueltas y liberando sustancias que pueden ser utilizadas por otros miembros del ecosistema. Estos hongos están ampliamente distribuidos en el suelo, secretan enzimas hidrolíticas que puedan degradar macromoléculas (que, de otra forma, no serían asimilables) y absorben las moléculas resultantes, más pequeñas. El micelio aparece como una masa sobre la superficie de la fuente de alimento.

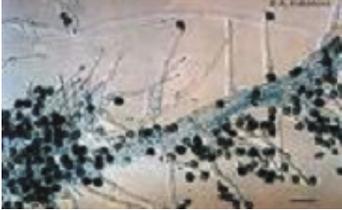
*Acrostalagmus luteo-albus* (antes *Verticillium luteo-album*) forma ameroconidios es decir, conidios unicelulares de forma elíptica o esférica. Los conidios están en hifas o conidióforos solitarios o agrupados. Son frecuentes tanto en el suelo como en restos vegetales en descomposición. El micelio fúngico se origina por la germinación de una sola espora. El crecimiento tiene la particularidad de que se produce solamente en los extremos de las hifas. Si bien los hongos son inmóviles, las esporas pueden ser llevadas a grandes distancias por agentes naturales (i.e.: el viento). El crecimiento del micelio reemplaza a la movilidad, poniendo al organismo en contacto con nuevos nutrientes y con diferentes cepas de apareamiento.



**Figura 3.1:** *Acrostalagmus luteo-albus*: la ramificación de los conidióforos aparece como un verticilo. Imagen tomada del Departamento de Botánica de la Universidad de Toronto, <http://www.botany.utoronto.ca>

*Acremonium murorum* es un hongo cosmopolita aislado de suelos y restos vegetales. Muchas especies de *Acremonium* están implicadas en infecciones, tal como el micetoma eumicótico, y en algunos casos omnicomicosis, queratitis y endocarditis<sup>22 23</sup>. El crecimiento de las colonias de *Acremonium* es lento, madurando después de una semana en una colonia de un diámetro de 1-3 cm luego de una incubación a 25°C en APD. La textura de la colonia es compacta y aterciopelada. A medida que pasa el tiempo, la superficie de la colonia puede volverse algodonosa debido al crecimiento de las hifas. Este hongo posee hifas septadas, hialinas, típicamente muy finas. Las hifas

vegetativas usualmente forman cuerdas. Desde la punta de las hifas se forman fiálides no ramificadas, solitarias y erectas. Éstas se encuentran separadas de las hifas por un septum hacia sus ápices. En los ápices de las filiades se encuentran los conidios hialinos de 2-3 x 4-8  $\mu\text{m}$ . Usualmente aparecen en clusters, y están unidos por un material gelatinoso <sup>24</sup>.



**Figura 3.2:** *A. murorum*: Sinemas con filiades largas y conidios oscuros. EL preparado fue teñido con ácido láctico. El segmento de la fotografía indica la distancia de 10  $\mu\text{m}$ . Fuente: [http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/images/plisne/mikro/Acremonium murorum](http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/images/plisne/mikro/Acremonium%20murorum)

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Reactivos químicos

*p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pnp-Glu), *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (pnp-Ram), naringina, prunina, hesperidina, quercitrina y las membranas de celulosa para diálisis (corte 12.400 Da) fueron obtenidos de Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). El Broad pl Kit (pH 3-10) y los patrones de peso molecular de proteínas (Broad range: MW 6.500 a 205.000) fueron de GE Healthcare (Wiscosin, USA). El agar papa-dextrosa (APD) y las placas de aluminio (Silica gel 60 F<sub>254</sub>) fueron de Merck & Co (New Jersey, USA). La triptona fue de Difco. La harina de soja (HS) fue provista por Biagro S.A. (Argentina) y el jugo V8® fue adquirido en un mercado local.

### 3.2.2 Microorganismos y producción de inóculos

Las cepas de *A. luteo-albus* (LPS # 748) y *A. murorum* (LPSC # 57) proporcionadas en tubos conteniendo APD por la Dra. Marta Cabello del Instituto Spegazzini, Universidad Nacional de la Plata.

Dichas cepas fueron propagadas a 30°C en tubos con medio APD y fueron mantenidas liofilizadas en ampollas estériles con una solución crioprotectora compuesta por leche descremada (Molico, 10 % p/v) e inositol trifosfato (5 % p/v) a 4°C. Cuando fue necesario, el contenido de una ampolla se resuspendió con una solución de triptona al 1 % (p/v) por re-hidratación lenta y se sembraron en tubos con medio APD recto. El cultivo, una vez esporulado, se cubrió con 1 cm de aceite mineral estéril y se conservó refrigerado (cultivo stock, CS) por un período no mayor de 2 meses.

Para la preparación del inóculo, un loop de conidios del CS se sembró en medio APD (15 ml en pico de flauta). Después de 7 días de incubación a 30°C en la oscuridad los conidios se resuspendieron con 10 ml de solución estéril de Tween 80 al 0,05% (v/v). El recuento de conidios se efectuó en cámara de Neubauer. La concentración típica en esta suspensión fue del orden de 10<sup>8</sup> conidios/ml.

### 3.2.3 Medios y condiciones de cultivo

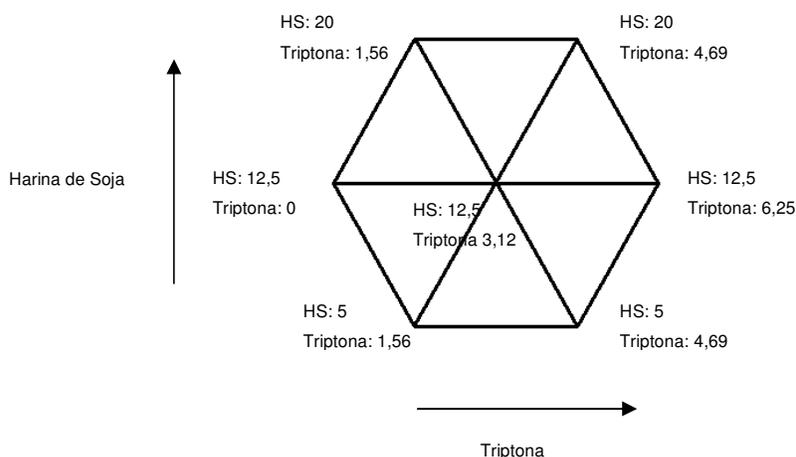
#### 3.2.3.1 Medios Semi-sintéticos

Para los cultivos de *A. luteo albus* y *A. murorum* se emplearon frascos Erlenmeyer de 1.000 ml con 300 ml de medio base conteniendo triptona como FN y diferentes FCE. La composición del medio base fue la siguiente (g/l): MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,5; KCl 0,5; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,01; ácido cítrico 0,01, naringina 0,125, solución buffer (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,9 g/l; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,0 g/l) 100 ml; solución de antibióticos (estreptomocina 25,0 g/l, cloramfenicol 10,0 g/l) 4 ml. Como FN se empleó triptona (1,25 g/l) y como FCE,

ramnosa, glucosa, pectina cítrica, rafinosa o V-8 (estos últimos dos sólo en el caso de *A. murorum*) en concentraciones del orden de 10,0 g/l. Estos medios fueron denominados Ram, Glu, Pec, Raf o V-8, respectivamente. En todos los casos, las FC, la triptona, las sales y la solución buffer fueron esterilizadas por separado en autoclave durante 15 min a 121°C y las soluciones de antibióticos y naringina fueron esterilizadas por filtración. Luego de la reconstitución, el pH de los medios varió entre 8,9 y 9,1. Los medios se inocularon con la suspensión de conidios para dar una concentración de  $10^6$  conidios/ml y luego se incubaron a 30°C en shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) a 200 rpm durante 14 días. A intervalos de 24 h se tomaron muestras líquidas de cada uno de los cultivos y se analizaron como se describe más adelante.

### 3.2.3.2 Medios complejos: Optimización de la producción de Rhasa de *A. luteo-albus*: Diseño experimental y análisis estadístico. Diseño de superficie de respuesta.

Se seleccionó un diseño propuesto por Doehlert<sup>25</sup> para la optimización del medio de cultivo en función de la producción de enzima. En el presente trabajo se estudió cómo las variables concentración de triptona y de harina de soja influían en la producción de  $\alpha$ -Rhasa de *A. luteo-albus*. Para ello, se desarrollaron cultivos de este hongo empleando el medio base adicionado con diferentes concentraciones de HS y triptona según se detalla en la Figura 3.3. En el Anexo I del presente trabajo se detallan los fundamentos de dicho diseño experimental.



**Figura 3.3:** Diseño Experimental de Doehlert para estudiar la producción enzimática de ramnosidasa. Los valores de cada componente están expresados en g/l. HS: Harina de soja.

Los medios se inocularon con la suspensión de conidios para dar una concentración de  $10^6$  conidios/ml y luego se incubaron a 30°C en shaker (New Brunswick Scientific) a 200 rpm durante 14 días. A intervalos de 24 h se tomaron muestras líquidas de cada uno de los cultivos y se analizaron como se describe más adelante.

#### 3.2.3.3. *Análisis de represión catabólica por carbono:*

A los efectos de determinar el efecto de la glucosa sobre la producción de Rhasa, se realizaron cultivos conteniendo ramnosa como FCE, tal como fue indicado en 3.2.3.1, a los que se les adicionó glucosa (10 g/l). Los cultivos fueron desarrollados en idénticas condiciones que las indicadas anteriormente, y a intervalos de 24 h se tomaron muestras líquidas de cada uno de los cultivos y se analizaron como se describe más adelante.

#### 3.2.3.4 *Procesamiento de los cultivos*

A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras de 20 ml de cultivo, las cuales fueron centrifugadas por 10 min a 5.000 g, y fueron filtradas a través de filtros de papel de celulosa (Whatman # 40) usando un soporte de polipropileno ( $\varnothing = 90$  mm). El filtrado se usó inmediatamente o bien se congeló a - 20°C. Cuando fue necesario, las muestras fueron descongeladas rápidamente en un baño de agua a 37°C con agitación a los efectos de acelerar el proceso y evitar la desnaturalización de las proteínas presentes. La solución se conservó a 5°C por un período no mayor de 3 días.

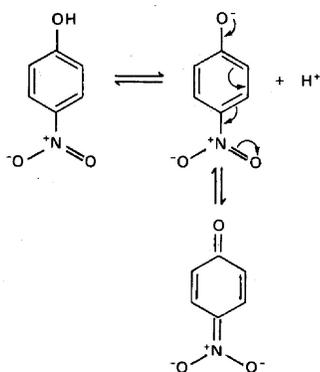
### 3.2.4 Ensayos de actividad enzimática

Para la medición de las actividades Rhasa y Gluasa se utilizaron los sustratos cromogénicos *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (pnp-Rha) y *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido, respectivamente. Estos compuestos al ser hidrolizados desarrollan en medio alcalino un color amarillo por la aparición del anión *p*-nitrofenolato (PNP)<sup>14</sup> (Figura 3.4). La forma ácida no disociada del PNP no absorbe en la región visible, sin embargo, en medio alcalino surge un máximo de absorción a 400 nm debido a la ionización del fenol. El pK del PNP es 7,15 y por lo tanto esta completamente disociado a pH > 9,5. La intensidad del color amarillo típico del PNP disociado se determina espectrofotométricamente.

La medida de actividad estándar fue realizada mediante una cinética de 30 min en espectrofotómetro (Beckman DU 640) a una longitud de onda de 405 nm a 37°C. El *p*-nitrofenolato liberado posee un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) equivalente a 18.500 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

La mezcla de reacción estándar fue la siguiente: 350  $\mu$ l Tris-HCl (20mM, pH 9,0), 100  $\mu$ l sustrato (pnp-Ram o pnp-Glu, 5 mM) y 50  $\mu$ l de muestra.

Se define la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que hidroliza un  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto en las condiciones de reacción.



**Figura 3.4:** Disociación del *p*-nitrofenol.

### 3.2.5 Purificación de las enzimas

Los filtrados de los medios complejos o sintéticos se pasaron a través de membranas de acetato de celulosa (0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro) para eliminar partículas y fueron concentrados (10  $\times$ ) por evaporación a presión reducida con un rotavapor a escala banco (Büchi; 30 vueltas/min, a 40°C). El concentrado enzimático obtenido se denominó ME. Las proteínas con actividad Rhasa se purificaron a partir del ME mediante diferentes procedimientos dependiendo en parte del medio de cultivo empleado. Para la cromatografía en columna se utilizó un equipo de FPLC (ÄKTA FPLC-U900 Chromatography System, GE Healthcare). Tanto la actividad Rhasa como Gluasa fueron medidas después de cada paso de purificación.

#### 3.2.5.1 Purificación de Rhasa de *A. luteo-albus*

La purificación de Rhasa de *A. luteo-albus* a partir del ME se inició mediante precipitación fraccionada utilizando soluciones de sulfato de amonio (25 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 % y 100 % de saturación), a 0°C. En cada etapa de precipitación, la muestra fue agitada durante 20 min en baño de agua / hielo y luego centrifugada a 12.000 g, durante 10 min.

Esta enzima fue purificada por medio de diferentes estrategias dependiendo del medio de cultivo del que provenía, ya sea complejo o semi-sintético. Estas estrategias se diferencian básicamente en el aporte de péptidos y proteínas al medio por parte de la harina de soja, lo que hace necesario su remoción previa a los distintos pasos cromatográficos.

##### 3.2.5.1.1 Purificación de Rhasa de *A. luteo-albus* a partir de cultivos en medio complejo

*Procedimiento 1:*

El precipitado obtenido con 80 % de saturación de sulfato de amonio fue disuelto en buffer Tris-HCl, 20 mM, pH 8,0 (BT) a una concentración 100 × respecto del original (46,4 mg de proteínas) y luego fue desalinizado mediante una columna cromatográfica de desalado (XK 16/100, Sepharosa G-25, con 53 ml de relleno, equilibrada con BT, caudal: 1 ml/min, volumen de fracción: 10 ml). La elución se realizó con 4 vols. de columna. Luego del desalado, la muestra obtenida fue sometida a una cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna cromatográfica XK 26/20 (Sephacryl<sup>®</sup> Q FF, 36 ml de relleno, equilibrada con BT). El lavado fue realizado con el mismo buffer (fracción no retenida) y la elución fue llevada a cabo con un gradiente 0-1 M de NaCl en BT en 10 vols. de columna a un flujo de 3 ml/min. Las fracciones (15 ml) que contenían actividad Rhasa, obtenidas con concentraciones de NaCl de entre 0,47 y 0,55 M, fueron colectadas y liofilizadas.

Las fracciones liofilizadas fueron disueltas en agua demonizada, continuando con la purificación mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna cromatográfica XK 16/100 (Sephacryl<sup>®</sup> S100 HR, 120 ml de relleno, equilibrada con buffer BT). La elución se llevó a cabo con el mismo buffer, en 5 vols. de columna a un flujo de 1,5 ml/min y las fracciones (10 ml) con actividad Rhasa y Gluasa fueron recolectadas y liofilizadas. La muestra final liofilizada se conservó en heladera.

Procedimiento 2:

El precipitado obtenido con 80 % de saturación de sulfato de amonio (8,7 mg de proteínas) fue inyectado una columna cromatográfica XK 16/100 (Sephacryl<sup>®</sup> S100 HR con 120 ml de relleno) preequilibrada con buffer MES (20 mM, pH 6,0) (BM). La actividad Rhasa eluída (fracciones de 10 ml) con el mismo buffer en 5 vols. de columna a un flujo de 1,5 ml/min fue reinyectada a una columna cromatográfica XK 26/20 Sepharose<sup>®</sup> Q (con 36 ml de relleno) preequilibrada con BM. El lavado se realizó con BM y la elución en gradiente de BM con NaCl (0-1 M) en 10 vols. de columna. Las fracciones (15 ml) que contenían actividad Rhasa fueron colectadas y liofilizadas. Todos los pasos de purificación se realizaron a temperatura ambiente.

#### 3.2.5.1.2 Purificación de Rhasa de *A. luteo-albus* a partir de cultivos en medio sintético

La purificación de Rhasa de *A. luteo-albus* obtenida a partir de medio sintético se inició mediante precipitación fraccionada del ME utilizando sulfato de amonio a 0°C. La proteína precipitada al 80 % de saturación fue resuspendida en agua bidestilada (8,5 ml; 37,4 mg de proteínas), cargada a una columna de columna cromatográfica XK 16/100 (Sephacryl<sup>®</sup> S100 HR con 120 ml de relleno, pre-equilibrada con BM) y eluída isocráticamente con BM en 10 vols. de columna a un flujo de 1,5 ml/min. Las

fracciones de 10 ml con actividad Rhasa se juntaron y la solución resultante se concentró por liofilización. El liofilizado se resuspendió con agua deionizada a un volumen final de 5 ml el cual fue inyectado en una columna XK 26/20 Sepharose® Q (con 36 ml de relleno) preequilibrada con BM y las proteínas eluidas en un gradiente de NaCl (0,3-1 M) en 10 vols. de columna a un flujo de 5 ml/min. Finalmente, las fracciones de 15 ml que contenían actividad Rhasa fueron colectadas y dializadas contra el mismo buffer durante 12 h a 5°C bajo agitación con una relación solución / buffer 1 / 100 y luego concentradas por liofilización tal como se indicó más arriba, para llegar a un volumen final de 3,7 ml.

A los efectos de evitar pérdidas ocasionadas en cromatografías de filtración en gel, y con la intención de obtener la proteína de interés completamente pura para los estudios bioquímicos, se decidió utilizar un PAGE semi preparativo a los efectos de obtener la proteína completamente pura. Por lo tanto, la proteína obtenida de la cromatografía de intercambio iónico dializada fue cargada en un PAGE nativo al 10 % de simple calle. Las proteínas fueron visualizadas por medio de tinción con Coomassie coloidal y analizadas en términos de actividad. Una banda con actividad Rhasa fue escindida del gel y eluída utilizando el protocolo propuesto por Reguera y Leschine<sup>26</sup> y utilizada para estudios posteriores de caracterización.

#### 3.2.5.2 Purificación de Rhasa de *A. murorum* a partir de cultivos en medio sintético

La purificación de Rhasa producida por *A. murorum* se comenzó filtrando 4.000 ml de cultivo en medio sintético (con ramnosa como FCE) a través de membranas de acetato de celulosa (0,45 µm de tamaño de poro) y concentrado (10 ×) por evaporación a presión reducida.

La enzima concentrada fue inyectada a una columna cromatográfica XK 16/100 (Sephacryl® S100 HR con 120 ml de relleno, flujo: 1,5 ml/min, preequilibrada con BM, volumen de fracción: 10 ml). La actividad Rhasa eluída con el mismo buffer fue separada de esta forma de los pigmentos provenientes del cultivo. La muestra con actividad Rhasa fue entonces inyectada en una columna XK 26/20 Sepharose® Q (con 36 ml de relleno, pre-equilibrada con BM, flujo: 3 ml/min, volumen de fracción: 15 ml) y las proteínas unidas fueron eluidas en un gradiente lineal de NaCl (0-1,0 M) en el mismo buffer. Las fracciones colectadas fueron inyectadas a una columna XK 26/20 Sepharose® DEAE (36 ml de relleno, preequilibrada con BM, flujo: 3 ml/min) y eluída nuevamente en gradiente lineal de NaCl (0-1,0 M) en el mismo buffer. Las fracciones que contenían actividad Rhasa fueron dializadas. Se llevó a cabo un SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes para evaluar la pureza del purificado.

### 3.2.6 Técnicas analíticas y bioquímicas

Luego de cada paso cromatográfico, las muestras fueron analizadas en términos de actividad Rhasa y Gluasa frente a los respectivos pnp-glicósidos, en términos de cantidad de proteínas por el método de Bradford<sup>27</sup> y en términos de pureza por medio de SDS-PAGE 10% teñido con Coomassie Brilliant Blue. Los análisis mediante SDS-PAGE fueron llevados a cabo en un equipo Mighty Small II Unit (Hoefer SE 260) de acuerdo a Smith<sup>28</sup>. El isoelectroenfoque (IEF) fue realizado en una unidad de electroforesis (LKB Bromma 2117 Multiphor II) a 10°C. El gel se preparó con una capa fina de poliacrilamida en el rango de pH de 3-10 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Como buffer catódico se utilizó una solución de ácido sulfúrico (0,1 M) y como buffer anódico una solución de NaOH (0,1 M).

### 3.2.7 Propiedades de la enzima

#### 3.2.7.1 Relación pH-actividad

El efecto del pH sobre la actividad Rhasa de *A. murorum* fue estudiado con naringina y con pnp-Ram como sustratos.

Con pnp-Ram como sustrato, el pH óptimo de la actividad Rhasa fue determinado empleando 0,02 µg de proteína purificada del PAGE, dializada a 5°C frente a BM (pH 6,0), midiendo la actividad enzimática frente a pnp-Ram 5 mM en BM, BT o Buffer Glicina 20 mM en el rango de pH de 4-9. A los efectos de evaluar la liberación de p-nitrofelato en distintas condiciones de pH, este ensayo se realizó midiendo actividad enzimática a tiempo final y deteniendo la reacción con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Cuando se utilizó naringina como sustrato, la actividad de Rhasa sobre este sustrato fue analizada por HPLC. La reacción se llevó a cabo incubando 900 µl del flavonoide (3,5 mM en BM; BT o Buffer Glicina 20 mM, llevados a los valores de pH a analizar, grado analítico) con 100 µl de enzima (0,04 µg) durante 3 h a 37°C. Los blancos de sustrato y de muestra fueron realizados utilizando agua bidestilada en reemplazo de sustrato o de enzima respectivamente. Se tomaron muestras de 300 µl al principio y al final del ensayo. La reacción se detuvo añadiendo a la mezcla de reacción un volumen equivalente de solución de acetonitrilo 52 % en ácido fosfórico (60 mM), luego de lo cual la mezcla resultante se filtró a través de un filtro de nylon (0,45 µm de tamaño de poro). La naringina, naringenina, y prunina fueron cuantificadas por HPLC empleando una columna Symmetry C18 (Waters, Milford, MA, USA 3,9 mm x 150 mm.) a temperatura ambiente usando como fase móvil acetonitrilo / agua (0,68 / 0,32, v/v) a un flujo de 1 ml/min y un detector de arreglo de fotodiodos (2996, Waters). Las concentraciones de naringina, prunina y naringenina, fueron identificadas y cuantificadas de acuerdo a sus respectivos patrones.

### 3.2.7.2 Estabilidad de las enzimas respecto a pH y temperatura

#### 3.2.7.2.1 Rhasa de *A. luteo-albus*

La estabilidad térmica de la Rhasa de *A. luteo-albus* se determinó incubando 350  $\mu$ l Tris-HCl (20 mM, pH 9,0) y 50  $\mu$ l de muestra purificada de PAGE, dializada a 5°C frente a BM pH 6,0 (0,02  $\mu$ g) durante 180 min en el rango de 20-70°C. Al cabo de dicho tiempo la mezcla se colocó en baño de hielo / agua. Previo a la determinación de la actividad residual se preincubó 10 min a 37°C. La actividad residual se determinó por el método estándar.

#### 3.2.7.2.2 Rhasa de *A. murorum*

Se estudiaron las condiciones óptimas de reacción, en términos de pH y temperatura, analizando el efecto de ambos factores combinados mediante superficie de respuesta a fin de reducir el número de experimentos sin desechar las interacciones entre dichos parámetros (diseño de Doehlert). Este ensayo se llevó a cabo incubando 350  $\mu$ l de BT (20 mM, pH 9,0) y 50  $\mu$ l de muestra purificada de DEAE (dializada a 5°C frente a BM pH 6,0) durante 180 min en las condiciones que se indican en la Tabla 3.3. Al cabo de dicho tiempo la mezcla se colocó en baño de agua / hielo. A los efectos de evaluar la liberación de p-nitrofelato en distintas condiciones de pH, este ensayo se realizó midiendo actividad enzimática a tiempo final y deteniendo la reacción con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

**Tabla 3.3:** Condiciones ensayadas para determinar la estabilidad de la Rhasa de *A. murorum*.

Experimento	pH	Temperatura
A	8,5	48,5
B	11,00	48,5
C	9,75	60
D	7,25	60
E	6,00	48,5
F	7,25	37
G	9,75	37

#### 3.2.7.3 Efecto de cationes

Se determinó la influencia de varios cationes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ , y  $\text{Zn}^{+2}$ ) sobre la actividad enzimática utilizando diferentes soluciones de Buffer Tris-HCl (20 mM, pH 9) a cada una de las cuales se les adicionó una de las siguientes sales:  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,1 mM,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,1 mM, KCl 20 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1

mM,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,1 mM o  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 mM. En todos los casos, se determinó la actividad enzimática por medio del procedimiento estándar.

#### 3.2.7.4 Parámetros cinéticos sobre pnp-Ram

Los parámetros cinéticos  $V_{\text{máx}}$  y  $K_m$  fueron determinados a partir de medidas de velocidad inicial empleando pnp-Rha como sustrato en un rango de concentraciones de 0,2 a 4 mM; a 37°C, al pH óptimo. El ajuste al modelo clásico de Michaelis-Menten se realizó mediante regresión no lineal empleando el programa Sigma Plot.

#### 3.2.7.5 Hidrólisis de flavonoides

La actividad de Rhasa sobre hesperidina, naringina y quercitrina fue analizada por HPLC. La reacción se llevó a cabo incubando 900  $\mu\text{l}$  de cada flavonoide (3,5 mM en BM, pH 9,5, grado analítico) con 100  $\mu\text{l}$  de enzima (0,04  $\mu\text{g}$ ) durante 3 h a 37°C. Los blancos de sustrato y de muestra fueron realizados utilizando agua bidestilada en reemplazo de sustrato o de enzima respectivamente. Se tomaron muestras de 300  $\mu\text{l}$  al principio y al final del ensayo. La reacción se detuvo añadiendo a la mezcla de reacción un volumen equivalente de solución de acetonitrilo 52 % en ácido fosfórico (60 mM), luego de lo cual la mezcla resultante se filtró a través de un filtro de nylon (0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro). La naringina, naringenina, quercitrina, hesperidina y prunina fueron cuantificadas por HPLC empleando una columna Symmetry C18 (Waters, Milford, MA, USA 3,9 mm x 150 mm.) a temperatura ambiente usando como fase móvil acetonitrilo / agua (0,68 / 0,32, v/v) a un flujo de 1 ml/min y un detector de arreglo de fotodiodos (2996, Waters). Las concentraciones de naringina, prunina, naringenina, hesperidina y quercitrina fueron identificadas y cuantificadas de acuerdo a sus respectivos patrones.

##### 3.2.7.5.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

Este análisis fue llevado a cabo en láminas de alúmina sílica gel (60 F254) sembrando 5  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción y los respectivos patrones. Se usó etil acetato / ácido fórmico / ácido acético / agua (10 / 1,1 / 1,1 / 2,7, v/v) como fase móvil. La visualización de los flavonoides fue realizada rociando la lámina con una solución de ácido fosfomolibdico (3 %), ácido sulfúrico (10 %) en etanol (96 % v/v) seguida de calentamiento a 105°C durante 5 min.

#### 3.2.7.6 Análisis de huellas peptídicas

Se efectuó una digestión triptica *in situ* de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE y coloreadas por la técnica de Coomassie Blue coloidal. Las bandas seleccionadas fueron recortadas con bisturí y almacenadas en tubos Eppendorf para su procesamiento, luego se lavaron con agua MilliQ y acetonitrilo varias veces alternativamente hasta su decoloración y finalmente fueron secadas a presión

reducida. Para bloquear y reducir el sitio activo se agregaron ditiotreitól y iodoacetamida en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . La digestión se realizó con buffer  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (100mM, pH 7,8) conteniendo tripsina durante 12 h, a 37°C, los productos finales se disolvieron en ácido trifluoroacético (0,1 %, v/v) y se analizaron por MALDI-TOF MS utilizando un Espectrómetro de masa MALDI TOF/TOF (modelo 4800 Analyzer, Applied Biosystems, Framingham, EE.UU.).

### 3.3 Resultados y discusión

#### 3.3.1 Parte A: Ramnosidasa de *A. luteo-albus*

##### 3.3.1.1 Optimización de medios complejos

En las últimas décadas los métodos estadísticos han sido aplicados a la optimización de medios para procesos biotecnológicos. Estos métodos incluyen diseños de bloques y factoriales a fin de identificar aquellos componentes que poseen algún efecto sobre la variable que se desea optimizar seguido de uno o más ensayos de superficie de respuesta para obtener las concentraciones de los componentes estudiados que magnifiquen total o localmente la variable deseada <sup>29</sup>. Los métodos de superficie de respuesta permiten estudiar el efecto de distintas variables y sus interacciones con relativamente pocos experimentos.

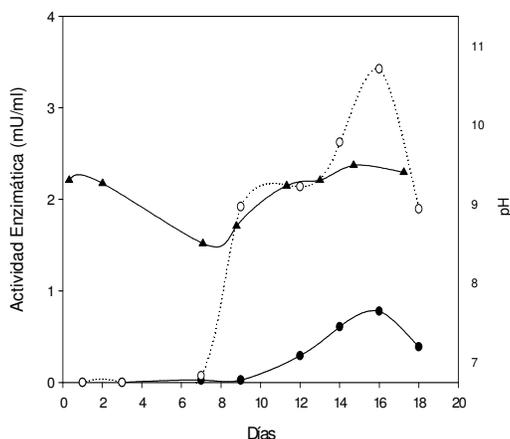
Para maximizar la expresión de la Rhasa de *A. luteo-albus* se variaron las concentraciones de HS y triptona acorde a un diseño de Doehlert. La concentración de triptona varió entre 0 y 6,25 g/l y la de HS entre 5 y 20 g/l. Teniendo en cuenta estos valores y los codificados del modelo para dos variables, las condiciones de los 7 experimentos fueron las indicadas en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4:** Medios de cultivo utilizados en el ensayo de optimización de la producción de Rhasa de *A. luteo-albus* mediante superficie de respuesta y los valores de actividad obtenidos en el día 16 de cultivo.

Cultivo	Triptona (g/l)	Harina de Soja (g/l)	Actividad $\alpha$ -Ram (mU/ml)
A	3,12	12,5	2,74-2,72-2,79
B	6,25	12,5	2,52
C	4,69	20,0	1,87
D	1,56	20,0	2,98
E	0,00	12,5	3,42
F	1,56	5,0	2,79
G	4,69	5,0	2,33

En total se realizaron 9 cultivos ya que el medio A se realizó por triplicado. Se tomaron muestras cada 48 h durante 7 días y luego cada 24 h hasta la finalización de los cultivos. A cada muestra se le determinó pH, y actividades Rhasa y Gluasa. *A. luteo-albus* creció en forma de pellet en todos los medios, utilizando los gránulos de harina de soja como soporte sólido y formando micelio difuso hacia el medio externo. El perfil

de pH fue similar en todos los cultivos (manteniéndose entre 8 y 9,5): al comienzo el pH disminuye levemente, pero luego comienza a ascender, resultando el momento de mayor producción de Rhasa coincidente con el máximo de pH alcanzado durante el cultivo (Figura 3.5). La máxima actividad Rhasa se observó entre los 12 y 16 días de cultivo, independientemente de la composición del medio; no obstante los valores de actividad mostraron diferencias significativas entre los medios (Tabla 3.4).



**Figura 3.5:** Perfil de actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa,  $\beta$ -D-glucosidasa y pH desarrollado a lo largo del cultivo E de la superficie de respuesta (0 g/l triptona, 12,5 g/l harina de soja). Actividad Rhasa: ○; Actividad Glucasa: ●; pH: ▼.

Con los valores de actividad de cada uno de los cultivos de dicho día se llevo a cabo el análisis por regresión múltiple (Tabla 3.5).

Con los coeficientes calculados se determinó la ecuación de un polinomio que describe la actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa en función de la concentración de HS y de triptona.

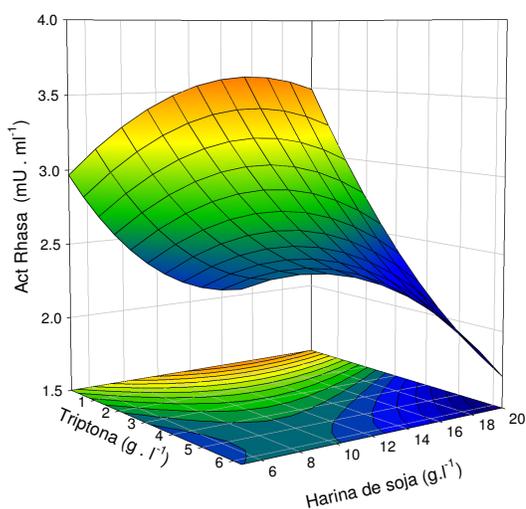
**Tabla 3.5:** Valor de los coeficientes, calculados por ANOVA, en el modelo obtenido de acuerdo al diseño de Doehlert.  $R^2 = 0.94$

	Coefficiente	P
Constante	2.75	
Lineal: Harina de soja	-0.0776	0.0719
Lineal: Triptona	-0.563	0.0015
Cuadrático: Harina de soja	-0.4157	0.0069
Harina de soja x Triptona	-0.3796	0.0131
Cuadrático: Triptona	0.2247	0.0229
Lack of fit		0.0181

El polinomio resultante es:

$$Act(U/ml) = 2.75 - 0.563 \cdot T - 0.0776 \cdot HS + 0.2247 \cdot T^2 - 0.3796 \cdot HS \cdot T - 0.4157 \cdot HS^2$$

Representando este polinomio en el universo elegido para confeccionar el hexágono se obtuvo la superficie de respuesta que se muestra en la Figura 3.6.



**Figura 3.6:** Efecto de la concentración de triptona y harina de soja sobre la producción de  $\alpha$ -L-ramnosidasa en cultivos líquidos de *A. luteo-albus*. Superficie de respuesta obtenida representando el polinomio en el universo elegido. Las condiciones evaluadas fueron acordes a un diseño de Doehlert.

En la superficie de respuesta puede observarse que la triptona ejerce un efecto inhibitorio sobre la producción de la enzima en todos los niveles de HS ensayados ya que los valores de actividad en los medios con HS y triptona fueron siempre menores comparados con la misma concentración de HS sola. Por su parte, el efecto de la HS fue dependiente de la concentración de triptona. Así, a bajas concentraciones de triptona y valores altos de HS se observan máximos en la producción de la enzima. Pero a medida que la concentración de triptona se incrementa, se observa que los máximos se corren a valores menores de HS.

La HS, un subproducto de la industria aceitera, es básicamente soja desgrasada (ya sea por simple expresión o bien por expresión seguida de extracción con solvente). Su composición, como la de todo producto natural, cambia año a año, dependiendo de la variedad de soja en cuestión y del procedimiento de extracción del aceite. De este modo, resulta difícil contar con lotes similares de HS de origen industrial a lo largo del

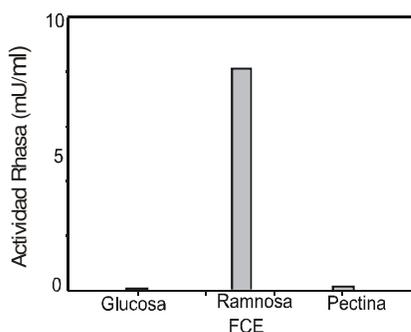
tiempo. Una composición típica media es la siguiente: proteínas (N × 6,25) 53 %, carbohidratos 30 %, grasas 1 %, fibras 3 %, cenizas 6 % y humedad 7 %. La HS generalmente se emplea para producir metabolitos reprimibles por C (o N) ya que es degradada lentamente por enzimas hidrolíticas extracelulares. De este modo, el cultivo se convierte en una especie de batch alimentado, en el cual la alimentación está regulada por la velocidad de hidrólisis de la HS. En otras palabras, la HS provee nutrientes (FCE y/o FN) en forma de polímeros que no son rápidamente metabolizables (por lo tanto no generan represión catabólica) y proporciona, además, minerales y, probablemente, otros factores que podrían ser inductores de la Rhasa de *A. luteo-albus*.

La triptona es un digerido pancreático de caseína rico en triptófano, es decir es un tipo particular de peptona. Prácticamente no contiene carbohidratos y es ampliamente utilizada como FN, fuente de aminoácidos y de ciertas vitaminas en la preparación de medios de cultivo. En general, el agregado de peptona (rango 1-5 g/l) a los medios de cultivo favorece la producción de enzimas extracelulares en hongos filamentosos (amilasa, celulasa, etc.). Sin embargo, esto no ocurrió en este caso al combinarla con HS. La represión catabólica por nitrógeno (RCN) es el mecanismo por el cual se efectúa el uso selectivo de FN. Las células fúngicas utilizan las FN fácilmente asimilables en preferencia a las más complejas. En presencia de las primeras, o cuando la suplementación de amonio externa es adecuada, la transcripción de los genes requeridos para el transporte y la degradación de las FN más complejas no ocurre. Cuando una FN asimilable es limitante o una FN compleja es la única disponible, los genes necesarios para su transporte y degradación son transcritos. Existen varios estudios que indican que además del nitrógeno, los genes de RCN son también controlados por la FC. Sin embargo, no está claramente entendido cómo el mecanismo de señales de carbono se comunica con el de RCN<sup>30</sup>. Por ejemplo, se ha reportado que la cepa de *C. albicans* GAT1 cuando es cultivada en una FN secundaria no es capaz de activar la expresión de los genes GAP1, UGA4 o DAL5 (genes regulados por nitrógeno)<sup>31</sup>. Este mecanismo podría ser una explicación a la represión de la producción de Rhasa por parte de *A. luteo-albus* cuando es cultivada en triptona en combinación con HS.

Se observó un máximo absoluto en las superficies de respuesta cuando las concentraciones de triptona y HS fueron 0 y 15 g/l, respectivamente. En estas condiciones se obtuvo una actividad enzimática incrementada en tres veces con respecto a los medios utilizados anteriormente<sup>32</sup>.

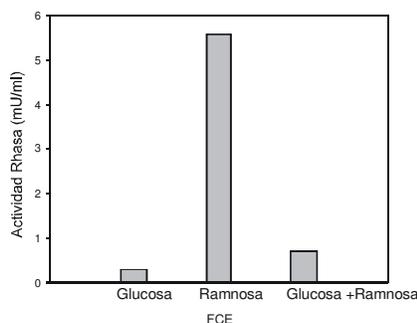
### 3.3.1.2 Optimización de medios semi- sintéticos

Se estudió la producción de Rhasa de *A. luteo-albus* en medios semi-sintéticos conteniendo distintas FCE, tales como ramnosa, pectina y glucosa. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 3.7.



**Figura 3.7:** Producción de Rhasa de *A. luteo-albus* en diferentes medios semi-sintéticos. Los medios se inocularon con  $10^6$  conidios/ml y luego se incubaron a  $30^\circ\text{C}$ , en shaker a 200 rpm, durante 14 días. A intervalos de 24 h se tomaron muestras líquidas de cada uno de los cultivos y se analizaron en términos de actividad Rhasa.

A partir de estos resultados, y considerando que la ramnosa es el mejor inductor de la producción de la Rhasa de *A. luteo-albus*, se decidió estudiar el sistema de represión catabólica por carbono. Para ello, se realizaron cultivos utilizando ramnosa, glucosa y con una mezcla de glucosa y ramnosa como FCE, tal como se detalla en Materiales y métodos, y se determinó la actividad de Rhasa producida. En la Figura 3.8 pueden observarse los resultados de estos estudios. Puede verse claramente que la presencia de glucosa inhibe la producción de Rhasa. Este comportamiento es el habitual para muchas enzimas hidrolíticas fúngicas tales como la glucosidasa de *Candida wickerhamii*, que produce altas cantidades de  $\beta$ -glucosidasa pero que es reprimida por glucosa<sup>33</sup> o como en el caso de la Rhasa de *A. nidulans*, donde la represión catabólica por sustrato está mediada por un mecanismo independiente al del gen creA<sup>34</sup>.



**Figura 3.8:** Efecto de diferentes FCE (glucosa, ramnosa y mezcla de las dos) sobre la producción de Rhasa de *A. luteo-albus*. Los cultivos fueron realizados en medio base conteniendo como FCE (10 g/l) ramnosa, glucosa y una mezcla de ambas (5 g/l de cada una). Los medios se inocularon con  $10^6$  conidios/ml y luego se incubaron a  $30^\circ\text{C}$ , en shaker a 200 rpm, durante 14 días, analizándolas en términos de producción de Rhasa.

### 3.3.1.3 Purificación de Rhasa de *A. luteo-albus* a partir de cultivos en medio complejo

La primera etapa en la purificación de una proteína a partir de un medio de cultivo generalmente involucra una etapa de concentración para eliminar agua y disminuir el volumen operativo. Esta operación también puede, según la técnica empleada, eliminar contaminantes del cultivo, es decir purificar parcialmente la proteína de interés. Los sobrenadantes de cultivos fueron concentrados inicialmente por evaporación a presión reducida. La solución enzimática que se obtuvo luego de la concentración por rotavapor de los medios de cultivo resultó ser intensamente coloreada debido a la presencia de pigmentos de color oscuro producidos por el hongo. Por lo tanto, en el diseño de una estrategia para la purificación de la Rhasa se buscaron dos objetivos principales: por un lado, eliminar los pigmentos y por otro separar la actividad Gluasa, asumiendo para lograr este último objetivo que las actividades Rhasa y Gluasa son llevadas a cabo por enzimas diferentes. A partir del concentrado por rotavapor se realizó la precipitación con sulfato de amonio recuperándose la actividad Rhasa entre el 80 y el 90 % de saturación, lo cual sugiere que la hidrofobicidad de la enzima es baja. Esta precipitación permitió concentrar la solución de proteína para luego desalinizarla en una columna G-25 equilibrada con el mismo buffer usado en la siguiente columna de intercambio aniónico (Sephacrose Q). El pasaje por G-25 no eliminó satisfactoriamente los pigmentos, los cuales se adsorbieron luego a la columna de intercambio aniónico a pH 8,0. El cromatograma obtenido en esta cromatografía fue de muy baja resolución a juzgar por los picos anchos de proteína que eluyeron y porque las actividades Rhasa y Gluasa no se separaron. La adsorción de los pigmentos podría explicar en parte la baja efectividad de la columna para separar proteínas (Dr. Osvaldo Cascone, comunicación personal). El paso final de exclusión molecular no produjo ningún resultado importante en cuanto a la purificación de la actividad Rhasa, pero se observó que los pigmentos se separaban de la actividad enzimática. Este resultado sugirió que esta columna podría ser útil para una separación inicial de los pigmentos. Un resumen de los pasos seguidos en esta primera estrategia de purificación se muestra en la Tabla 3.6. A partir de estos resultados se decidió desarrollar otra estrategia de purificación.

**Tabla 3.6:** Purificación enzimática de Rhasa de *A. luteo-albus* desde medio complejo.

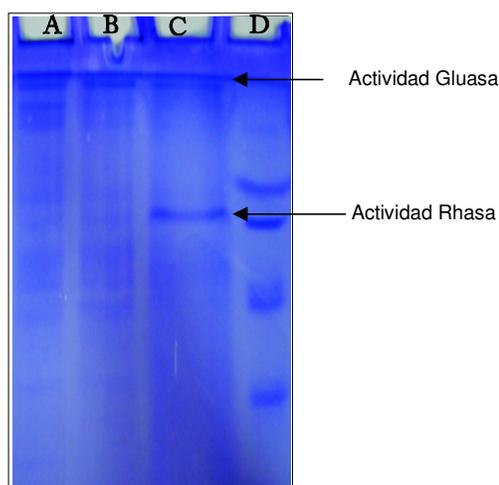
Etapa	Actividad Rhasa total (mU)	Proteína total (mg)	Actividad específica (mU/mg)	Rendimiento (%)
Cultivo concentrado	1318,03	46,4	28,41	100,0
Desalado	769,2	17,7	43,46	58,4
Intercambio iónico	723,61	16,5	43,86	54,9
Exclusión molecular	352,84	5,7	61,90	26,8

La nueva estrategia de purificación se planteó teniendo en cuenta la necesidad de eliminar los pigmentos previamente a las etapas de la cromatografía más resolutivas como las de intercambio iónico. Buena parte de los pigmentos fueron separados a partir de una precipitación secuencial con sulfato de amonio. Esta precipitación comenzó llevando la ME al 40% de saturación de sulfato de amonio. El sobrenadante obtenido fue sometido a una segunda precipitación al 80 % de saturación, recuperando la enzima precipitada. Esta enzima se inyectó a una columna de exclusión molecular Sephacryl S100 (que en el ensayo anterior dio un buen resultado en cuanto a la separación de pigmentos, aunque al final del proceso). El empleo de esta columna al inicio de la purificación permitió efectivamente separar los pigmentos restantes de la actividad Rhasa lo cual es atribuible a su rango más estrecho de separación por tamaño comparada con la G-25. La eliminación de estos pigmentos fue determinante en el proceso de purificación debido a que estos son adsorbidos inespecíficamente a los rellenos cromatográficos, de manera que compiten con la enzima en el pegado a los centros reactivos de la matriz de la columna. Esto puede deberse a la presencia en su estructura de probables grupos amino protonables originados a partir de las proteínas implicadas en la formación de pigmentos durante el cultivo. Sin embargo no pueden excluirse otro tipo de interacciones presentes como las de hidrógeno y las de Van der Waals <sup>35</sup>. Como paso siguiente, la solución despigmentada fue sometida a una cromatografía en columna de intercambio aniónico, en este caso se empleó Sepharose Q FF, observándose que la actividad Rhasa y

Glucosa eluyeron simultáneamente durante el gradiente en la región de 47 % del gradiente de NaCl. Las fracciones recolectadas, no obstante, mostraron un incremento importante de la actividad específica de Rhasa tal como se observa en la Figura 3.9. Finalmente, las fracciones recolectadas con actividad Rhasa fueron dializadas y conservadas para su análisis. La tabla 3.7 corresponde a un resumen de estos resultados.

**Tabla 3.7:** Segunda estrategia de purificación de la Rhasa de *A. luteo-albus* desde medio complejo

Etapa	Actividad Rhasa total (mU)	Proteína total (mg)	Actividad específica (mU/mg)	Rendimiento (%)
Cultivo concentrado	1263,6	146,2	8,45	100,0
Precipitación por sulfato de amonio	1216,9	15,1	80,37	96,3
Exclusión molecular	612,36	8,7	70,38	48,46
Intercambio iónico y desalado	252,7	1,64	154,08	20,0



**Figura 3.9:** PAGE nativo de diferentes etapas de la purificación (Procedimiento 2) de Rhasa de *A. luteo-albus* desde cultivo en medio complejo. Calle A: Muestra después de precipitación con

sulfato de amonio. Calle B: Después de Filtración en Gel; Calle C: Después de intercambio iónico y desalado. Calle D: Marcador de Bajo Peso Molecular. Las bandas correspondientes Gluasa y Rhasa fueron identificadas por determinación de sus respectivas actividades enzimáticas frente a sustratos cromogénicos (pnp-Glu y pnp-Rha, respectivamente) a partir de bandas escindidas del gel.

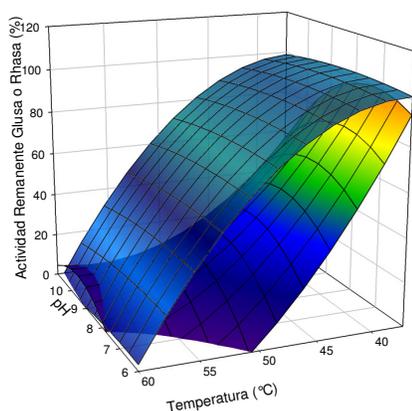
#### 3.3.1.3.1 Inactivación selectiva de la $\beta$ -glucosidasa

Como se mencionara anteriormente, para estudiar la capacidad de hidrólisis de sustratos naturales de la Rhasa es necesario separarla (si es posible) de la Gluasa ya que ambas enzimas pueden actuar sobre sustratos similares con sus respectivas especificidades de enlace. Debido a que no fue posible separar estas actividades cromatográficamente desde cultivos en medios complejos, se manejó como hipótesis de trabajo que ambas enzimas podrían tener una diferente estabilidad y, por lo tanto, podrían encontrarse condiciones de incubación en las cuales la Rhasa fuera estable y la Gluasa no lo fuera. Se evaluaron dos variables: pH y temperatura; para lo cual se realizó un ensayo estadístico de superficie de respuesta para determinar el efecto combinado de ambas variables en la estabilidad de las dos enzimas. El pH y la temperatura se variaron entre 6,0 y 11,0 y 37°C y 60°C, respectivamente. El ensayo se realizó con un sobrenadante del cultivo con HS como FCE, parcialmente purificado equivalente al sembrado en la calle C de la Figura 3.9. Cabe destacar que los resultados de los estudios de estabilidad en extractos crudos deben evaluarse cuidadosamente ya que la presencia de proteasas puede complicar el análisis de los resultados. La estabilidad debe ser función únicamente del pH y la T. Si hubiera actividad proteolítica, ésta podría actuar sobre la enzima e inactivarla y el grado de esta inactivación también depende de la T y el pH del medio. Los valores de las variables que se usaron para generar la superficie de respuesta y los resultados obtenidos en las actividades residuales de Rhasa y Gluasa del extracto parcialmente purificado luego de la incubación se presentan en la Tabla 3.8.

**Tabla 3.8:** Actividad  $\beta$ -D-glucosidasa y  $\alpha$ -L-ramnosidasa remanente luego de 3 h de incubación a las condiciones indicadas.

Experimento	pH	Temperatura (°C)	Actividad residual de $\beta$ -D-glucosidasa (%)	Actividad residual de $\alpha$ -L-ramnosidasa (%)
A	8,5	48,5	0,36	74,9
B	11,00	48,5	20,66	71,08
C	9,75	60	0	0
D	7,25	60	3,93	2,90
E	6,00	48,5	0	77,4
F	7,25	37	100	100
G	9,75	37	68,41	100

En base a los resultados encontrados, se obtuvo una superficie de respuesta en la que puede verse que la estabilidad de la enzima disminuye al aumentar la temperatura y disminuir el pH. La superficie resultante puede verse en la Figura 3.10.



**Figura 3.10:** Efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad enzimática de  $\alpha$ -L-ramnosidasa (azul) y de  $\beta$ -glucosidasa (colores varios) de *A. luteo-albus* analizado a partir de un diseño estadístico.

A partir de esta experiencia, se determinó que la actividad Gluasa es más lábil que la Rhasa. Este resultado es importante debido a que demuestra que existe una zona en la cual la Rhasa es relativamente estable mientras que la Gluasa se inactiva completamente. Específicamente, luego de ser incubada por 3 h a 48°C y pH 6,0, la

Gluasa pierde completamente su actividad mientras que se mantiene el 77 % de la actividad Rhasa. A partir de la Figura 3.10, resulta claro que en cualquier condición de incubación, la actividad Gluasa decae en mayor grado que la Rhasa.

Aunque el proceso cromatográfico no permitió la separación de las dos actividades a partir del extracto de cultivo en medio conteniendo HS como FCE, la inactivación por calor a pH 6,0 permite obtener una fracción que sólo contiene actividad Rhasa que puede ser utilizada para experimentos de caracterización posteriores y para evaluar su actividad frente a naringina y otros sustratos naturales sin la interferencia de Gluasa. La ausencia de actividad Gluasa también fue luego confirmada mediante análisis por HPLC de los productos de reacción obtenidos a partir de la hidrólisis de sustratos naturales.

#### *3.3.1.4 Purificación de Rhasa de A. luteo-albus a partir de cultivos en medio sintético*

Los resultados anteriores demostraron que es factible separar los pigmentos de las actividades enzimáticas, pero también sugieren que las proteínas con actividad Rhasa y Gluasa tienen propiedades muy parecidas, lo cual dificulta su separación. Por otra parte, es de esperar que la presencia de proteínas, péptidos y otras moléculas provenientes del medio de cultivo complejo constituyan un serio problema a la hora de purificar una enzima cuya concentración en el medio es muy baja. Por esta razón se decidió emprender un proceso de purificación a partir de un medio semi-sintético como fue el empleado para la inducción de la enzima con ramnosa.

La Rhasa fue purificada hasta aparente homogeneidad de un filtrado de cultivo de *A. luteo-albus* crecido en ramnosa como única FCE utilizando cromatografías de filtración en gel e intercambio iónico y electroforesis preparativa. Un resumen de dicho proceso se presenta en la Tabla 3.9.

De la cromatografía por filtración en gel fue posible obtener una fracción libre de pigmentos generados durante el cultivo. La mayor parte de las proteínas contaminantes no se unieron a la columna DEAE Sepharose FF y la actividad Rhasa fue eluída en un pico ancho entre 0,37-0,40 M NaCl. En el siguiente paso de purificación, en columna Q-Sepharose FF, la actividad Rhasa fue eluída como un pico único a 0,42-0,45 M NaCl, resultando en un nivel de recuperación del 9 % de la actividad original y un aumento en la actividad específica de 14 veces. En ambos casos, las fracciones recolectadas mostraron actividad Gluasa. Por este motivo se recurrió a la electroforesis preparativa. Esta última etapa de purificación permitió obtener una muestra con una actividad específica de 496,8 mU/mg. La recuperación final respecto de la original fue de 4,5 %. Esta muestra que resultó ser homogénea

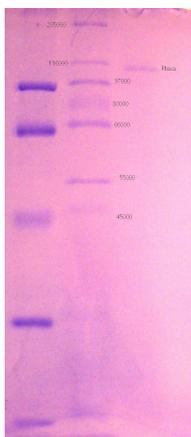
según el análisis por SDS PAGE e IEF, fue utilizada para la caracterización bioquímica y cinética.

**Tabla 3.9:** Resumen de purificación de la Rhasa de *A. luteo-albus* desde medio semi-sintético.

Muestra	Proteína total (mg)	Actividad total (mU)	Actividad específica (mU/mg)	Recuperación (%)
Extracto concentrado	38,7	1421	36,7	100
Precipitación con sulfato de amonio	37,4	1331	35,5	94
Filtración en gel (Sephacryl S-100)	9,6	758	79,2	53
Intercambio iónico (DEAE Sepharose)	1,2	418	363,9	29
Intercambio iónico (Q Sepharose)	0,3	128	496,8	9
Electroforesis preparativa	0,12	63	526,5	4,5

### 3.3.1.7 Caracterización bioquímica de Rhasa de *A. luteo-albus*

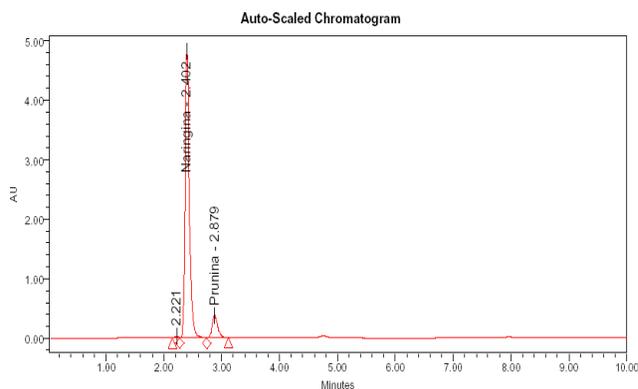
El peso molecular estimado por SDS-PAGE fue  $109 \pm 3,1$  kDa (Figura 3.11). Valores entre 90 a 96 kDa han sido descriptos para Rhasas de *Clostridium stercorarium*<sup>1</sup> y de *A. terreus*<sup>13</sup> y también para otras dos Rhasas de *A. niger*<sup>36,37</sup>, mientras que valores de 70 y 72 kDa fueron reportados para las dos Rhasas N-glicosiladas de *A. aculeatus*<sup>2</sup> y de 75 kDa para otra Rhasa de *A. niger*<sup>12</sup>. Por su parte, el IEF analítico mostró que la Rhasa presenta un valor de pI de  $4,6 \pm 0,06$ ; dentro del rango de pI de 4,5 - 5,2 descripto para algunas Rhasas de *Aspergillus*<sup>38 12 13</sup>.



**Figura 3.11:** Análisis por SDS PAGE de Rhasa de *A. luteo-albus*. Calle 1: Marcador de bajo peso molecular; Calle 2: Marcador de alto peso molecular; Calle 3: Rhasa de *A. luteo-albus*. Tinción del gel con Coomassie coloidal.

### 3.3.1.5 Caracterización del efecto del pH sobre la actividad Rhasa de *A. luteo-albus*

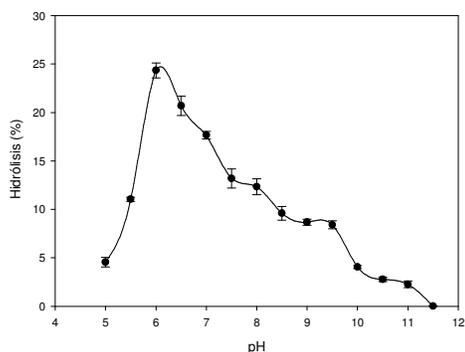
Se determinó el efecto del pH en la hidrólisis de naringina. Para ello se incubó la enzima purificada (sin actividad Gluasa) con un sustrato natural, naringina, en una concentración 3,5 mM en un buffer compuesto por Mes 20 mM, Tris 20 mM y Glicina 20 mM, durante 3 h a 37°C a diferentes valores de pH en un rango entre pH 5,5 y 11,5. No se logró detectar la ramnosa por HPLC debido a que en la detección mediante Índice de Refracción el pico del azúcar se solapa con el de la proteína. Por esta causa se determinó la hidrólisis cuantificando naringina, prunina y naringenina mediante HPLC usando una columna C18 según lo indicado en Materiales y métodos. Los tiempos de retención de los flavonoides son de 2,40 min para la naringina, 2,88 min para la prunina y 7,86 min para naringenina. No se encontró naringenina en las muestras analizadas, lo que confirma la ausencia de actividad Gluasa. En la Figura 3.12 se muestra un cromatograma típico luego de la acción de la Rhasa de *A. luteo-albus*.



**Figura 3.12:** Cromatograma obtenido de la mezcla de reacción de la hidrólisis de naringina. El HPLC se realizó empleando una columna Symmetry C18 (Waters, 3,9 mm x 150 mm) a temperatura ambiente usando como fase móvil acetonitrilo / agua (0,68 / 0,32, v/v) a un flujo de 1 ml/min y un detector de arreglo de fotodiodos (2996, Waters).

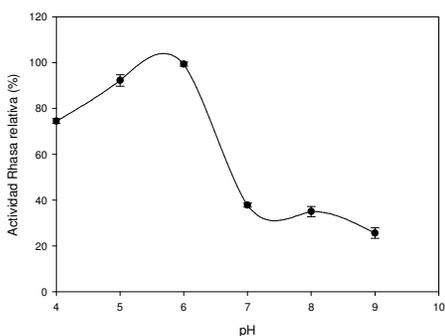
Los porcentajes de hidrólisis encontrados se presentan en la Figura 3.13. Contrariamente a lo esperado, el máximo de actividad se encuentra a pH ligeramente

ácido. Este resultado no es favorable ya que la naringina sólo es soluble a pH mayor a 9 por lo cual una de las ventajas es tener una enzima activa a pH alto. No obstante a pH 9,5 Rhasa de *A. luteo-albus* todavía conserva el 37 % de su actividad por lo que es aceptable para ser utilizada en condiciones donde la solubilidad del sustrato es buena.



**Figura 3.13:** Efecto del pH en la actividad Rhasa de *A. luteo-albus* frente al sustrato naringina, determinado por HPLC.

Cuando el efecto del pH se estudió con el sustrato *pnp*-Ram, el perfil fue similar. En este caso, el óptimo fue alrededor de 6,0 con un 25 % de actividad a pH 9. Este valor de pH óptimo es semejante a lo que ocurre con otras Rhasas de *Aspergillus* descriptas<sup>2, 12, 36, 38;13</sup>.

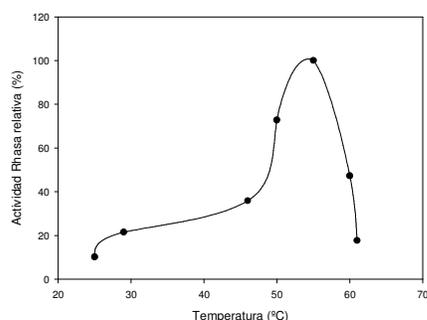


**Figura 3.14** pH óptimo de la actividad Rhasa de *A. luteo-albus* frente a *pnp*- $\alpha$ -L-ramnopiranosido.

Es importante destacar la estabilidad del sustrato en las condiciones de reacción, debido a que la hidrólisis química en condiciones de pH extremos podría dificultar la evaluación de resultados. En este estudio, este efecto fue subsanado con el empleo de blancos de sustrato y de enzima correspondientes en cada análisis. Del mismo modo, se realizaron ensayos de estabilidad durante 24 h incubando los sustratos en las condiciones de reacción (conteniendo Rhasa inactivada) y analizándolos por HPLC y espectrofotométricamente a  $A_{405}$ , (naringina y *pnp*-Ram, respectivamente). A partir de estos ensayos se determinó que los sustratos son estables en las condiciones de reacción, por lo que los resultados obtenidos pueden ser tomados en

cuenta. Del mismo modo, y a los efectos de evaluar la liberación de p-nitrofelato en distintas condiciones de pH, este ensayo se realizó midiendo actividad enzimática a tiempo final y deteniendo la reacción con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

Por último, la temperatura óptima de la Rhasa purificada a pH 9,0 fue de 55°C frente a pnp-Ram (Figura 3.15). La mayoría de las Rhasas caracterizadas son óptimamente activas a temperaturas entre 40°C y 80°C<sup>37 38 13</sup>.



**Figura 3.15:** Temperatura óptima de la Rhasa de *A. luteo-albus* frente a pnp-Ram. Se determinó la actividad enzimática en las condiciones estándar.

### 3.3.1.8 Parámetros cinéticos sobre pnp-Rha

Los parámetros cinéticos de Rhasa sobre pnp-Ram fueron determinados en Tris-HCl (20 mM, pH 9,5) a 37°C. Los parámetros cinéticos calculados fueron:  $V_{\text{máx}}$  111,1 U/mg y  $K_m$  6,2 mM. Valores de  $K_m$  menores desde 1,52 a 2,9 mM han sido descriptos para *Penicillium sp.*<sup>14</sup> y algunos *Aspergillus*<sup>11, 39 2, 12</sup>. Al igual que otras Rhasas, la ramnosa es un inhibidor competitivo de la Rhasa de *A. luteo-albus*. Se determinó el valor de  $K_i$  para ramnosa, resultando en 4,7 mM.

### 3.3.1.9 Efecto de varios cationes sobre la actividad Rhasa

Se determinó el efecto de varios cationes sobre la actividad Rhasa de *A. luteo-albus*. En las concentraciones ensayadas, la actividad fue inhibida completamente por  $\text{Zn}^{+2}$ , mientras que  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{K}^{+1}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  no mostraron efecto alguno sobre dicha actividad.

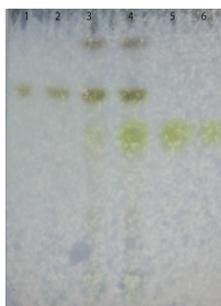
### 3.3.1.10 Especificidad de sustrato sobre ramnoglucósidos naturales

La enzima demostró ser activa sobre naringina, donde el residuo de L-ramnosa está unido en forma  $\alpha$ -1,2 al  $\beta$ -D-glucósido; sobre hesperidina, con uniones  $\alpha$ -1,6 al  $\beta$ -D-glucósido y también sobre quercitrina, donde la ramnosa se encuentra unida directamente al C-3 del núcleo del flavonol (aglicona, el flavonol quercetina) (Figuras 3.16-3.18). Bajo las condiciones de ensayo, la enzima demostró ser más activa sobre quercitrina respecto de los otros sustratos. En la CCF se observa que si bien este sustrato no es homogéneo, ya que antes de incubarlo con la enzima presenta una

banda principal y dos de menor intensidad con Rf menor, no presenta ramnosa libre. Luego de incubar el sustrato con Rhasa, el cromatograma muestra claramente una disminución de intensidad de la banda mayor, aparece claramente la ramnosa y una banda difusa con un Rf menor que la ramnosa atribuible al aglicón quercetina. Se han descrito algunas Rhasas de *Aspergillus* que exhiben diferentes especificidades de sustratos, pero sólo una de *A. niger*<sup>12</sup> y las dos de *A. aculeatus*<sup>2</sup> fueron reportadas como activas sobre estos tres ramnoglucósidos.



**Figura. 3.16:** Análisis por CCF de productos de hidrólisis de Hesperidina. Calle 1: Patrón de Ramnosa (11,25 µg); Calle 2: Hesperidina incubada con Rhasa + ramnosa (11,25 µg) como patrón interno; Calle 3: Hesperidina incubada con Rhasa; Calle 4: Patrón de Hesperidina (10,5 µg) + enzima tiempo de reacción = 0 + ramnosa (11,25 µg) como patrón interno; Calle 5: Patrón de Hesperidina (10,5 µg).



**Figura. 3.17:** Análisis por CCF de productos de hidrólisis de naringina. Calle 1: Patrón de naringina (10,5 µg); Calle 2: Patrón de naringina (10,5 µg) + enzima (a tiempo de reacción = 0); Calle 3: naringina incubada con Rhasa; Calle 4: naringina incubada con Rhasa + ramnosa (11,25 µg) como patrón interno; Calle 5: Patrón de ramnosa (11,25 µg); Calle 6: Patrón de ramnosa (5,62 µg).



**Figura 3.18:** Análisis en CCF de productos de hidrólisis de quercitrina. Calle 1: quercitrina incubada con Rhasa; Calle 2: quercitrina incubada con Rhasa + ramnosa (5,62 µg) como patrón interno; Calle 3: Patrón de quercitrina (10,5 µg); Calle 4: Patrón de quercitrina (10,5 µg) + ramnosa (5,62 µg) como patrón interno; Calle 5: Patrón de quercitrina (10,5 µg); Calle 6: Patrón de ramnosa (5,62 µg). Se observa que el sustrato no es una sustancia homogénea.

Finalmente, el grado de hidrólisis calculado para las condiciones de reacción a partir de los análisis por HPLC fueron los que se detallan en la Tabla 3.10.

**Tabla 3.10:** Resultado cuantitativo de la hidrólisis de ramnósidos naturales determinado por HPLC.

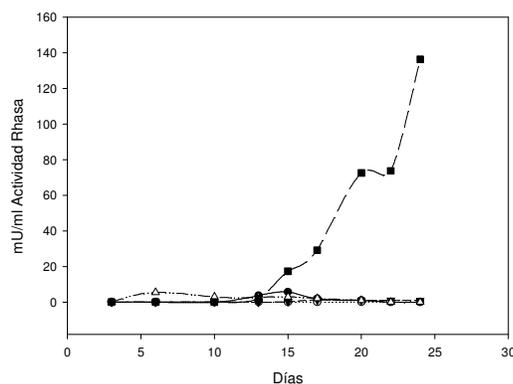
Sustrato	Hidrólisis (%)
Hesperidina	9,44
Naringina	29,60
Quercitrina	90,50

Los resultados obtenidos son promisorios en relación a la utilización de la Rhasa de *A. luteo-albus* en la hidrólisis de ramnósidos en medio alcalino. Una aplicación potencial de las propiedades de esta enzima es la obtención de ramnosa a partir de fuentes naturales abundantes como son los sustratos aquí estudiados.

### 3.3.2 Parte B: Ramnosidasa de *A. murorum*

#### 3.3.2.1 Optimización de la producción en diferentes medios

Los cultivos con *A. murorum* mostraron que el hongo creció adecuadamente con todas las FCE ensayadas: naringina, HS, pectina cítrica, V-8 y ramnosa. No obstante, la producción de Rhasa fue notoria únicamente en el medio con ramnosa, obteniéndose ~ 150 mU/ml luego de 25 días de cultivo, con un bajo nivel de producción de Gluasa (Figura 3.19). Se han reportado resultados similares para la producción de una Rhasa de *Aspergillus nidulans*<sup>2</sup>. Ensayos posteriores empleando mezclas de glucosa/ramnosa mostraron, al igual que lo sucedido con *A. luteo-albus*, que la síntesis de Rhasa en *A. murorum* es reprimida por glucosa, es decir en este hongo opera un sistema de represión catabólica similar. La purificación de la enzima se realizó a partir del sobrenadante de los cultivos conteniendo ramnosa debido a que, por un lado, en el mismo se alcanzaron las mayores actividades enzimáticas y, por otro, este es un medio semi-sintético y no presenta sustancias que dificulten dicho proceso tal como en los casos de los medios V-8 y HS.



**Figura 3.19:** Perfiles de producción de ramnosidasa de *A. murorum* en diferentes medios. Las FCE empleadas fueron: Naringina (●); Harina de soja (○); Pectina (▼); Jugo V8 (△); Ramnosa (■).

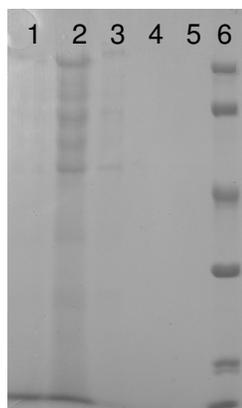
#### 3.3.2.2 Purificación de la proteína con actividad ramnosidasa

Se utilizaron los extractos de cultivos en medio con ramnosa como FCE como material de partida. La muestra a purificar fue concentrada por evaporación a presión reducida y posterior liofilización del concentrado. Debido a que la muestra presenta gran cantidad de pigmentos, la misma fue sometida a una cromatografía de permeación en gel (Sephacryl S-100) y las fracciones con actividad Rhasa fueron colectadas y concentradas por liofilización. La exclusión molecular simplifica el proceso de purificación, ya que como se ha indicado anteriormente, los pigmentos suelen unirse a

columnas iónicas, haciendo que la actividad de interés eluya como un pico ancho y con baja resolución. El proceso de purificación fue puesto a punto por medio del empleo de distintas matrices cromatográficas, utilizando un kit de columnas de pequeña escala (1 ml Hitrap™ Selection Kit, GE Biosciences). Las matrices empleadas para este estudio fueron: Sepharose Q (1 ml/min.; buffer MES 20 mM, pH 6,0, elusión con un gradiente de 0-1 M NaCl); Sepharose DEAE celulosa, y Sepharose SP mismas condiciones de corrida, Octyl Sepharose, Butyl Sepharose y Fenil Sepharose (1 ml/min, buffer MES 20 mM, pH 6,0, 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). En estas condiciones la Rhasa de por *A. murorum* sólo fue retenida por las columnas de intercambio aniónico. La enzima no se adsorbió a columnas hidrofóbicas como Octyl Sepharose, Butyl Sepharose y Fenil Sepharose. Las condiciones óptimas de purificación halladas fueron empleadas para purificar un sobrenadante del cultivo de este microorganismo a mayor escala. De la columna Sepharosa Q, la actividad Rhasa eluyó a 0,5 M NaCl. El siguiente paso de purificación por medio de DEAE Sepharose resultó en una recuperación del 33,8 % de la actividad Rhasa. El SDS-PAGE de la Figura 3.20 y la Tabla 3.11 muestran los resultados de cada paso de purificación.

**Tabla 3.11:** Purificación enzimática de Rhasa de *A. murorum* desde medio sintético

Etapa	Proteína total (mg)	Actividad total (mU)	Actividad específica (mU/mg)	Recuperación (%)
Sobrenadante concentrado	4,71	359,4	76,2	100
Filtración en gel (Sephacryl S-100)	1,64	336,2	205,0	93,5
Intercambio iónico (Q Sepharose)	0,58	330,5	566,5	92
Intercambio iónico (DEAE Sepharose)	0,02	121,82	6345,00	33,89

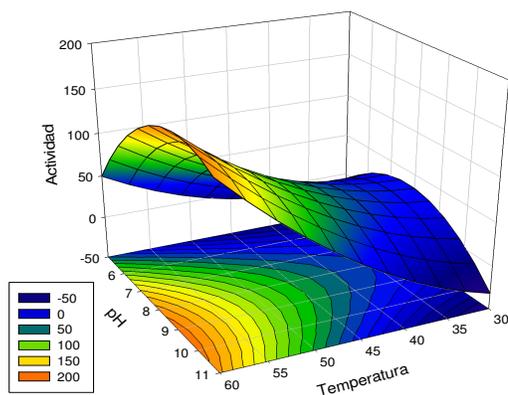


**Figura 3.20:** SDS-PAGE de las etapas de purificación de la Ramnosidasa de *A. murorum*, revelado con Coomassie Blue. Calle 1: Sobrenadante de cultivo crudo concentrado. Calle 2: Después de S-100. Calle 3: Después de Sepharosa Q. Calle 4: Después de DEAE Sepharose; Calle 6: LMWM.

El PM de la Rhasa de *A. murorum* es  $100 \pm 1,2$  kDa, a juzgar por los resultados de SDS-PAGE. La Rhasa de *A. murorum* presenta un valor de pI de  $4,5 \pm 0,01$ , un poco más ácido que el rango de pI de 4,5 - 5,2 descrito para algunas Rhasas de *Aspergillus* y que la de *A. luteo-albus*<sup>12, 13, 40</sup>.

### 3.3.2.3 Efecto del pH y la temperatura en la actividad Rhasa de *A. murorum*

Se estudiaron las condiciones óptimas de reacción, en términos de pH y temperatura, sobre el sustrato pnp-Ram, analizando el efecto de ambos factores combinados mediante superficie de respuesta a fin de reducir el número de experimentos sin desechar las interacciones entre dichos parámetros (diseño de Doehlert). Se encontró un máximo de actividad a 60°C y pH 8,0 (Figura 3.21).



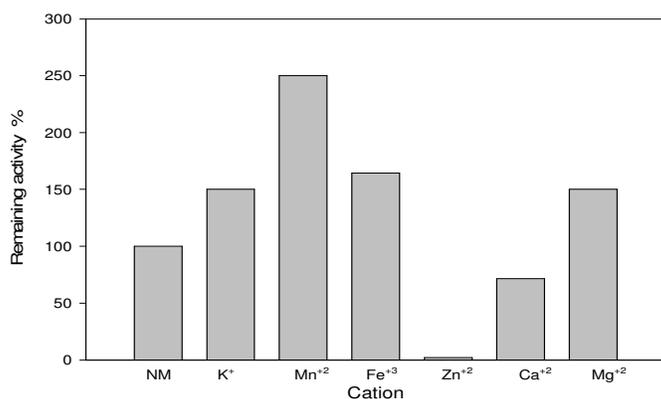
**Figura 3.21:** Superficie de respuesta obtenida a partir del diseño de Doehlert para el estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática Rhasa de *A. murorum*.

### 3.3.2.5 Parámetros cinéticos de Rhasa utilizando pnp-Ram como sustrato

Los parámetros cinéticos de la Rhasa sobre pnp-Ram fueron determinados en buffer Tris-HCl (20 mM, pH 9,5) a 37°C. Los parámetros cinéticos calculados fueron:  $V_{m\acute{a}x}$  147,1 U/mg y  $K_m$  3,9 mM. Se han descrito valores de  $K_m$  menores, desde 1,52 a 2,9 mM, para *Penicillium sp.*<sup>14</sup> y algunos *Aspergillus*<sup>11;39,2</sup>. La ramnosa resultó ser un poderoso inhibidor competitivo de la Rhasa de *A. murorum*, con una constante de inhibición de 0,10 mM. Este azúcar ha sido reportado como inhibidor competitivo de Rhasas de *Penicillium sp.* y de *Aspergillus*, con valores mayores de  $K_i$  que oscilan entre 1,2 a 4,2 mM.<sup>14, 2</sup>

### 3.3.2.6 Efecto de varios cationes sobre la actividad ramnosidasa

El efecto de varios iones metálicos sobre la actividad Rhasa fue estudiado. Como puede observarse en la Figura 3.22, el  $Mn^{+2}$  (positivo) y el  $Zn^{+2}$  (negativo) ejercen los efectos más notorios sobre la actividad enzimática. El  $Zn^{+2}$  inhibe completamente la actividad Rhasa en coincidencia con lo encontrado para Rhasa de *A. luteo-albus*. Un efecto similar se ha descrito para la enzima de *A. aculeatus*.<sup>10</sup>



**Figura 3.22:** Efecto de diferentes iones metálicos sobre la actividad Rhasa de *A. murorum*

### 3.3.2.7 Especificidad de sustrato sobre ramnoglucósidos naturales

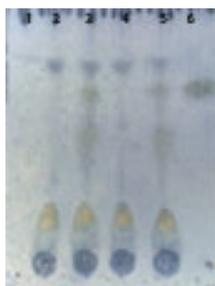
Tal como fue explicado anteriormente, ciertos flavonoides de origen vegetal tales como hesperidina, naringina y quercitrina pueden ser sustratos naturales para las Rhasas. A partir de las Figuras 3.23, 3.24 y 3.25 puede observarse la capacidad de esta enzima para hidrolizar naringina, pero no hesperidina. La enzima también fue capaz de liberar ramnosa de quercitrina en la que el residuo ramnosil está unido directamente al aglicón.



**Figura 3.23:** Análisis por CCF de productos de hidrólisis de quercitrina. Calle 1 Patrón de quercitrina (10,5 µg). Calle 2: Patrón de quercitrina + Rhasa a tiempo de reacción = 0. Calle 3: Patrón de quercitrina (10,5 µg) + ramnosa (11,25 µg) como patrón interno. Calle 4: quercitrina incubada con Rhasa. Calle 5: quercitrina incubada con Rhasa + ramnosa como patrón interno. Calle 6: Patrón de ramnosa.



**Figura 3.24:** Análisis por CCF de productos de hidrólisis de Naringina. Calle 1: Patrón de Naringina (10,5 µg). Calle 2: Patrón de Naringina (10,5 µg) + enzima a tiempo de reacción =:0. Calle 3: Naringina incubada con Rhasa. Calle 4: Naringina incubada con Rhasa + ramnosa (11,25 µg) como patrón interno. Calle 5: Patrón de Prunina (11,25 µg). Calle 6: Patrón de Ramnosa (11,25 µg).



**Figura 3.25:** Análisis por CCF de productos de hidrólisis de Hesperidina. Calle 1 Patrón de Hesperidina (10,5 µg). Calle 2: Patrón de Hesperidina (10,5 µg) + enzima tiempo de reacción = 0 + ramnosa (11,25 µg) como patrón interno. Calle 3: Hesperidina incubada con Rhasa. Calle 4: Hesperidina incubada con Rhasa + ramnosa (11,25 µg) como patrón interno. Calle 5: Patrón de Ramnosa (11,25 µg).

**Tabla 3.12:** Resultado cuantitativo de la hidrólisis de Ramnósidos naturales determinado por HPLC.

Sustrato	Hidrólisis (%)
Hesperidina	0,1
Naringina	30
Quercitrina	24

### 3.3.3. Caracterización proteómica

El análisis de la secuencia N-terminal de las Rhasas, tanto de *A. luteo-albus* como de *A. murorum*, no fue exitoso probablemente porque el N-terminal está bloqueado, tal como ocurre en el 50 % de las proteínas eucariotas. Cabe destacar que ninguna de las dos proteínas analizadas fue retenida por Conavalina A, lo que indica que posiblemente no estén glicosiladas. Sin embargo, podrían presentar algún otro tipo de modificación.

Debido a estos resultados y a la necesidad de contar con una secuencia parcial de estas proteínas para intentar su clonado y sobre expresión en futuros trabajos, se decidió analizar las huellas peptídicas de las mismas por MS/MS a partir de una digestión trípica. En este método, la proteína en estudio es hidrolizada mediante proteasas (comúnmente tripsina) para dar pequeños péptidos cuyas masas absolutas pueden determinarse mediante un espectrómetro de masas acoplado al detector adecuado, como el MALDI-TOF.

Para ello se trabajó con las fracciones puras de los extractos enzimáticos correspondientes a cada una de las especies fúngicas nombradas precedentemente (*A. luteo albus* y *A. murorum*) para obtener la huella peptídica (peptide mass fingerprint, PMF) por MALDI-TOF MS (PMF MALDI-TOF MS). Los espectros obtenidos correspondientes a cada una de las enzimas tratadas demuestran que existen picos diferentes entre estas dos especies. La idea de la aplicación de esta técnica es que permite identificar tanto posibles secuencias comunes así como secuencias propias de enzimas de especies distintas. Es decir, si el resultado de la comparación demostrara que estas dos Rhasas poseen picos equivalentes entre sí, se podría inferir que son diferentes pero con un alto grado de homología entre ellas. Este resultado, junto con los obtenidos mediante la metodología convencional sugeriría con mayor certeza que se trataría de isoenzimas. Con dichos mapas tríplicos y empleando la herramienta MASCOT4, que utiliza datos de espectrometría de masas para identificar proteínas en las bases de datos de secuencias primarias, se realizaron las búsquedas bioinformáticas a fin de identificar las proteínas originales. Sin embargo, a pesar de haberse obtenido muy buenos datos de ms y ms/ms, no nos fue posible identificar en las bases de datos disponibles y de manera estadísticamente significativa a ninguna proteína. Esto podría deberse a que los genomas de las especies involucradas no están aún disponibles. Como se puede observar a partir de los espectros, el PMF de la Rhasa de *A. luteo albus* es diferente al obtenido con la Rhasa de *A. murorum*.

Algunas veces la identificación de las proteínas mediante PMF es imposible, debido entre otras razones a las lagunas existentes en las bases de datos, o la existencia de

mezclas proteicas en la mancha (spot) seleccionada para la identificación. Para solucionar este problema, una posible alternativa es optar por una fragmentación de los péptidos obteniéndose la secuencia de aminoácidos correspondiente. Para ello, puede utilizarse una ionización tipo MALDI, mediante una segunda fragmentación (MALDI TOFTOF) o “electrospray” (trampa iónica, cuadruplo, etc.). Este método de secuenciación *de novo* es la estrategia a seguir para identificar proteínas que provienen de organismos que no han sido secuenciados, o su secuencia no ha sido anotada. Mediante esta secuenciación se obtienen secuencias de aminoácidos que son comparadas con las secuencias existentes en las bases de datos en busca de secuencias homologas. Aunque la proteína pueda no ser identificada o sea desconocida, la información obtenida a partir de la secuenciación *de novo* puede ser utilizada para clonar el gen correspondiente. Esta alternativa será empleada en trabajos posteriores a los efectos de lograr el clonado y la sobre expresión de estas enzimas.

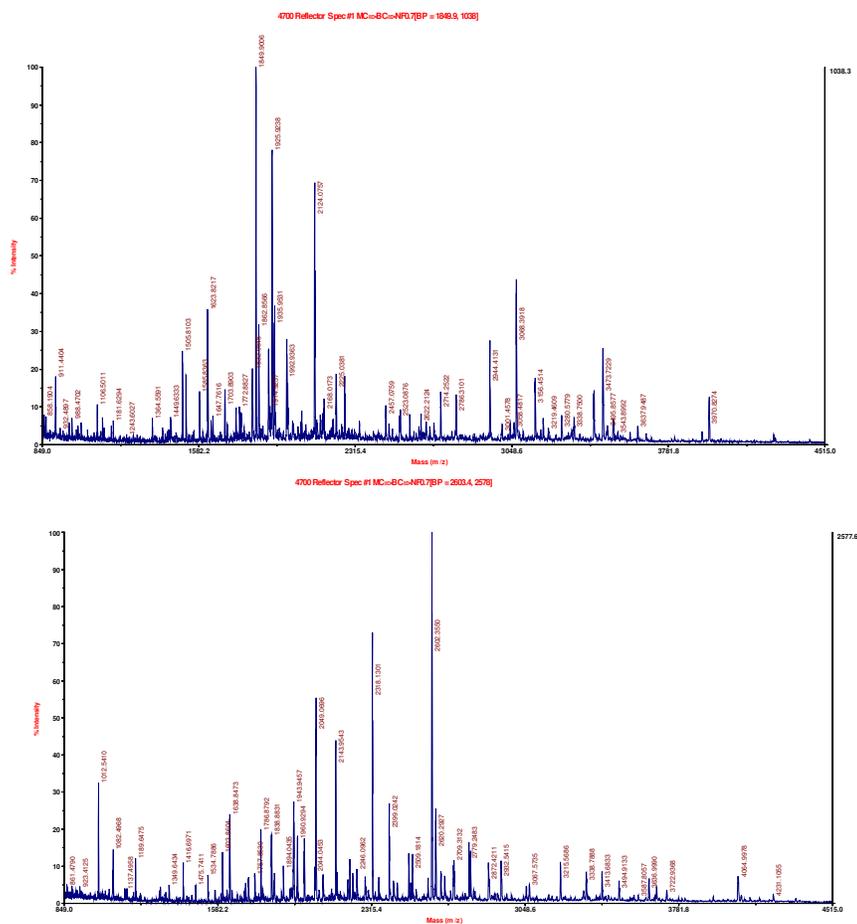


Figura 3.26: Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo de Rhase de *A. luteo-albus* y de *A. murorum*.

### 3.4 Conclusiones

Se purificaron dos proteínas con actividad Rhasa de los hongos alcalofílicos *A. luteo-albus* y *A. murorum*. El mejor inductor en la síntesis enzimática fue la ramnosa, obteniéndose valores de actividad Rhasa en *A. murorum* muy superiores a los obtenidos en *A. luteo-albus*. En ambos microorganismos la síntesis de la enzima está regulada por el mecanismo de inducción y represión catabólica como ocurre con la mayoría de las glicosidasas fúngicas. La represión por carbono, en este caso mediada por glucosa, se evidenció en una disminución de la producción de enzima en cultivos con mezcla de ramnosa/glucosa en comparación con la producción observada con ramnosa sola. Por otro lado, en medios complejos conteniendo HS, la combinación con triptona ejerció un efecto inhibitorio sobre la expresión de la enzima, a pesar de la conocida capacidad de la harina de soja como inductor<sup>41</sup>.

La ventaja de emplear ramnosa como inductor reside no solo en un aumento de la producción de enzima sino también en el manejo de un medio de cultivo libre de componentes complejos como la HS, lo cual en principio es ventajoso desde el punto de vista de la purificación de la enzima. En nuestro caso, cabe destacar la importancia de la eliminación de los pigmentos producidos en el cultivo en las primeras etapas de la purificación, habida cuenta que estos contaminantes se adsorben a las columnas de intercambio aniónico interfiriendo en el proceso. En los procesos de purificación de ambas proteínas no fue posible la interacción con matrices hidrofóbicas, lo que es congruente con la precipitación de las mismas a altas concentraciones de sulfato de amonio, sugiriendo la baja exposición de grupos hidrofóbicos en la superficie de las mismas.

El esquema general para la purificación de las Rhasas fue finalmente el siguiente: concentración por precipitación con sulfato de amonio o liofilización, eliminación de pigmentos por medio de cromatografía por permeación en gel, cromatografía de interacción aniónica y, por último, electroforesis preparativa. A partir de estos procesos, fue posible obtener fracciones homogéneas de cada una de las Rhasas, que fueron utilizadas para posteriores estudios de caracterización. Dichos estudios se basaron en la determinación de las condiciones óptimas de reacción frente a distintos sustratos. En cuanto al pH óptimo de reacción, factor que depende del sustrato a hidrolizar, la Rhasa de *A. luteo-albus* presentó un máximo de actividad a pH ligeramente ácido (pH 6.0) frente al sustrato natural naringina, y el mismo valor frente a pnp-ramnopiranosido. La temperatura óptima fue de 55 °C frente a pnp- $\alpha$ -L-ramnopiranosido. Por otro lado, se estudiaron las condiciones óptimas de reacción en términos de pH y temperatura de la Rhasa de *A. murorum*. En este caso, se decidió

analizar el efecto de ambos factores combinados mediante superficie de respuesta a fin de reducir el número de experimentos sin desechar las interacciones entre dichos parámetros. Se encontró un máximo de actividad a 60°C y pH 8,0. La propiedad de una enzima de ser activa en una determinada condición está íntimamente relacionada con su estabilidad.

En cuanto al efecto de los cationes estudiados cabe destacar el efecto del  $Zn^{+2}$  que resulta completamente inhibitorio para ambas actividades. Este efecto ha sido reportado para las Rhasas producidas por *S. paucimobilis* <sup>6</sup>, *C. stercorearium* <sup>1</sup> y *Thermomicrobia* <sup>7</sup>, todas bacterianas, pero nunca en Rhasas fúngicas.

El estudio de los parámetros cinéticos de las Rhasas arrojó valores del mismo orden entre las dos enzimas,  $V_{m\acute{a}x}$  111,1 U/mg y  $K_m$  6,2 mM en el caso de *A. luteo-albus* y  $V_{m\acute{a}x}$  147,1 U/mg y  $K_m$  3,9 (mM) para *A. murorum*. Sin embargo, el efecto inhibitorio de la ramnosa fue bastante más potente en el caso de *A. murorum* ( $K_i$ : 0,10 mM.) que para *A. luteo-albus* ( $K_i$ : 4,7 mM).

La propiedad más representativa de estas enzimas cuando se las compara con otras Rhasas fúngicas, es su capacidad para hidrolizar sustratos solubles e insolubles en el rango de pH 8,5-9,5. Las Rhasas descritas en este trabajo muestran la capacidad de hidrolizar distintos sustratos, lo que permite su potencial aplicación en procesos biotecnológicos tales como la hidrólisis industrial de ramnósidos.

### 3.5 Referencias Bibliográficas

1. Zverlov, V. *et al.* The thermostable  $\alpha$ -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercorarium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial  $\alpha$ -L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. *Mol Microbiol* 35, 173-179 (2000).
2. Manzanares, P., Orejas, M., Ibañez, E., Vallés, S., & Ramon, D. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*. *Lett Appl Microbiol* 31, 198-202 (2000).
3. Munish, P. & Sukirti, K. Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* V21, 753-758 (2005).
4. Scaroni, E., Cuevas, C., Carrillo, L., & Ellenrieder, G. Hydrolytic properties of crude  $\alpha$ -L-rhamnosidases produced by several wild strains of mesophilic fungi. *Lett Appl Microbiol* 34, 461-465 (2002).
5. Elinbaum, S., Ferreyra, H., Ellenrieder, G., & Cuevas, C. Production of *Aspergillus terreus*  $\alpha$ -L-rhamnosidase by solid state fermentation. *Lett Appl Microbiol* 34, 67-71 (2002).
6. Miake, F. *et al.* Purification and characterization of intracellular  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Pseudomonas paucimobilis* FP2001. *Arch Microbiol* 173, 65-70 (2000).
7. Birgisson, H. *et al.* Two new thermostable  $\alpha$ -L-rhamnosidases from a novel thermophilic bacterium. *Enzyme Microb Technol* 34, 561-571 (2004).
8. Manzanares, P., Vallés, S., Ramon, D., & Orejas, M.  $\alpha$ -L-rhamnosidases: Old and New Insights in *Industrial Enzymes* (eds. Polaina, J. & MacCabe, A.P.) 117-140 (Springer, Valencia, 2007).
9. Yu, H. *et al.* Purification and characterization of gypenoside- $[\alpha]$ -rhamnosidase hydrolyzing gypenoside-5 into ginsenoside Rd. *Process Biochem* 39, 861-867 (2004).
10. Manzanares, P. *et al.* Construction of a Genetically Modified Wine Yeast Strain Expressing the *Aspergillus aculeatus* rhaA Gene, Encoding an  $[\alpha]$ -L-Rhamnosidase of Enological Interest. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7558-7562 (2003).
11. Kurosawa Y, Ikeda, K., & Egami, F.  $\alpha$ -L-Rhamnoside of the liver of *Turbo cornutus*. *J Biochem* 73, 31-37 (1973).
12. Manzanares, P., de Graaff, L.H., & Visser, J. Purification and characterization of an  $[\alpha]$ -rhamnosidase from *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* 157, 279-283 (1997).
13. Gallego, M.V., Pinãga, F., Ramoãn, D., & Valleãs, S. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in winemaking. *J Food Sci*(2000).
14. Romero, C., Manjon, A., Bastida, J., & Iborra, J.L. A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Anal Biochem* 149, 566-571 (1985).

15. Young,N.M., Johnston,R.A.Z., & Richards,J.C. Purification of the a-L-rhamnosidase of *Penicillium decumbens* and characterization of two glycopeptide components. *Carbohydr Res* 191, 53-62 (1989).
16. Yanai,T. & Sato,M. Purification and characterization of an alpha-L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X349. *Biosci Biotechnol Biochem.* 10, 2179-2185 (2000).
17. Hughes,H.B., John,P.M., & Anne E.Osourn Characterisation of the saponin hydrolysing enzyme avenacoside-+|-l-rhamnosidase from the fungal pathogen of cereals, *Stagonospora avenae*. *Eur J Plant Pathol* V110, 421-427 (2004).
18. Hashimoto,W., Nankai,H., Sato,N., Kawai,S., & Murata,K. Characterization of a-Rhamnosidase of *Bacillus* sp. GL1 Responsible for the Complete depolymerization of Gellan. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 368, 56-60 (1999).
19. Jang I.S. & Kim,D.H. Purification and characterization of a-L-Rhamnosidase from bacteroides JY-6, a human intestinal bacterium. *Biol Pharm Bull* 19, 1546-1549 (1996).
20. Eliades,L., Cabello,M., Voget,C.E., & Galarza,B. Actividad queratinolítica en hongos alcalofílicos y alcalino-tolerantes aislados de suelo. *Revista Argentina de Microbiología* 39, 112 (2007).
21. Eliades,L.A. Estudio de la micobiota alcalofílica y alcalino-tolerante del suelo de los bosques de *Celtis tala Gill* [ex Planch] y *Scutia buxifolia Reiss* en el Partido de Magdalena, provincia de Buenos Aires. 2009. Facultad de Ciencias Naturales y Museo Universidad Nacional de La Plata - Argentina.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
22. Gupta,R. & Rammani Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 21-23 (2006).
23. Fincher,R.M. *et al.* Infection due to the fungus *Acremonium* (Cephalosporium). *Medicine* 70, 398-409 (1991).
24. Larone.D.H. *Medically Important Fungi - A guide to Identification* Washington D.C., 1995).
25. Doehlert,D.H. Uniform shell designs. *Applied Statistics*231-239 (1970).
26. Reguera,G. & Leschine,S. Fast and Efficient Elution of Proteins from Polyacrylamide Gels Using Nanosep® Centrifugal Devices. Department of Microbiology, University of Massachusetts-Amherst . 2009.  
Ref Type: Electronic Citation
27. Bradford,M.M. 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 (1976).
28. Smith B.J. *Methods in Molecular Biology.* . (ed. Walker JM,E.e.) 41-56 New Jersey, 1984).
29. Kennedy,M. & Krouse,D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 456-475 (1999).
30. San Blas,G. & Calderone,R. *Pathogenic fungi: host interactions and emerging strategies for control*(Caister Academic Press,2004).

31. Limjindaporn,T., Khalaf,R.A., & Fonzi,W.A. Nitrogen metabolism and virulence of *Candida albicans* requires the GATA-type transcriptional activator encoded by GAT1. *Mol Microbiol* 50, 993-1004 (2003).
32. Rojas,N.L., Cavalitto,S.F., Cabello,M., Hours,R.A., & Voget,C.E. Alkaline Polysaccharidases Produced in Solid State Cultures by Alkalophilic Fungi Isolated from Argentina. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 2, 1-10 (2008).
33. Freer,S.N. & Detroy,R.W. Regulation of r-1,4-Glucosidase Expression by *Candida wickerhamii*. *Appl. Environ. Microbiol.*159 (1985).
34. Bailey,C. & Arst,H.N.J. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Eur J Biochem* 51, 573-577 (1975).
35. Spagna,G., Barbagallo,R.N., Martino,A., & Pifferi,P.G. A simple method for purifying glycosidases:  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine. *Enzyme Microb Technol* 27, 522-530 (2000).
36. Roitner,M., Schalkhammer,T., & Pittner,F. Preparation of prunin with the help of immobilized naringinase pretreated with alkaline buffer. *Appl Biochem Biotech* 9, 483-488 (1984).
37. Hsieh,P.C. & Tsen,H.Y. Purification and characterization for a  $\alpha$ -rhamnosidase from two fungal naringinase preparations. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.* 29, 61-63 (1991).
38. Mutter,M., Beidman,G., Schols,H.A., & Voragen,A.G. Rhamnogalacturonan  $\alpha$ -L-Rhamnopyranohydrolase. A novel enzyme specific for the terminal nonreducing rhamnosyl unit in rhamnogalacturonan regions of pectin. *Plant Physiol.* 106, 241-250 (1994).
39. Caldini,C. Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. *Enzyme Microb Technol* 16, 286-291. (1994).
40. Mutter,M. New rhamnogalacturonan degrading enzymes from *Aspergillus aculeatus*. 1997. Wageningen University. The Netherlands. Ref Type: Thesis/Dissertation
41. Puri,M. & Banerjee,U.C. Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotech Adv* 18, 207-217 (2000).
42. Cavalitto,S.F. & Mignone,C.F. Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Process Biochem* 42, 175-179 (2007).

## Capítulo 4

Clonado y expresión de *pg1* de *Aspergillus kawachii*  
en *Saccharomyces cerevisiae*



## Resumen

El gen que codifica para una poligalacturonasa (PG1) de *Aspergillus kawachii* fue clonado y sobreexpresado en un sistema de expresión heteróloga de *Saccharomyces cerevisiae*. En el presente capítulo se describen las estrategias de clonado de *pg1* analizando la expresión de la enzima activa en cada caso. Inicialmente, se realizó una búsqueda bioinformática utilizando el programa **blastn** en base a la secuencia FASTA N-terminal de PG1 (STCTFTDAATASESK) y se encontró que la secuencia analizada se corresponde con el gen *pgaA* de *A. kawachii* no publicada en bibliografía. Por ello, se utilizó la secuencia de *pgaA* para diseñar los primers necesarios para el clonado del gen de PG1. En primer lugar, el gen *pg1* completo (con un intrón) fue clonado en el plásmido pYES2. Sin embargo, al evaluar la expresión de *S. cerevisiae* recombinante, la producción de enzima fue prácticamente nula. Por este motivo, se diseñó una estrategia de eliminación del intrón *in vitro* a partir del gen clonado en pYES2 mediante digestiones enzimáticas y PCR parciales del gen. Como resultado de esta estrategia, fue posible obtener una PGasa activa, cuyo PM coincide con el de la proteína silvestre. Debido a que el vector pYES2 cuenta con un promotor inducible por galactosa, un azúcar costoso, se clonó el gen *pg1* en dos plásmidos de expresión constitutiva para levaduras de bajo y alto número de copias (p416 y p426, respectivamente). En todos los casos se obtuvieron alrededor de 1,5-2 U/ml de enzima, cantidades equivalentes a 70 veces la alcanzada con la enzima silvestre de *A. kawachii*.

## 4.1 Introducción

La pectina (o sustancias pécticas) es uno de los polisacáridos mayoritarios constituyentes de la pared celular de plantas superiores. Además de pectina, la pared celular posee celulosa, xiloglucanos, xilanos, arabinoxilanos, arabinanos, arabinogalactanos, galactanos, glucanos, glicoproteínas, (galacto)-glucomananos y lignina. Estos polisacáridos, en conjunto, son los compuestos orgánicos encontrados en mayor cantidad en la naturaleza. Los componentes de la pared celular vegetal pueden ser clasificados globalmente dentro de tres grupos principales: celulosa, hemicelulosa y pectina<sup>1,2</sup>. La celulosa constituye cuantitativamente la mayor fracción en la pared celular, y consta de cadenas lineales (no ramificadas) de glucosa, con uniones  $\beta$ -1,4. Las cadenas de celulosa están ordenadas en fibras y son las responsables de mantener la rigidez estructural de la pared celular. La hemicelulosa es un grupo comparativamente más heterogéneo de polisacáridos y, como grupo, es el segundo en cantidad. Los componentes principales de la hemicelulosa varían dependiendo del tipo de vegetal al que pertenezcan<sup>3,4</sup>. El tercer grupo de polisacáridos de la pared celular está constituido por las sustancias pécticas, las cuales básicamente están formadas por un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (AGA) unidos mediante enlaces  $\alpha$ -1,4. Esta cadena de ácido poligalacturónico (PGA) está interrumpida por residuos de ramnosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1,2. Estos residuos de ramnosa suelen tener unidas largas cadenas laterales de azúcares neutros. En algunas pectinas (provenientes de remolacha y manzana) las cadenas laterales suelen terminar en ácido ferúlico<sup>1,5,6,7</sup>. Las pectinasas, o enzimas pécticas, son las enzimas que degradan la pectina. Constituyen un heterogéneo y complejo sistema catalítico, hecho que es consistente con la complejidad estructural de los sustratos que atacan. Las pectinasas poseen variadas aplicaciones en la industria de alimentos, en particular en la industria procesadora de frutas y vegetales. El uso más antiguo, y aún hoy el más difundido, es su empleo en la clarificación de jugos (i.e.: manzana, uva) mediante la adición conjunta de PGasa y PE o bien de PL sola<sup>8</sup>. Las pectinasas se pueden utilizar también en diferentes procesos agroindustriales: extracción enzimática de pectina<sup>9</sup>, maceración de tejidos vegetales<sup>10</sup>, biorrefinado de fibras vegetales y en el tratamiento de residuos agroindustriales para incrementar su fermentabilidad y/o aumentar su digestibilidad para la alimentación animal<sup>11</sup>. Se estima que las aplicaciones de las pectinasas se van incrementando a medida que se hacen disponibles nuevas enzimas con propiedades diferenciales respecto a las pre-existentes.

La cantidad de actividad enzimática que se alcanza con cepas silvestres, en particular de PGasa ácida es baja aun luego de la optimización de los medios de cultivo, por lo que se dificulta la obtención de cantidades significativas que permitan su aplicación industrial. Una alternativa para subsanar este déficit es clonar a la proteína de interés en un sistema de expresión heterólogo y sobreexpresarla. Una opción interesante en el caso de enzimas fúngicas es el uso de levaduras como hospedadores del vector de expresión ya que estos microorganismos son fácilmente cultivables en medios semi-sintéticos, poseen rendimientos celulares elevados (obteniéndose concentraciones finales de biomasa de más de 50 g/l) y producen altas concentraciones de la proteína de interés. *Saccharomyces cerevisiae* ha demostrado ser un buen sistema de expresión de enzimas hidrolíticas fúngicas, incluyendo varias PGasas<sup>12-16</sup>. Considerando que las PGasas tienen un mercado directo en la industria alimentaria, la categoría de GRAS de *S. cerevisiae* es una ventaja adicional.

#### 4.1.1 *Aspergillus kawachii*

Algunos hongos del género *Aspergillus* han sido usados tradicionalmente en países orientales (Japón, China, Corea, etc.) en la fermentación de granos para la producción de alimentos y bebidas. Las especies más importantes de estos hongos son: *A. tamarii*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. awamori*, *A. usami* y *A. kawachii*<sup>17</sup>. *Aspergillus kawachii* IFO 4033, también llamado el hongo blanco, es un hongo filamentoso que se caracteriza por ser un buen productor de ácido cítrico, además de ser muy utilizado en la elaboración de vino de arroz (sake)<sup>18;19</sup>. Este último uso está relacionado con el hecho de producir enzimas extracelulares con la interesante propiedad de ser activas y estables a pH más ácidos que sus equivalentes producidas por otros microorganismos<sup>20</sup>.

En la Tabla 4.1 se indican algunos ejemplos de procesos tradicionales llevados a cabo en países orientales, relacionados con biotecnología de alimentos, en los cuales *A. kawachii* es empleado como iniciador de la fermentación. En términos generales, las enzimas extracelulares de *A. kawachii* degradan los polímeros (especialmente los polisacáridos) de los granos con el objeto de incrementar el tenor de los azúcares libres (proceso equivalente al malteado en la elaboración de cerveza a partir de cebada) en el sustrato (mosto) el cual es luego inoculado con levaduras para llevar a cabo la fermentación alcohólica. Es de destacar que los inicios en el uso de *A. kawachii* se remontan a tiempos ancestrales, conjuntamente con el del uso empírico de microorganismos para el procesamiento de materiales de origen vegetal destinado a la producción de alimentos.

**Tabla 4.1** Empleo de *A. kawachii* como iniciador de fermentación en la elaboración de bebidas y alimentos en China, Corea y Japón.

Producto	Nombre popular	País	Iniciador*	Ingrediente principal	Referencia
Vino de arroz (sake)	Shochu	Japón	Shochu-koji	Arroz, cebada o batata.	Teramoto <i>et al.</i> , 1994 <sup>21</sup> Obayashi y Uchi, 1999 <sup>22</sup> Setoguchi <i>et al.</i> , 1999 <sup>23</sup>
Cerveza	Takju	Corea	<i>A. kawachii</i> -Nuruk	Arroz, trigo.	So <i>et al.</i> , 1999 <sup>24</sup>
Sazonador	Mirin	Japón	Shohu-koji	Arroz	Nunokawa <i>et al.</i> , 1982 <sup>25</sup>
Pasta de soja	Kochujang	Corea	<i>A. kawachii</i> -Meju	Soja, ají o chile	Lee <i>et al.</i> , 1984 <sup>26</sup> Kawai <i>et al.</i> , 1977 <sup>27</sup>
Vino	Tipo sake	Japón	Shochu-koji	Arroz	Chiyogiku, 1982 <sup>28</sup> Shimamura <i>et al.</i> , 2001 <sup>29</sup>
Vino	-	China	<i>A. kawachii</i>	Jugos, ácido acético.	Zhang, 2001 <sup>30</sup>

#### 1.3.4.1 Enzimas de *Aspergillus kawachii*

Las enzimas extracelulares de *A. kawachii* resultan activas en condiciones ácidas. Esta condición de acidez se refiere a rangos de pH de alrededor de 3,0, valores que no necesariamente coinciden con el óptimo para su actividad. En la Tabla 4.2 se detallan las hidrolasas de *A. kawachii* que han sido purificadas y caracterizadas. La mayoría de las enzimas estudiadas están involucradas en la degradación del almidón, celulosa, hemicelulosa y proteínas. Se han encontrado actividades inducibles tales como pectin liasa, pectin metilesterasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -1,5-endoarabinasa,  $\beta$ -D-galactosidasa/exogalactanasa y  $\beta$ -1,4-endogalactanasa. También se han detectado actividades de  $\alpha$ -L-rhamnosidasa y  $\beta$ -D-fucosidasa cuando este hongo es cultivado en pectina cítrica o pomaza de limón<sup>31</sup>.

Varias de estas han sido clonadas y expresadas en *Saccharomyces spp.*

**Tabla 4.2:** Propiedades de algunas enzimas purificadas de *A. kawachii*.

Enzima	PM	pl	pH óptimo	Rango de pH	Temperatura óptima	Referencia
<b>Amilasas</b>						
Amilasa I	104	4,25	4-5	2,5-6,0	70 (pH 5)	Mikami <i>et al.</i> (1987) <sup>32</sup>
Amilasa II	66	4,20	5	2,5-6,0	70 (pH 5)	<i>Ibid</i>
Amilasa A1	85	-	5	2,0-6,5	-	Sudo <i>et al.</i> (1994) <sup>33</sup>
Amilasa A2	50	-	5	4,5-9,5	-	<i>Ibid</i>
Amilasa A3	56	-	-	-	-	Omori <i>et al.</i> (1994) <sup>34</sup>
Glucoamilasa	101	-	4-5	3-8	-	Mikami <i>et al.</i> (1989) <sup>32</sup>
<b>Proteasas</b>						
Carboxyl- proteínasa	35	3,9	2,8 y 3,4	2,2-6,4	50	Yagi <i>et al.</i> (1986) <sup>35</sup>
<b><math>\beta</math>-Glucosidasas</b>						
Glucosidasa EX-1	145	-	-	2-9	30	Iwashita <i>et al.</i> (1998) <sup>36</sup>
Glucosidasa EX-2	130	-	-	2-9	30	<i>Ibid</i>
Glucosidasa CB-1	120	-	-	2-9	30	<i>Ibid</i>
<b>Xilanastas</b>						
Endo-xilanasa A	35	6,70	5,5	3-10	60	Ito <i>et al.</i> (1992b) <sup>15</sup>
Endo-xilanasa B	26	4,40	4,5	3-10	55	<i>Ibid</i>
Endo-xilanasa C	29	3,50	2,0	1-9	50	<i>Ibid</i>
<b>Pectinasas</b>						
PGasa-A1	43	-	4	-	50	Kojima <i>et al.</i> (1999) <sup>37</sup>
PGasa-A2	80	-	3	-	60	<i>Ibid</i>
PGasa-B	71	-	5	-	60	<i>Ibid</i>
PG1	60	3,5-5,0	4,5	2-4,5	-	Contreras Esquivel <i>et al.</i> <sup>38</sup>

Estudios previos realizados en este laboratorio revelaron que una de las pectinasas producidas por *A. kawachii*, denominada PG1, presenta características sumamente interesantes, particularmente respecto a su estabilidad y actividad a pHs bajos. Sin embargo, los niveles de dicha actividad que se alcanzan en los cultivos son relativamente bajos por lo cual se planteó la necesidad de incrementarlos considerando su posible aplicación en procesos en mayor escala.

En este capítulo se describen las estrategias de clonado de *pg1* en *S. cerevisiae*, analizando la expresión de la enzima activa en cada caso para luego caracterizar la proteína obtenida a los efectos de evaluar su posible aplicación en procesos biotecnológicos.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Reactivos Químicos

Todos los reactivos químicos empleados en este capítulo son de grado analítico. El ácido poligalacturónico (PGA, sal sódica, 90 % de ácido anhidrogalacturónico) y membranas de celulosa para diálisis (corte 12.400 Da), fueron obtenidos de Sigma. Los patrones de proteína de bajo peso molecular (14,4 a 94 kDa) para electroforesis, anfolitos para isoelectroenfoque (IEF) en el rango de pH 3,0–10,0 (Pharmalyte), patrones de pI de amplio rango (pI 3,5-9,3) y el DNA Purification kit illustra™ MicroSpin Columns fueron obtenidos de GE Healthcare. Las enzimas ligasa T4, GoTaq polimerasa, BamH1, EcoR1 fueron de Promega y las enzimas PF1M1 y Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) fueron obtenidas de New England Biolabs. Las amplificaciones por PCR fueron llevadas a cabo en termociclador (modelo Mastercycler pro S, Eppendorf).

### 4.2.2 Cepas y condiciones de cultivo

*Aspergillus kawachii* IFO 4308 se utilizó como fuente de ADN para el clonado de *pg1*. La cepa INV TOP10F' (F' [*lacIq Tn10* (TetR)] *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *endA1*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara,leu*)7697, *galU*, *galK*, *nupG*, *rpsL* (StrR) de *E. coli* (Invitrogen) fue utilizada para amplificar las construcciones intermedias y seleccionar los recombinantes<sup>39</sup>. La cepa INVSc1 (MAT $\alpha$  *his3* $\Delta$ 1 *leu2 trp1-289 ura3-52*/MAT $\alpha$  *his3* $\Delta$ 1 *leu2 trp1-289 ura3-5*) de *S. cerevisiae* (Invitrogen) fue utilizada como cepa hospedadora para la expresión del gen clonado *pg1*. Los cultivos de *A. kawachii* fueron realizados según Contreras et al.<sup>38</sup>. *E. coli* y *S. cerevisiae* fueron cultivados según indicaciones del fabricante.

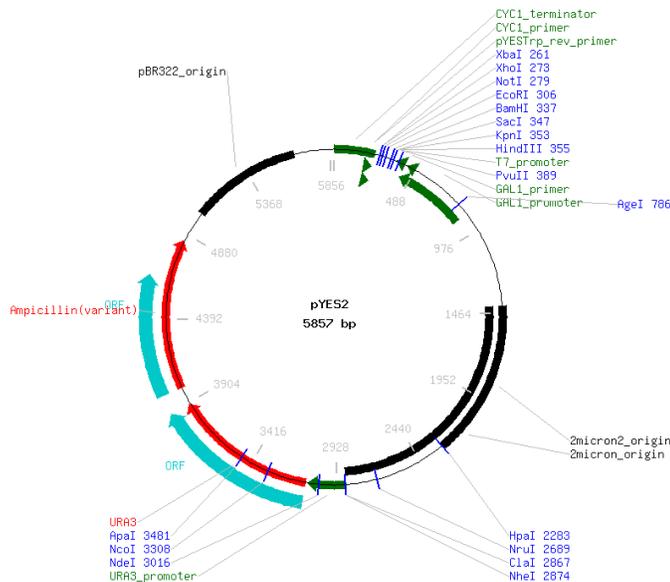
### 4.2.3 Búsqueda del gen *pg1* por medio de herramientas bioinformáticas y diseño de primers.

La búsqueda bioinformática se realizó por medio del programa **blastn**, utilizando la secuencia FASTA [STCTFTDAATASESK] N-terminal correspondiente a PG1<sup>38</sup>.

La secuencia FASTA hallada, que corresponde al gen *pgaA* de *A. kawachii*<sup>40</sup>, fue analizada mediante herramientas bioinformáticas y comparada con *pg1*<sup>38, 41</sup>. En base a dicha secuencia fueron diseñados los primers: **PG1fw** (5'-TTTATCGGATCCATGCCTTCTGCCAAGCC-3') y **PG1rv** (5'-TTTATCGAATTCTTACTGACTGCAGGAAGCGC-3').

#### 4.2.4 Vectores

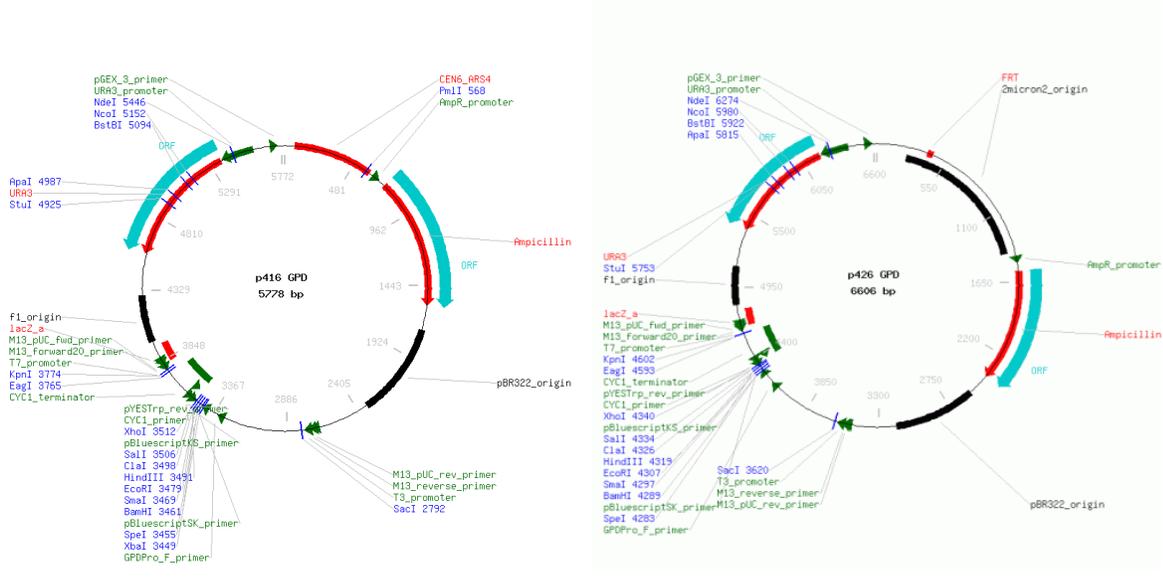
El plásmido pYES2 (Invitrogen) fue utilizado como vector de expresión inducible. pYES2 es un vector de 5,9 kb diseñado para la expresión inducible de proteínas recombinantes en *S. cerevisiae*. Las características de este vector permiten el clonado de los genes de interés y la selección de los transformantes por medio de la prototrofia a uracilo. Este vector contiene los siguientes elementos: Promotor GAL1, para altos niveles de expresión reprimible por glucosa e inducible por galactosa<sup>42</sup>; un sitio de clonado múltiple versátil, el terminador transcripcional *CYC1*, y resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli* (Figura 4.1).



**Figura 4.1:** Mapa del los vector de expresión inducible pYES2.

Fuente: <https://www.lablife.org/>

Los plásmidos p416 y p426<sup>43</sup> fueron utilizados como vectores de expresión constitutivos. Tal como se observa en la Figura 4.2, estos vectores de expresión presentan un promotor constitutivo derivado del gen de gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa (GPD) y un marcador de selección para uracilo. Estos plásmidos son el resultado de la inserción de estos cassettes a los plásmidos centroméricos y de 2  $\mu$  de la serie pRS<sup>44</sup>. El sitio múltiple de clonado de estos plásmidos, basado en los plásmidos pBIISK (Stratagene, La Jolla, CA, USA) provee 9 sitios de clonado únicos, permitiendo la construcción de bibliotecas de cADN. Debido a que el polylinker no provee de un codón de inicio ATG, sólo podrán ser expresados aquellos genes que lleven el propio.



**Figura 4.2:** Mapas de los vectores de expresión constitutivos p416 y p426. Fuente: <https://www.lablife.org/>

#### 4.2.5 Purificación del ADN genómico de *A. kawachii*

A partir de un cultivo de *A. kawachii*; el micelio fue cosechado por filtración y resuspendido en buffer de lisis conteniendo Tris-HCl (0,2 M, pH 7,5), NaCl (0,5 M), EDTA (0,01 M), SDS (1 %), 0,4 g de bolitas de vidrios lavadas (0,3-0,4  $\mu$ m) y 0,2 ml de fenol / cloroformo (1 / 1 v/v). Esta mezcla fue agitada en vórtex e incubada en baño de agua / hielo, 5 veces por 30 s cada vez. Luego una solución de fenol / cloroformo / isoamílico (25 / 24 / 1) fue agregada y nuevamente agitada en vórtex durante 1 min. Esta mezcla fue centrifugada a 14.000 g durante 5 min, y la fase acuosa fue separada y precipitada con una solución de etanol / acetato de sodio y centrifugación a 14.000 g durante 2 min. El pellet fue resuspendido en 20  $\mu$ l de agua.

#### 4.2.6 Obtención del gen *pg1* mediante PCR desde ADN genómico de *A. kawachii*.

El gen *pg1* fue obtenido por PCR utilizando el ADN genómico como molde. La amplificación se realizó utilizando los primers PG1fw y PG1rv en dos etapas consecutivas de baja y alta temperatura de annealing respectivamente (95°C 60 s, 8  $\times$  [94°C 30 s, 54°C 90 s, 72°C 100 s] y 30  $\times$  [94°C 30 s, 64,5°C 50 s, 72°C 100 s]). El producto de PCR fue visualizado por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

## 4.2.7 Estrategias de clonado de *pg1*

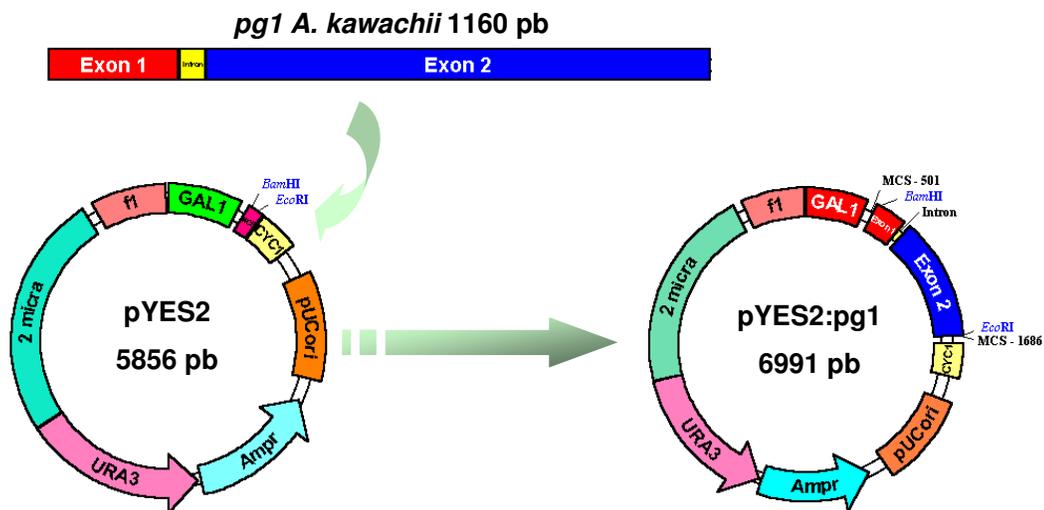
### 4.2.7.1 Estrategia de clonado de *pg1* con intrón en pYES2

#### 4.2.7.1.1 Clonado del gen *pg1* en pYES2

El producto de PCR (*pg1*) y *pYES2* fueron digeridos con EcoRI y BamHI. El plásmido fue tratado además con fosfatasa alcalina a los efectos de evitar su recirculación. Luego de ser purificado mediante el sistema de ADN Purification kit illustra™ MicroSpin Columns (GE Healthcare), el gen *pg1* fue ligado al vector pYES2 con ADN ligasa T4 (Promega) durante 16 h a 37°C, generándose el plásmido recombinante pYES2:*pg1* (Figura 4.3).

#### 4.2.7.1.2 Transformación y selección de clones positivos *E. coli* TOP10F'.

Las células de *E. coli* TOP10F' competentes se transformaron con el plásmido recombinante pYES2:*pg1* como se detalla a continuación: Se incubó una mezcla compuesta por 90 µl de *E. coli* competentes<sup>39</sup> y 5 µl de pYES2:*pg1* en baño de agua/hielo por 30 min, luego a 42°C por 15 min y finalmente en agua/hielo por 2 min. Luego se agregaron 850 µl de medio LB a esta mezcla para ser reincubada a 37°C por 45 min. Finalmente, esta mezcla fue centrifugada por 10 min a 10.000 g y el pellet fue sembrado en placas de Petri conteniendo agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Estas placas fueron incubadas ON a 37°C. Las colonias obtenidas fueron analizadas por colony PCR<sup>39</sup>.



**Figura 4.3** Esquema representativo de la estrategia de clonado del gen *pg1* con el intrón en pYES2.

#### 4.2.7.1.3 Comprobación del marco abierto de lectura

Los plásmidos de los clones positivos (G1-G14) fueron extraídos<sup>39</sup> y luego fueron secuenciados a partir del extremo 5' utilizando el T7 promoter/priming (Automatic Sequencer 3730xl (MACROGEN Corp., Corea)).

#### 4.2.7.1.4 Transformación y selección de clones positivos *S. cerevisiae* INVSc1

Células electrocompetentes de *S. cerevisiae* INVSc1 fueron electroporadas con ADN plasmídico proveniente de los clones G11 y G12<sup>45</sup>. Las colonias obtenidas fueron analizadas por colony PCR<sup>46</sup>.

#### 4.2.7.1.5 Expresión de *pg1* en pYES2

La inducción fue llevada a cabo en dos clones (1 y 3) de *S. cerevisiae* INVSc1 según protocolo del fabricante (Invitrogen). Se estudió la expresión de la PG1 recombinante durante 50 h, tanto en el sobrenadante como en el citoplasma.

### 4.2.7.2 Estrategia de clonado de *pg1* sin intrón en PYES2

#### 4.2.7.2.1 Generación del inserto *pg1* sin intrón

La enzima PflMI fue seleccionada para esta estrategia y fueron diseñados los primers PGIsl: 5'ACTCCAGGTGGTGGTTCCCTCAAAGGTGACGGTGGTGCCATCGTTG 3'; formado por 17 bases del extremo 3' del primer exón y 30 bases del extremo 5' del segundo (incluyendo la secuencia diana de PflMI: 5'CCANNNNTGG 3') y PG1intrv 5'GGTGGTGCCATCGTTGAGGTCCTTCAAGTT 3'; formado por bases del extremo 3' del primer exón). Se amplificó el primer exón utilizando el pYES2:*pg1* como molde (obtenido por medio de PureYield™ Plasmid Midiprep System, Promega, según indicaciones del fabricante), el primer PG1fw (con la secuencia BamH1) y el primer PG1intrv. La amplificación fue realizada en las condiciones que se detallan a continuación: 95°C 180 s., 30× [95°C 60 s, 56°C 30 s, 72°C 60 s] 72°C 300 s.

El fragmento obtenido fue purificado mediante DNA Purification kit illustra™ MicroSpin Columns (GE Healthcare), y reamplificado utilizando los primers PG1fw y PGIsl y las mismas condiciones de reacción. El producto de PCR fue visualizado por medio de electroforesis en gel de agarosa al 3 %.

#### 4.2.7.2.2 Clonado del fragmento en PYES2

El producto de amplificación obtenido se digirió con BamH1 y PflMI (según las indicaciones del fabricante). Por otro lado, se digirió pYES2:*pg1* con las mismas enzimas liberándose del mismo el primer exón junto con el intrón. El plásmido abierto

fue purificado, tratado con fosfatasa alcalina y ligado al primer exón utilizando Ligasa T4.

#### 4.2.7.2.3 Transformación y selección de clones positivos de *E. coli* TOP10F´.

El plásmido obtenido (sin intrón), denominado pYES2:*pg1*ΔI, fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli* TOP 10´ tal como fue detallado en 4.2.7.1.2.

#### 4.2.7.2.4 Comprobación de eliminación del intrón y del marco de lectura abierto

De los clones obtenidos, 10 fueron seleccionados al azar a los efectos de verificar que el intrón haya sido extraído y que el marco de lectura resultante fuera el correcto. Para ello, los plásmidos fueron extraídos mediante Miniprep<sup>39</sup> y utilizados como molde para una PCR utilizando los primers PG1fw y PG1rv en las condiciones de reacción detalladas en 4.2.7.2.1. El producto de PCR fue digerido con la enzima PF1M1 y visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 %. De los clones que resultaron positivos por PCR y restricción, 5 fueron seleccionados para secuenciar a partir del extremo 5´ utilizando el T7 promoter/priming (Automatic Sequencer 3730xl (MACROGEN Corp., Corea)).

#### 4.2.7.2.5 Transformación y selección de clones positivos *S. cerevisiae* INVSc1

Los plásmidos de las cepas seleccionadas que presentaron el marco de lectura correcto, fueron extraídos por MIDIprep y utilizados para transformar células competentes de *S. cerevisiae* INVSC1<sup>45</sup>. Las colonias obtenidas fueron analizadas por medio de colony PCR<sup>46</sup>

#### 4.2.7.2.6 Expresión de *pg1*ΔI en pYES2

La inducción fue llevada a cabo en dos clones (3 y 5) de *S. cerevisiae* INVSc1 según protocolo del fabricante (Invitrogen). La expresión de la PG1 recombinante fue estudiada durante 40 h midiendo actividad enzimática tanto en el sobrenadante como en el citoplasma.

### 4.2.7.3 Estrategia de clonado de *pg1*ΔI en p416 y p426

#### 4.2.7.3.1 Digestión de *pg1*ΔI, p416 y p426 y clonado

El plásmido pYES2:*pg1*ΔI fue sometido a restricción por medio de las enzimas BamH1 y EcoR1 según indicaciones del fabricante a los efectos de obtener el gen de *pg1* sin intrón. Por otro lado, se purificaron los plásmidos p416 y p426 a partir de cultivos de *E.*

*coli* Top 10 F' por medio de Miniprep<sup>39</sup>, se digirieron con las mismas enzimas de restricción y se trataron con fosfatasa alcalina. Los productos de restricción fueron purificados mediante DNA Purification kit illustra™ MicroSpin Columns (GE Healthcare), y visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Los productos de restricción fueron ligados con Ligasa T4 (Promega) según indicaciones del fabricante.

#### 4.2.7.3.2 Transformación y selección de clones positivos *E. coli* TOP10F'.

Se transformaron células de *E. coli* TOP10F' con los plásmidos recombinantes p426:*pg1ΔI* y p416:*pg1ΔI* como se detalló en 4.2.7.1.2 y las colonias obtenidas fueron analizadas por colony PCR<sup>39</sup>

#### 4.2.7.3.3 Comprobación del marco abierto de lectura

Los plásmidos de los clones positivos para colony PCR fueron secuenciados a partir del extremo 5' utilizando el T7 promoter/priming (Automatic Sequencer 3730xl (MACROGEN Corp.)).

#### 4.2.7.3.4 Transformación y selección de clones positivos de *S. cerevisiae* INVSc1

Se electroporaron células electrocompetentes de *S. cerevisiae* INVSc1 con ADNs plasmídicos provenientes de clones de *E. coli*<sup>45</sup>. Las colonias obtenidas fueron analizadas por colony PCR.<sup>46</sup>

#### 4.2.7.3.5 Expresión de *pg1* en p416 y p426

La expresión fue llevada a cabo en dos clones de *S. cerevisiae* INVSc1 según protocolo del fabricante (Invitrogen), pero sin el paso de inducción por galactosa, ya que se trata de plásmidos constitutivos. Se estudio la expresión de la PG1 recombinante durante 40 h tanto en el sobrenadante como en el citoplasma.

### 4.2.8 Medida de Actividad enzimática

La actividad PGasa fue determinada utilizando ácido poligalacturónico (APG), midiendo la liberación de poder reductor siguiendo la técnica de Contreras *et al*<sup>20</sup> con ligeras modificaciones. Para ello se incubaron 180 µl de sustrato (0,5 % de APG en BCP ½), pH 2,5, con 20 µl de muestra enzimática durante 30 min. Luego de la incubación, las muestras fueron enfriadas inmediatamente en baño de agua/hielo y la concentración de azúcares reductores en las mismas fue determinada por Somogyi-Nelson<sup>47</sup> utilizando AGA como patrón.

#### 4.2.8.1 Definición de actividad enzimática

La unidad corresponde a la cantidad de enzima que genera un  $\mu\text{mol}$  de AGA por minuto en las condiciones de reacción establecidas. Todas las actividades se midieron a 37°C.

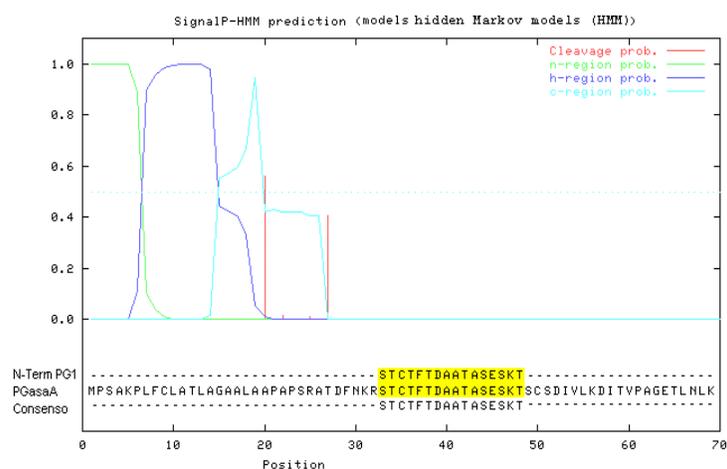
#### 4.2.9 Técnicas Bioquímicas

La cantidad de proteínas fue determinada por el método de Bradford<sup>48</sup>. Los análisis mediante SDS-PAGE fueron llevados a cabo en un equipo Mighty Small II Unit (Hoefer SE 260) de acuerdo a Smith<sup>49</sup> y teñidos con Coomassie Brilliant Blue. El isoelectroenfoque (IEF) fue realizado en una unidad de electroforesis (LKB Bromma 2117 Multiphor II) a una temperatura de 10°C. El gel se preparó con una capa fina de poliacrilamida en el rango de 3-10 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Como buffer catódico se utilizó una solución de ácido sulfúrico (0,1 M) y como buffer anódico una solución de NaOH (0,1 M).

## 4.3 Resultados y discusión

### 4.3.1 Análisis Bioinformático

Al comienzo del trabajo sobre la expresión recombinante de PGI sólo se contaba con la información de la secuencia N-terminal de la proteína nativa y algunas propiedades bioquímicas de la misma. Existen al menos dos caminos a seguir a fin de poder clonar el gen que codifica para la proteína de interés. En primer lugar, se puede realizar una RT-PCR a partir del mRNA maduro con un primer oligo dT y luego, a partir de la secuencia N-terminal, se sintetiza un primer específico y se amplifica el gen de la enzima. Otra alternativa es buscar en bases de datos secuencias análogas a la de la proteína en cuestión. En nuestro caso se utilizó la segunda opción. Al momento de la realización de este trabajo existían dos reportes de PGasas ácidas de *A. kawachii*, el de Contreras y *et al*<sup>0</sup> (origen de nuestro trabajo) y el de Kojima y col.<sup>37</sup> donde se reportan PGasas que no poseen analogía con PGI ni en secuencia aminoacídica ni en propiedades bioquímicas. Se realizó una búsqueda bioinformática utilizando el programa **blastn** en base a la secuencia FASTA N-terminal de PG1 (STCTFTDAATASESK) y se encontró que la secuencia analizada se corresponde con el gen *pgaA* de *A. kawachii* reportado por Mikami y Fukuda (AB080269) en 2002, pero no publicada en bibliografía. Se analizó la secuencia del gen y se encontró que la misma posee una secuencia de bases que incluye una serie de nucleótidos con características de secuencia líder, seguido de una secuencia que codifica para una secuencia aminoacídica coincidente con la reportada para la PG1 (Figura 4.4).



**Figura 4.4:** Análisis bioinformático del N-terminal de la PGaA

No existen datos bibliográficos sobre la expresión y propiedades de una proteína codificada por el gen *pgaA*, por lo que se determinaron sus propiedades teóricas y se las comparó con las reportadas por Contreras *et al*<sup>38</sup> para PG1. Los resultados se indican en la Tabla 4.3.

Dado el grado de similitud entre las propiedades calculadas y las reportadas para PG1, se supuso que podría tratarse de la misma enzima. Por ello, se utilizó la secuencia de *pgaA* para diseñar los primers necesarios para el clonado del gen de PG1.

**Tabla 4.3** Análisis bioinformático de propiedades fisicoquímicas de dos PGasas

Análisis	<i>pgaA</i> <sup>*</sup>	PG1 <sup>38</sup>
Longitud	370 aa	-
Peso Molecular	38.716 Da	60.000 Da
Punto Isoeléctrico	3,99	3,5-3,6
Glicosilación	Si	Si
Secuencia 5´	MPSAKPLFCLATLAGAALAAP APSRATDFNKRSTCTFTDAATASESKTSC	STCTFTDAATASESK

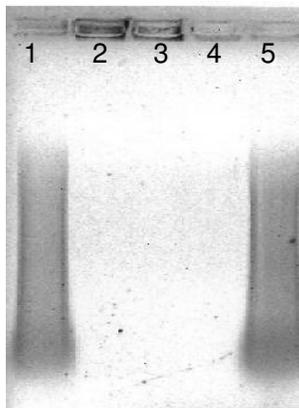
<sup>\*</sup>Los valores de *pgaA* fueron estimados con Vector NTI (Invitrogen @)

Cabe destacar la diferencia de tamaños de ambas proteínas. Sin embargo, esta diferencia puede obviarse ya que la misma se debe a la glicosilación de PG1 reportada por Contreras *et al*<sup>38</sup>. La secuencia reportada posee un intrón de 52 bases que, si no es eliminado durante la maduración del mRNA, produce un corrimiento del marco de lectura generando un codón de terminación dentro del gen. A pesar de este dato se decidió trabajar a partir del ADN genómico de *A. kawachii* a fin de obtener el gen con el intrón. Existen al menos dos hipótesis para trabajar con este gen, la más sencilla es asumir que la levadura pueda, durante la expresión del gen y debido a su proximidad filogenética con los hongos filamentosos, procesar correctamente el transcripto primario, realizar el splicing correspondiente y utilizar la secuencia líder del gen para exportar la proteína en cuestión. Si esto ocurriera, debiera ocurrir la traducción y exportación de la enzima activa. Ahora bien, si esta estrategia no generara un

producto activo, ni extra ni intracelular, puede que la levadura no pueda realizar el splicing, con lo que la traducción se detiene antes de que se obtenga el producto activo. En este segundo caso, debería extraerse el intrón por medio de PCR con primers internos<sup>50</sup>. Si se encontrara actividad intracelular es dable suponer que la secuencia líder no permitiría la exportación del producto de la traducción al exterior celular. En este caso, ya que *S. cerevisiae* INVSC1 no exporta los productos inducidos, debe agregarse una secuencia líder heteróloga si se deseara que el producto de la inducción se exporte al medio de cultivo. La estrategia de clonado llevada a cabo siguió el orden que se detalla a continuación.

#### 4.3.2 Estrategia de clonado de *pg1* con intrón en pYES2

A partir de la extracción de ADN total de *A. kawachii* (Figura 4.5) se amplificó el gen de *pg1* empleando las condiciones de reacción indicadas en Materiales y Métodos.



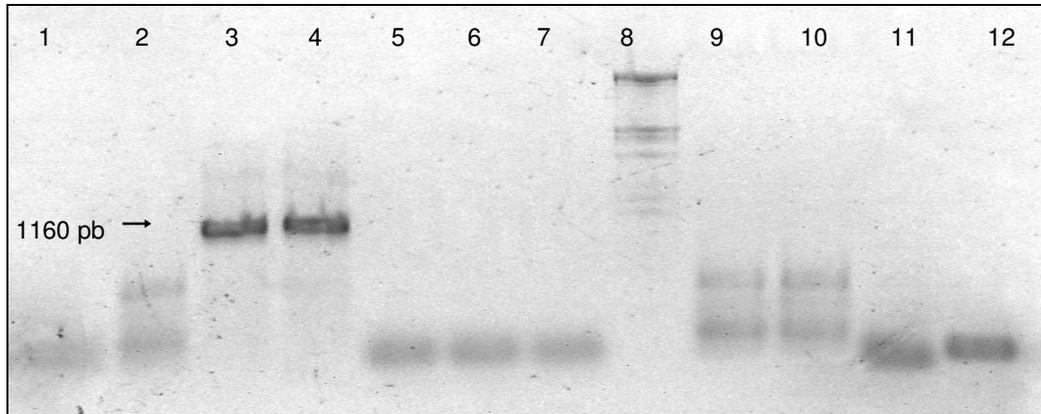
**Figura 4.5:** Electroforesis en gel de agarosa (1 %) del ADN total extraído de *A. kawachii*.

Tal como se indicó anteriormente, el diseño de los primers empleados estuvo basado en la secuencia de *pgaA*. La idea de esta estrategia de clonado se basaba principalmente en poder amplificar el gen *pg1* con el marco de lectura abierto correcto y en la suposición que *S. cerevisiae* sería capaz de realizar el splicing del intrón. La Figura 4.6 corresponde a la electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *pg1*.



**Figura 4.6:** Electroforesis en gel de agarosa (1 %) del gen *pg1* obtenido mediante PCR desde ADN genómico de *A. kawachii*. Calle 1: Producto de PCR (*pg1*). Calle 2: Marcador de peso molecular de 400 pb. Productos PBL®. (402; 841; 1193; 1632; 2040; 2430, 2838; 3215/3233; 3560).

Tal como se ve en la Figura 4.6, se obtuvo un fragmento del tamaño correspondiente a *pg1* por medio de esta estrategia. Dicho fragmento fue digerido con BamH1 y EcoR1, clonado orientado en el vector pYES2, y transformado en *E. coli* TOP10F'. A los efectos de realizar un screening sobre los clones obtenidos, se efectuó una colony PCR a partir de los mismos. La Figura 4.7 muestra el gel de agarosa obtenido en la electroforesis con los resultados de este ensayo.



**Figura 4.7:** Gel de agarosa (1 %) de la electroforesis de la Colony PCR de *E. coli* para verificar la presencia del gen *pg1*. Calle 1: clon 9. Calle 2: clon 10. Calle 3: clon 11. Calle 4: clon 12. Calle 5: clon 13. Calle 6: clon 14. Calle 7: clon 15. Calle 8: Marcador de Peso Molecular  $\lambda$  EcoRI/HindIII (Promega, cat. # G1731). Calle 9: clon 16. Calle 10: clon 17. Calle 11: clon 18.

Teniendo en cuenta el tamaño de los productos obtenidos, fueron seleccionados 2 clones (G11 y G12) los cuales se sometieron a secuenciación para determinar si presentaban el correcto marco de lectura abierto.

En la Figura 4.8 puede observarse el alineamiento de la secuencia de los clones G11 y G12 frente a la secuencia de *pgaA*. Las secuencias del gen clonado amplificado en base a la secuencia N-terminal de PG1 coincide base por base con la secuencia de *pgaA*.



Clon 11	GCCACCGACTTCAACAAGCGGTCCACCTGCACCTTCACTGATGCTGCCAC
Clon 12	GCCACCGACTTCAACAAGCGGTCCACCTGCACCTTCACTGATGCTGCCAC
<i>pgaA</i>	GCCACCGACTTCAACAAGCGGTCCACCTGCACCTTCACTGATGCTGCCAC
	126 <span style="float: right;">175</span>
Clon 11	CGCTCCGAGAGCAAGACCTCCTGCTCCGACATCGTCTCAAGGACATCA
Clon 12	CGCTCCGAGAGCAAGACCTCCTGCTCCGACATCGTCTCAAGGACATCA
<i>pgaA</i>	CGCTCCGAGAGCAAGACCTCCTGCTCCGACATCGTCTCAAGGACATCA
	201 <span style="float: right;">250</span>
Clon 11	CCGTCCCTGCCGGTGAGACCCCTTAACCTGAAGGACCTCAACGATGGCACC
Clon 12	CCGTCCCTGCCGGTGAGACCCCTTAACCTGAAGGACCTCAACGATGGCACC
<i>pgaA</i>	CCGTCCCTGCCGGTGAGACCCCTTAACCTGAAGGACCTCAACGATGGCACC
	251 <span style="float: right;">300</span>
Clon 11	ACCGTAAGCCTCTCCCGGCCCTAGCGTCAGCCCCGTTCTAACGACTCCAG
Clon 12	ACCGTAAGCCTCTCCCGGCCCTAGCGTCAGCCCCGTTCTAACGACTCCAG
<i>pgaA</i>	ACCGTAAGCCTCTCCCGGCCCTAGCGTCAGCCCCGTTCTAACGACTCCAG
	301 <span style="float: right;">350</span>
Clon 11	GTCACCTTTGAGGGAACCACCACCTGGGAGTACGAGGAGTGGGACGGACC
Clon 12	GTCACCTTTGAGGGAACCACCACCTGGGAGTACGAGGAGTGGGACGGACC
<i>pgaA</i>	GTCACCTTTGAGGGAACCACCACCTGGGAGTACGAGGAGTGGGACGGACC
	351 <span style="float: right;">400</span>
Clon 11	CCTCCTCCGTATCTCCGGTAAGGACATCACCGTTACCCAGTCCTCCGACG
Clon 12	CCTCCTCCGTATCTCCGGTAAGGACATCACCGTTACCCAGTCCTCCGACG
<i>pgaA</i>	CCTCCTCCGTATCTCCGGTAAGGACATCACCGTTACCCAGTCCTCCGACG
	401 <span style="float: right;">450</span>
Clon 11	CCGTCTCAACGGCAACGGTGCTAAGTGGTGGGACGGTGAGGGAACCAAC
Clon 12	CCGTCTCAACGGCAACGGTGCTAAGTGGTGGGACGGTGAGGGAACCAAC
<i>pgaA</i>	CCGTCTCAACGGCAACGGTGCTAAGTGGTGGGACGGTGAGGGAACCAAC
	451 <span style="float: right;">500</span>
Clon 11	GGCGGCAAGACCAAGCCCAAGTTCTTCTACGCCATGACCTCGATGACTC
Clon 12	GGCGGCAAGACCAAGCCCAAGTTCTTCTACGCCATGACCTCGATGACTC
<i>pgaA</i>	GGCGGCAAGACCAAGCCCAAGTTCTTCTACGCCATGACCTCGATGACTC
	501 <span style="float: right;">550</span>
Clon 11	CAAGATCTCCGGTCTCTACATCAAGAACACCCCTGTCCAGGCCATCTCCG
Clon 12	CAAGATCTCCGGTCTCTACATCAAGAACACCCCTGTCCAGGCCATCTCCG
<i>pgaA</i>	CAAGATCTCCGGTCTCTACATCAAGAACACCCCTGTCCAGGCCATCTCCG
	551 <span style="float: right;">600</span>
Clon 11	TCGAGTCGGACAACCTCGTGATCGAGGACGTCACCATCGACAACAGCGAC
Clon 12	TCGAGTCGGACAACCTCGTGATCGAGGACGTCACCATCGACAACAGCGAC
<i>pgaA</i>	TCGAGTCGGACAACCTCGTGATCGAGGACGTCACCATCGACAACAGCGAC
	601 <span style="float: right;">650</span>

Clon 11	GGTGATTCCGAGGGCGGCCACAACACCGACGGTTTCGACATCAGCGAGAG
Clon 12	GGTGATTCCGAGGGCGGCCACAACACCGACGGTTTCGACATCAGCGAGAG
<i>pgaA</i>	GGTGATTCCGAGGGCGGCCACAACACCGACGGTTTCGACATCAGCGAGAG
	651 <span style="float: right;">700</span>
Clon 11	TACCTACATCACCATCACCGGCGCCACCGTCAAGAACCAGGACGACTGCG
Clon 12	TACCTACATCACCATCACCGGCGCCACCGTCAAGAACCAGGACGACTGCG
<i>pgaA</i>	TACCTACATCACCATCACCGGCGCCACCGTCAAGAACCAGGACGACTGCG
	701 <span style="float: right;">750</span>
Clon 11	TCGCCATCAACTCCGGCGAGAACATCTACTTCTCCGGCGGTACCTGCTCC
Clon 12	TCGCCATCAACTCCGGCGAGAACATCTACTTCTCCGGCGGTACCTGCTCC
<i>pgaA</i>	TCGCCATCAACTCCGGCGAGAACATCTACTTCTCCGGCGGTACCTGCTCC
	751 <span style="float: right;">800</span>
Clon 11	GGCGGTCACGGTCTGTCCATCGGCTCCGTTGGTGGCCGCG-ACGACNACA
Clon 12	GGCGGTCACGGTCTGTCCATCGGCTCCGTTGGTGGCCGCGNACGACA-CA
<i>pgaA</i>	GGCGGTCACGGTCTGTCCATCGGCTCCGTTGGTGGCCGCG-ACGACAACA
	851 <span style="float: right;">900</span>
Clon 11	CCGTCNAGAACGT ACCTTCATCGACTCGACTGTTTCTGACTCCGAGAAC
Clon 12	CCGTCAGAACGTCCCCTTCATCGACTCGACTGTTCTGACTCCGAGAAC
<i>pgaA</i>	CCGTCAGAACGTACCTTCATCGACTCGACTGTTCTGACTCCGAGAAC

**Figura 4.8:** Alineamiento de las secuencias del gen *pg1* obtenido a partir de los clones de *E. coli* G11 y G12 y de la secuencia de *pgaA*. El alineamiento se realizó a partir del extremo 5' utilizando el T7 promotor/priming (Automatic Sequencer 3730xl (MACROGEN Corp.)).

Estos resultados confirman la suposición que ambas proteínas (PG1 y PGaA) están codificadas por el mismo gen, o bien son las mismas proteínas reportadas con nombre distinto tanto por Contreras *et al.* como por Mikami. A los efectos del presente trabajo, esto implica una cuestión semántica, ya que las características bioquímicas de la proteína recombinante serán corroboradas y se evaluará su potencial de aplicación en procesos biotecnológicos.

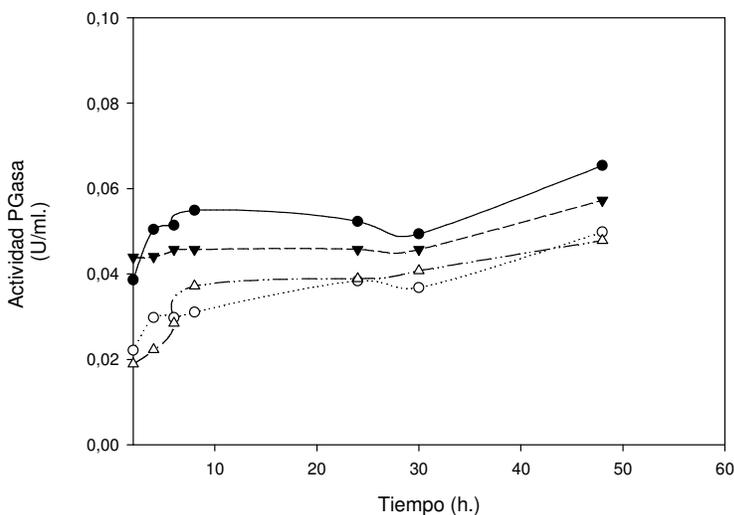
El plásmido pYES2:*pg1* obtenido a partir del clon G11 fue purificado y utilizado para transformar la levadura *S. cerevisiae* INVSc1. Con las colonias de levadura que resultaron positivas por colony PCR se realizaron cultivos en erlenmeyer según el protocolo del fabricante y se indujo la expresión de la enzima en cultivos tipo batch en medio sintético. En primera instancia los estudios de expresión de la enzima fueron realizados a escala de erlenmeyers agitados, siguiendo las indicaciones del fabricante. La estrategia utilizada fue la siguiente: Se sembraron los clones a ensayar en sendos frascos erlenmeyer conteniendo 100 ml de SC-URA con rafinosa como FCE y urea como FN. Una vez agotada la FCE se indujo la expresión del gen agregando galactosa

(como inductor) y más refinosa (como FCE extra). La producción de la enzima fue evaluada midiendo actividad enzimática del sobrenadante y del interior las células de los cultivos realizados. Estos cultivos se realizaron utilizando dos clones (clon 1 y clon 3) empleando como controles un clon de *S. cerevisiae* con el plásmido pYES2 sin el inserto *pg1* y por otro lado, el mismo clon conteniendo el plásmido con el inserto pero sin la inducción por galactosa.

Los resultados obtenidos se detallan en la Figura 4.9. Tal como puede observarse, la producción de enzima es prácticamente nula y no puede diferenciarse significativamente de los controles. Los pequeños valores observados pueden deberse a artefactos de la técnica de medida empleada.

La determinación de actividad enzimática también fue evaluada en el citoplasma siguiendo las indicaciones del fabricante, encontrando resultados similares a los del espacio extracelular (ausencia de PGasa activa).

Estos resultados indican, en principio, que la levadura no fue capaz de realizar el splicing del intrón. Aun no puede determinarse si el péptido señal es correctamente reconocido por *S. cerevisiae*.



**Figura 4.9:** Actividad PGasa inducida en *S. cerevisiae* INVSc1 transformada con el pYES2:*pg1*. Resultados obtenidos cuando el gen fue clonado con el intrón.  
 ● Clon 1. ○ Clon 3. ▼ Control sin inserto. △ Control sin inducir.

#### 4.3.3 Estrategia de clonado de *pg1* sin intrón en pYES2

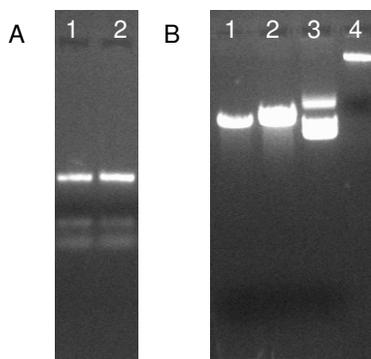
La mayoría de los genomas de eucariotas parecen muy ineficientes cuando se los compara con aquellos de los procariontes donde casi todas las secuencias contribuyen a la expresión de genes<sup>51</sup>. Contrariamente a la situación en bacterias, la mayoría de los genes eucariotas consisten en pequeñas islas de regiones codificantes para proteínas (exones) en un mar de secuencias no codificantes (intrones). Estos intrones

deben ser removidos a través del splicing para generar el mRNA maduro que lleva la información necesaria para la síntesis de proteínas. El número, tamaño y abundancia de los intrones varía ampliamente entre los organismos. Las secuencias de intrones constituyen un 24 % de los genomas de mamíferos y más del 95 % de la secuencia de los genes humanos<sup>52</sup>. Los genes humanos generalmente contienen múltiples y grandes intrones con tamaños superiores a 10.000 nucleótidos y la mayoría son sometidos a splicing alternativos produciendo diferentes transcritos a partir de un único gen<sup>53, 54</sup>. Por el contrario, el genoma de *S. cerevisiae* contiene sólo 296 intrones en 283 genes, constituyendo sólo el 5 % de los genes de levaduras<sup>55-60</sup>. Existen algunos pocos ejemplos de splicing alternativo en levaduras, y el rol biológico de los intrones en estos microorganismos aún no está claro. Varias hipótesis se han desarrollado para explicar la simplicidad y rareza del splicing en levaduras. Una hipótesis propone que los intrones en levaduras han aparecido recientemente en los tiempos evolutivos y que su función completa no ha tenido suficiente tiempo para evolucionar (intrón-in model). Otra, y más firme, hipótesis sugiere que los intrones están siendo eliminados del genoma de las levaduras (intrón-out model)<sup>61, 62</sup>. Recientes análisis acerca de los mecanismos de splicing sugirieron que los intrones de levaduras podrían mejorar y regular la expresión génica, incrementando el debate acerca de la función de los intrones en levaduras y el valor fundamental de estos mecanismos en eucariotas<sup>60</sup>.

Mientras que la determinación de la estructura génica en *S. cerevisiae* ha progresado debido a su alta densidad génica y a la baja frecuencia de intrones, la identificación de genes dentro de las secuencias genómicas de otros hongos ha resultado mucho más complicada. En el caso de estos últimos, la frecuencia de intrones es considerablemente mayor y los sitios de splicing parecen ser secuencias consenso de eucariotas. Tal como fue indicado más arriba, la idea de la primer estrategia se basaba principalmente en poder clonar el gen de *pg1* con el marco de lectura abierto correcto y en la suposición que *S. cerevisiae* sería capaz de realizar el splicing del intrón. Sin embargo, y tal como pudo observarse en el estudio de la producción de PG1 por parte de *S. cerevisiae*, esto no fue posible. El hecho es que los resultados obtenidos por esta estrategia indican que el intrón presente en *pg1* no pudo ser eliminado por *S. cerevisiae*, por lo que fue necesario recurrir a la segunda estrategia para poder eliminarlo *in vitro*.

#### 4.3.3.1 Estrategia de clonado de *pg1* sin intrón en *pYES2*

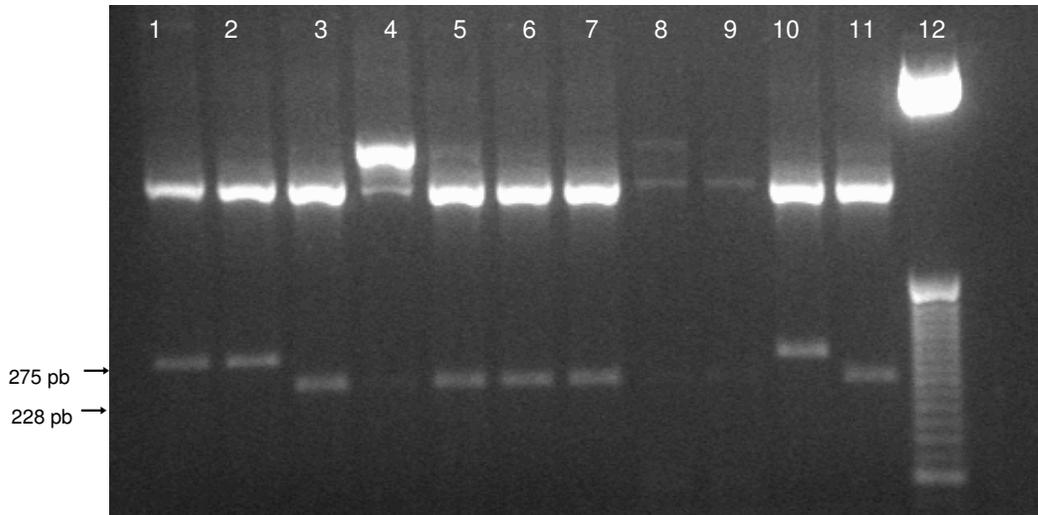
En esta segunda hipótesis de trabajo se decidió extraer el intrón *in-vitro*. Tal como fue indicado en Materiales y métodos, la obtención del gen *pg1* sin intrón fue llevada a cabo por medio de la generación del primer exón por un lado y del segundo exón unido al plásmido por otro. A partir del plásmido recombinante *pYES2:pg1*, por medio de PCR, se amplificó la región codificante para el primer exón a la que se le añadió un fragmento en el extremo 3' conteniendo el sitio de corte de Pf1M1 (correspondiente al segundo exón; Figura 4.10 A). Paralelamente, se digirió al plásmido *pYES2:pg1* con BamH1 y Pf1M1 a fin de liberar el primer exón junto con el intrón y parte del segundo exón (Figura 4.10 B). Ambos fragmentos (el primer exón y el plásmido unido al segundo exón, sin el intrón) fueron ligados, obteniéndose la construcción *pYES2:pg1ΔI*.



**Figura 4.10:** Electroforesis en gel de agarosa de la estrategia de clonado de *pg1* sin intrón. A: fragmento de 228 pb (Exón 1) obtenido por PCR (gel 3 % de agarosa). B: plásmido digerido (gel 1 % de agarosa). Calle 1: plásmido digerido con BamH1. Calle 2: plásmido digerido con PF1M1. Calle 3: plásmido digerido con BamH1 y PF1M1. Calle 4: Plásmido sin digerir.

Una vez obtenida la construcción, la misma fue transformada en *E. coli* TOP10', a los efectos de amplificar la misma. Como primer paso de control de la delección del intrón algunas colonias resistentes a ampicilina fueron seleccionadas y los plásmidos de las mismas fueron extraídos por miniprep, purificados y utilizados como molde de PCR utilizando los primers PG1fw y PG1rv. El amplicón obtenido (teóricamente el gen completo sin el intrón) fue digerido con la enzima PF1M1. Si la delección hubiera ocurrido, se esperaría obtener un fragmento de 228 pb. En caso contrario debiera observarse un fragmento de 275 pb (suma del primer exón y el intrón). Los productos

de la digestión se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 3 %. La Figura 4.11 muestra los resultados obtenidos en este ensayo.



**Figura 4.11:** Electroforesis en gel de agarosa (3 %) de los productos de la digestión con Pf1M1 del gen *pg1* (obtenido de la PCR a partir de PYES2:*pg1*Δ o PYES2:*pg1*) para comprobar la eliminación del intrón de *pg1*. Calle 1: producto de restricción del gen *pg1* completo. Calles 2-11: Producto de restricción de los plásmidos obtenidos de los clones de *E. coli* Top10 transformadas con PYES:*pg1*Δ. Calle 12: Marcador de peso molecular de 25 pb ADN (Invitrogen)

Tal como puede observarse en la Figura 4.11, fue posible obtener 5 clones positivos a partir de los analizados (que contenían el fragmento del tamaño adecuado luego de la digestión con PF1M1). Como segunda instancia de control, los plásmidos, conteniendo el gen *pg1*, de los clones positivos fueron secuenciados. La Figura 4.12 detalla el alineamiento de dos de estas secuenciaciones (las otras no se muestran pero presentaron el mismo resultado). Puede observarse que el intrón fue removido del gen y que dicho proceso no produjo alteraciones del marco de lectura abierto en las construcciones generadas.

```

                                     10      20
                                     *      *
pgA A. kawac -----atgccttctgccagccttgttctgcc
pg1SI clon2  nnnnntaatggcgagctcgatcatgccttctgccagccttgttctgcc
pg1SI clon3  nnnnntaatggcgagctcgatcatgccttctgccagccttgttctgcc

                                     30      40      50      60      70
                                     *      *      *      *      *
pgA A. kawac tgcgcaccctggccggtgccgctctggctgctcctgcgcccttcccgcgcc
pg1SI clon2  tgcgcaccctggccggtgccgctctggctgctcctgcgcccttcccgcgcc
pg1SI clon3  tgcgcaccctggccggtgccgctctggctgctcctgcgcccttcccgcgcc
    
```

	80	90	100	110	120
	*	*	*	*	*
pgA A. kawac	accgacttcaacaagcgggtccacctgcaccttcaactgatgctgccaccgc				
pg1SI clon2	accgacttcaacaagcgggtccacctgcaccttcaactgatgctgccaccgc				
pg1SI clon3	accgacttcaacaagcgggtccacctgcaccttcaactgatgctgccaccgc				
	130	140	150	160	170
	*	*	*	*	*
pgA A. kawac	ctccgagagcaagacctcctgctccgacatcgtcctcaaggacatcaccg				
pg1SI clon2	ctccgagagcaagacctcctgctccgacatcgtcctcaaggacatcaccg				
pg1SI clon3	ctccgagagcaagacctcctgctccgacatcgtcctcaaggacatcaccg				
	180	190	200	210	220
	*	*	*	*	*
pgA A. kawac	tccttgcgggtgagacccttaacttgaaggacctcaacgatggcaccacc				
pg1SI clon2	tccttgcgggtgagacccttaacttgaaggacctcaacgatggcaccacc				
pg1SI clon3	tccttgcgggtgagacccttaacttgaaggacctcaacgatggcaccacc				
	230	240	250	260	270
	*	*	*	*	*
pgA A. kawac	gtaagcctctcccggcctagcgtcagccccgttctaacgactccaggtc				
pg1SI clon2	-----gtc				
pg1SI clon3	-----gtc				
	280	290	300	310	320
	*	*	*	*	*
pgA A. kawac	acctttgagggaaaccaccacctgggagtagcaggagtgggacggaccct				
pg1SI clon2	acctttgagggaaaccaccacctgggagtagcaggagtgggacggaccct				
pg1SI clon3	acctttgagggaaaccaccacctgggagtagcaggagtgggacggaccct				
	330	340	350	360	370
	*	*	*	*	*
pgA A. kawac	cctccgatctccggtaaggacatcaccgttaccagtcctccgacgccg				
pg1SI clon2	cctccgatctccggtaaggacatcaccgttaccagtcctccgacgccg				
pg1SI clon3	cctccgatctccggtaaggacatcaccgttaccagtcctccgacgccg				
	380	390	400	410	420
	*	*	*	*	*
pgA A. kawac	tcctcaacggcaacgggtgctaagtgggtgggacgggtgagggaaaccaacggc				
pg1SI clon2	tcctcaacggcaacgggtgctaagtgggtgggacgggtgagggaaaccaacggc				
pg1SI clon3	tcctcaacggcaacgggtgctaagtgggtgggacgggtgagggaaaccaacggc				
	430	440	450	460	470
	*	*	*	*	*
pgA A. kawac	ggcaagaccaagcccagttcttctacgcccatgacctcgatgactccaa				
pg1SI clon2	ggcaagaccaagcccagttcttctacgcccatgacctcgatgactccaa				
pg1SI clon3	ggcaagaccaagcccagttcttctacgcccatgacctcgatgactccaa				
	480	490	500	510	520
	*	*	*	*	*
pgA A. kawac	gatctccgggtctctacatcaagaacaccctgtccaggccatctccgtcg				
pg1SI clon2	gatctccgggtctctacatcaagaacaccctgtccaggccatctccgtcg				
pg1SI clon3	gatctccgggtctctacatcaagaacaccctgtccaggccatctccgtcg				
	530	540	550	560	570
	*	*	*	*	*
pgA A. kawac	agtccgacaacctcgtgatcgaggacgtcaccatcgacaacagcgacgg				
pg1SI clon2	agtccgacaacctcgtgatcgaggacgtcaccatcgacaacagcgacgg				
pg1SI clon3	agtccgacaacctcgtgatcgaggacgtcaccatcgacaacagcgacgg				

	580	590	600	610	620
	*	*	*	*	*
pgA <i>A. kawac</i>	gattccgagggcggccacaacaccgacggtttcgacatcagcgagagtac				
pg1SI clon2	gattccgagggcggccacaacaccgacggtttcgacatcagcgagagtac				
pg1SI clon3	gattccgagggcggccacaacaccgacggtttcgacatcagcgagagtac				
	630	640	650	660	670
	*	*	*	*	*
pgA <i>A. kawac</i>	ctacatcaccatcaccggcgccaccgtcaagaaccaggacgactgcgtcg				
pg1SI clon2	ctacatcaccatcaccggcgccaccgtcaagaaccaggacgactgcgtcg				
pg1SI clon3	ctacatcaccatcaccggcgccaccgtcaagaaccaggacgactgcgtcg				
	660	670	680	690	700
	*	*	*	*	*
pgA <i>A. kawac</i>	accgtcaagaaccaggacgactgcgtcgccatcaactccggcgagaacat				
pg1SI clon2	accgtcaagaaccaggacgactgcgtcgccatcaactccggcgagaacat				
pg1SI clon3	accgtcaagaaccaggacgactgcgtcgccatcaactccggcgagaacat				
	710	720	730	740	750
	*	*	*	*	*
pgA <i>A. kawac</i>	ctacttctccggcggtacctgctccggcggtcacggctctgtccatcggt				
pg1SI clon2	ctacttctccggcggtacctgctccggcggtcacggctctgtccatcggt				
pg1SI clon3	ctacttctccggcggtacctgctccggcggtcacggctctgtccatcggt				
	760	770	780	790	800
	*	*	*	*	*
pgA <i>A. kawac</i>	ccggttgggtggccgacgacgacaacaccgtcaagaacgtcaccttcatcgac				
pg1SI clon2	ccggttgggtggccgacgacgacaacaccgtcaagaacgtcaccttcatcgac				
pg1SI clon3	ccggttgggtggccgacgacgacaacaccgtcaagaacgtcaccttcatcgac				
	810	820	830	840	850
	*	*	*	*	*
pgA <i>A. kawac</i>	tcgactgtctctgactccgagaacggtgttcgcatcaagaccggtttatga				
pg1SI clon2	tcgactgtctctgactccgagaacggtgttcgcatcaagaccggtttatga				
pg1SI clon3	tcgactgtctctgactccgagaacggtgttcgcatcaagaccggtttatga				
	860	870	880	890	900
	*	*	*	*	*
pgA <i>A. kawac</i>	tgctaccggtaccgtcgaggacatcacctactccaacatccagctctccg				
pg1SI clon2	tgctaccggtaccgtcgaggacatcacctactccaacatccagctctccg				
pg1SI clon3	tgctaccggtaccgtcgaggacatcacctactccaacatccagctctccg				
	910	920	930	940	950
	*	*	*	*	*
pgA <i>A. kawac</i>	gcatctccgactacgggtattgtcatcgagcaggactacgagaacgggtgac				
pg1SI clon2	gcatctccgactacgggtattgtcatcgagcaggactacgagaacgggtgac				
pg1SI clon3	gcatctccgactacgggtattgtcatcgagcaggactacgagaacgggtgac				
	960	970	980	990	1000
	*	*	*	*	*
pgA <i>A. kawac</i>	cctaccggtaccccctccaacgggtgttaccatctccgatgttaccctcga				
pg1SI clon2	cctaccggtaccccctccaacgggtgttaccatctccgatgttaccctcga				
pg1SI clon3	cctaccggtaccccctccaacgggtgttaccatctccgatgttaccctcga				
	1010	1020	1030	1040	1050
	*	*	*	*	*
pgA <i>A. kawac</i>	ggatatcactggctcgggttgactccgacgctggtgagatctacatccttt				
pg1SI clon2	ggatatcactggctcgggttgactccgacgctggtgagatctacatccttt				
pg1SI clon3	ggatatcactggctcgggttgactccgacgctggtgagatctacatccttt				

```

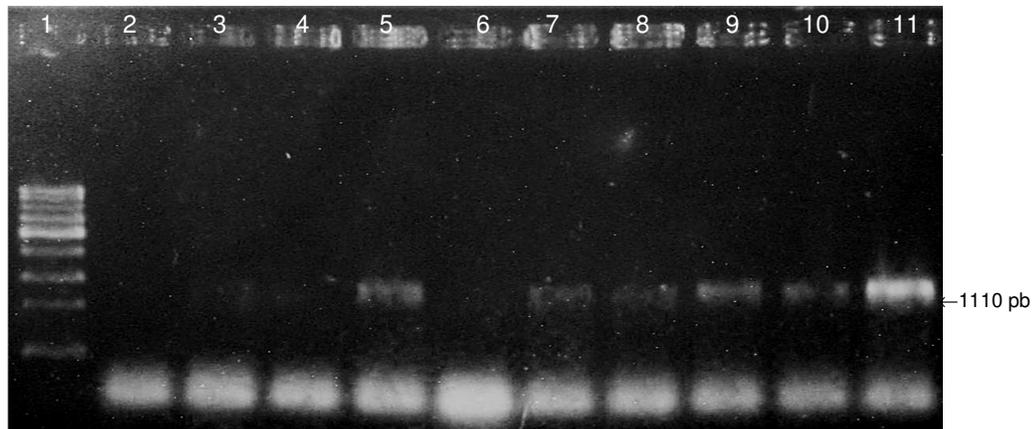
                1060      1070      1080      1090      1100
                *        *        *        *        *
pgA A. kawac  gcggtgacggcagctgcaactgactggaccatgtccggcattgacatcacc
pg1SI clon2   gcggtgacggcagctgcaactgactggaccatgtccggcattgacatcacc
pg1SI clon3   gcggtgacggcagctgcaactgactggaccatgtccggcattgacatcacc

                1110      1120      1130      1140      1150
                *        *        *        *        *
pgA A. kawac  ggcggtgagaccagcagcgattgcgagaatgttcctctggcgcttctctg
pg1SI clon2   ggcggtgagaccagcagcgattgcgagaatgttcctctggcgcttctctg
pg1SI clon3   ggcggtgagaccagcagcgattgcgagaatgttcctctggcgcttctctg

                1160
                *
pgA A. kawac  cagtcagtaa-----
pg1SI clon2   cagtcagtaagaattctgcagatatccatcacactggcggccgctcgagc
pg1SI clon3   cagtcagtaagaattctgcagatatccatcacactggcggccgctcgagc
    
```

**Figura 4.12:** Alineamiento de las secuencias de los genes *pg1ΔI* obtenidas a partir de los plásmidos provenientes de los clones positivos de *E. coli* TOP10' (con el gen *pg1* y sin el intrón) y *pgaA* de *A. kawachii*. Las regiones coloreadas corresponden a los sitios de match, mientras que la línea de puntos indica los mismatch. En la región de las bases 229 a 275 se observa la correcta delección del intrón por medio de la estrategia propuesta.

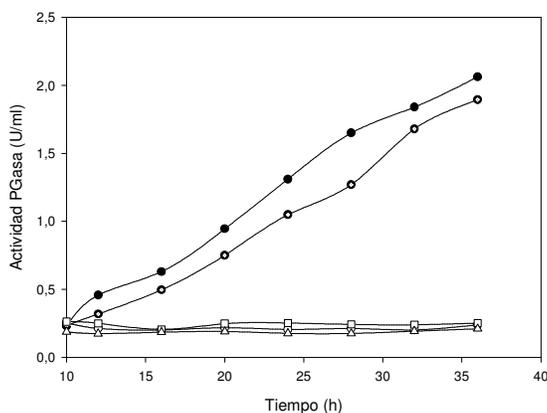
Los plásmidos conteniendo el gen *pg1* sin el intrón fueron purificados nuevamente de *E. coli* y utilizados para transformar células competentes de *S. cerevisiae* INVSc1 por electroporación<sup>45</sup>. Las levaduras fueron sembradas en medio sintético sin uracilo (SC-URA).



**Figura 4.13:** Electroforesis en gel de agarosa (1 %) de los productos de la amplificación del gen *pg1ΔI* a partir de las Colony PCR de *S. cerevisiae*. Calle 1: Marcador de peso molecular de 400 pb. Productos PBL®. Calle 2: Control negativo de PCR. Calle 3-10: Clones 1-8 de *S. cerevisiae*. Calle 11: Control positivo de PCR (gen *pg1* purificado como molde).

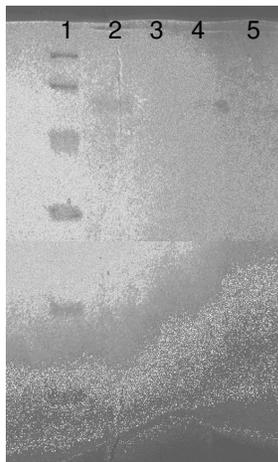
A partir de algunas de las colonias obtenidas se realizó un screening por colony PCR y se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 4.13. Tal como puede observarse, fue posible obtener al menos 5 clones de *S. cerevisiae* conteniendo la construcción pYES2:*pg1* $\Delta$ I.

Una vez concluido el clonado del gen *pg1* en pYES2 y obtenidas las levaduras recombinantes transformadas con pYES2:*pg1* $\Delta$ I, se procedió a estudiar la expresión del mismo en cultivos tipo batch en medio sintético. En primera instancia los estudios de expresión de la enzima fueron realizados a escala de erlenmeyers agitados, siguiendo las indicaciones del fabricante con algunas modificaciones. La estrategia utilizada fue la siguiente: Se sembraron los clones a ensayar en sendos frascos erlenmeyer conteniendo 100 ml de SC-URA con rafinosa como FCE y urea como FN. Una vez agotada la FCE se indujo la expresión del gen agregando galactosa (como inductor) y más rafinosa (como FCE extra). La rafinosa es un trisacárido que posee la particularidad de ser utilizado por *S. cerevisiae* como FCE sin ejercer represión sobre la expresión de los genes regulados por Gal1 o Gal10. Como controles negativos de la expresión se utilizaron los mismos clones sin el agregado de galactosa (para verificar la ausencia de expresión constitutiva de las construcciones) y un clon que posee el pYES2 sin inserto, que fue inducido con galactosa (para verificar la ausencia de actividad PGasa de *S. cerevisiae* INVSC1). Inicialmente se seleccionaron dos de los clones para realizar las pruebas de inducción. Tal como se observa en la Figura 4.14, los dos clones inducidos producen alrededor de 2,0 U/ml de la enzima a las 36 h de cultivo. Cabe destacar que los controles empleados no mostraron actividad PG1, y el poder reductor que se observa se debe a componentes reductores del medio de cultivo, manteniéndose constante en el tiempo.



**Figura 4.14:** Cinética de la expresión de la actividad PG1 producida por *S. cerevisiae* recombinante en cultivos en batch a escala de erlenmeyer en medio SC-URA inducido con galactosa. ● Clon 1 (inducido). ■ Clon 2 (Inducido). ○ Clon 1 (no inducido). □ Clon 2 (no inducido). Δ Control negativo (sin el gen *pg1*).

Si bien no es una actividad extremadamente alta por tratarse de un sistema de expresión inducible, en este primer estudio se obtuvo un nivel de enzima más de 70 veces superior al que se obtiene con la cepa silvestre de *A. kawachii*. Estos resultados resultan promisorios e incitan al estudio del mejoramiento de las condiciones de cultivo e inducción. A fin de estudiar si la expresión de la enzima se corresponde con una única proteína expresada por la levadura inducida se realizó un SDS PAGE de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas inducidas y no inducidas.



**Figura 4.15:** SDS-PAGE de la PG1 obtenida en la inducción de los clones 1 y 2. Calle 1: LMWM. Calle 2: PG1 clon 1, 36 h de inducción. Calle 3: clon 1, 36 h de cultivo, sin inducir. Calle 4: PG1, clon 2, 36 h de inducción. Calle 4: clon 2, 36 h de cultivo, sin inducir.

La Figura 4.15 muestra la imagen correspondiente a esa electroforesis, en la que se puede observar que en los cultivos inducidos existe una proteína mayoritaria cuyo PM de 60 kDa se corresponde con la reportada por Contreras *et al*<sup>68</sup> la cual no se observa en los controles negativos. Este resultado permite suponer que el gen clonado corresponde al gen de PG1.

A partir de la construcción pYES2:*pg1*ΔI fue posible obtener la proteína PG1 en el sobrenadante del medio de cultivo, con lo cual se demuestra que si bien *S. cerevisiae* no puede realizar el splicing del intrón del gen fúngico, la secuencia líder del mismo es correctamente procesada, direccionando a la proteína al sistema de exportación de la levadura.

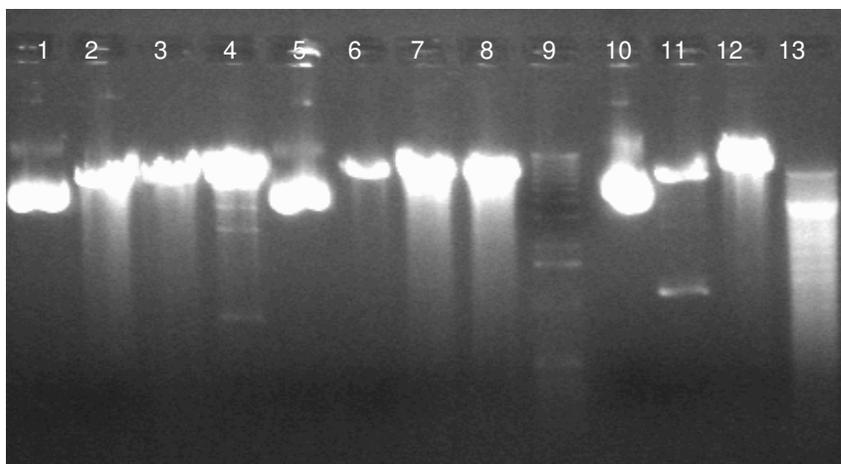
#### 4.3.3.2 Estrategia de clonado de *pg1* en los vectores constitutivos *p416* y *p426*

El plásmido pYES2 es un vector de 5,9 Kb, diseñado para la expresión inducible de proteínas recombinantes en *S. cerevisiae*. Este vector presenta un promotor (*GAL1*) de expresión de genes de proteínas inducible por medio de galactosa y reprimible en presencia de glucosa<sup>42,63</sup>. El mantenimiento de las células en glucosa implica la represión completa de la transcripción del promotor *GAL1*. La transferencia de las

células creciendo en glucosa a un medio con galactosa causa que el promotor se desreprima, permitiendo la inducción de la transcripción.

Como se ha demostrado en la sección anterior, fue posible producir PG1 recombinante utilizando este vector. Sin embargo, el uso de galactosa como inductor implica un incremento substancial en el costo del medio de cultivo para el proceso, ya que este azúcar es muy caro, condicionando la idea de realizar un cambio de escala. Es por esto que se decidió clonar el gen *pg1ΔI* en los vectores de expresión constitutiva en *S. cerevisiae* p416 y p426. Estos vectores tienen la característica común de poseer un promotor constitutivo fuerte (GPD). Dichos vectores se diferencian en el número de copias por célula debido a que estos plásmidos son el resultado de la modificación de los plásmidos centroméricos (en el caso de p416) o bien de 2  $\mu$  (en el de p426) de la serie pRS<sup>44</sup>.

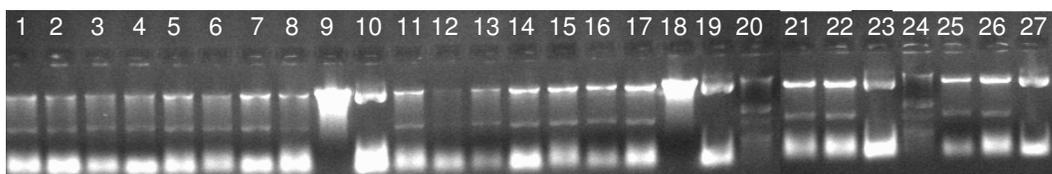
Al analizar los sitios de corte del MCS de los dos plásmidos, se observó que se podría clonar en forma orientada el gen *pg1ΔI* utilizando las mismas enzimas de restricción usadas con el vector pYES2 (BamH1 y EcoR1), por lo que se comenzó digiriendo los plásmidos p416 y p426 y la construcción pYES2:*pg1ΔI* con estas enzimas. La Figura 4.16 corresponde al gel de agarosa de la electroforesis de este procedimiento.



**Figura 4.16:** Electroforesis en gel de agarosa (1 %) de las digestiones con BamH1 y EcoR1 de los plásmidos p416 y p426.

Calle 1: p416 sin digerir. Calle 2: p416 digerido con BamH1 y EcoR1. Calle 3: p416 digerido con BamH1. Calle 4: p416 digerido con EcoR1. Calle 5 p426 sin digerir. Calle 6: p426 digerido con BamH1 y EcoR1. Calle 7: p426 digerido con BamH1. Calle 8: p426 digerido con EcoR1. Calle 9: Marcador de PM de de 1 kB (Invitrogen). Calle 10: pYES2 sin digerir. Calle 11: pYES2 digerido con BamH1 y EcoR1. Calle 12: pYES2 digerido con BamH1. Calle 13: pYES2 digerido con EcoR1.

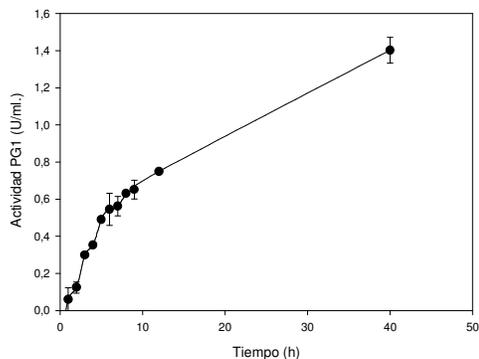
Los plásmidos linearizados y tratados con fosfatasa alcalina (CIP) para evitar su recirculación y el gen *pg1ΔI* fueron purificados y ligados con T4 ADN ligasa y las construcciones obtenidas se usaron para transformar células competentes de *E. coli* TOP10'. Las células transformadas se plaquearon en LB suplementado con ampicilina y se incubaron a 37 °C durante 24 h. De algunos de los clones obtenidos se extrajeron los plásmidos (p416: *pg1ΔI* y p426: *pg1ΔI*) que posteriormente fueron sometidos a digestión con BamH1 y EcoR1. El producto de esta digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa, para verificar que la presencia del inserto (Figura 4.17).



**Figura 4.17:** Electroforesis en gel de agarosa (1 %) para verificar presencia del gen *pg1ΔI* a partir de las digestiones de los plásmidos p416: *pg1ΔI* y p426: *pg1ΔI*. Calles 1-8: Digestión de las construcciones p416:*pg1* de los clones 1 al 8. Calle 9: plásmido p416:*pg1* sin digerir. Calle 10: p416 sin *pg1* digerido. Calles 11-17: Digestión de las construcciones p426:*pg1* de los clones 1 al 7. Calle 18: plásmido p426:*pg1* sin digerir. Calle 19: p426 sin *pg1* digerido. Calle 20: Marcador de PM de Kb (Invitrogen). Calles 21-22: Digestión de las construcciones p426:*pg1* de los clones 8 y 9. Calle 23: p426 sin *pg1* digerido. Calle 24: marcador de PM de Kb (Invitrogen). Calles 25-26: Digestión de las construcciones p426:*pg1* de los clones 10 y 11. Calle 27: p426:*pg1* sin digerir.

Por último, los plásmidos p416:*pg1ΔI* y p426:*pg1ΔI* fueron transformados en *S. cerevisiae* INVSc1 y las levaduras resultantes plaqueadas en SC-URA. Los clones de ambas construcciones que presentaron crecimiento fueron evaluados en términos de actividad PGasa.

Los resultados de estas determinaciones indican que fue posible clonar la PG1 activa en los plásmidos p416 y p426, obteniéndose alrededor de 1,5 U/ml de enzima en cultivos en frasco utilizando glucosa como FCE.



**Figura 4.18:** Cinética de la producción de PG1 de un clon de *S. cerevisiae* conteniendo la construcción p416:pg1ΔI en medio de cultivo con glucosa como única fuente de carbono y energía.

La Figura 4.18 corresponde a la cinética de producción de la enzima en medio SC en cultivos en erlenmeyer a partir de *S. Cerevisiae* conteniendo las construcciones p416:pg1ΔI. Similares resultados fueron hallados para la construcción p426:pg1ΔI. Puede observarse que tanto el nivel de producción de enzima como su productividad son semejantes a los que se obtienen con el pYES2:pg1ΔI. Tal como se explicó anteriormente, estos sistemas de expresión tienen la ventaja de no requerir del agregado de galactosa y tienen un extraordinario potencial de desarrollo. Actualmente se están realizando estudios de la expresión de PG1 en estos sistemas bajo diferentes condiciones de cultivo, previéndose que se continuará con los mismos en el futuro. Sus resultados exceden los límites de esta tesis.

## 4.4 Conclusiones

Debido a la falta de información bibliográfica sobre la expresión y propiedades de la proteína codificada por el gen *pgaA*, se determinaron las propiedades teóricas de la misma y compararon con las reportadas por Contreras *et al*<sup>38</sup> para PG1. A partir de este análisis resultó que las propiedades calculadas coinciden con las reportadas para PG1, por lo que se utilizó la secuencia de *pgaA* para el diseño de la estrategia de clonado en *S. cerevisiae*. La secuencia reportada posee un intrón que de no ser eliminado durante la maduración del mRNA produciría un corrimiento del marco de lectura que hace que aparezca un codón de terminación dentro del gen. Pensando que la levadura pudiera realizar el splicing correspondiente durante la expresión del gen y que se obtendría el mRNA maduro permitiendo la traducción de la enzima activa, se amplificó el gen *pg1* de *A. kawachii* y se generó la construcción pYES2:*pg1*. Sin embargo, esta estrategia no generó un producto activo. A partir de estos resultados es evidente la conclusión que la levadura no fue capaz de realizar el splicing del transcripto primario. Esta estrategia estaba basada en que existen numerosos análisis estadísticos (SpliceView, NN-SPLICE, SpliceProximalCheck y NETGENE) desarrollados para identificar los sitios de corte y empalme, que han revelado la presencia de nucleótidos altamente conservados en estos sitios. Sin embargo, cabe destacar que estos análisis también indican que existe una considerable variación alrededor de estas secuencias consenso, haciendo que la predicción de los nucleótidos exactos del splicing sea imprecisa. La introducción de un gen de *A. kawachii* en *S. cerevisiae* resultó en un splicing incorrecto, lo que sugiere que los mecanismos de splicing pueden diferir significativamente entre estas especies fúngicas<sup>64</sup>. Este resultado es similar al encontrado al clonar la PGasa de *A. awamori*<sup>50</sup>.

Se diseñó una estrategia de delección *in Vitro*. Esta estrategia permitió obtener niveles de proteína recombinante extracelular equivalentes a más de 70 veces la producida por la cepa salvaje de *A. Kawachii* (en las condiciones de cultivo empleadas).

Por otro lado, se observó que la proteína es completamente exportada al medio de cultivo. En *S. cerevisiae*, la proteína KEX2 reconoce ciertos dipéptidos tales como Arg-Arg, Lys-Arg y Pro-Arg, y cliva el segmento C-terminal del propéptido<sup>65</sup>. Una posibilidad es que la enzima se produzca en una forma prematura (proPG1) para luego ser procesada por la proteinasa KEX2. El dipéptido C-terminal del propéptido de la proPG1 (K-R) es uno de los reconocidos por esta proteinasa. La eficiencia del clivaje de la proteinasa KEX2 decrece marcadamente (más del 90 %) cuando el primer aminoácido del residuo dipéptido es intercambiado por otro tal como His.<sup>66</sup> Debido a

que la proteína es totalmente exportada al espacio extracelular, es posible suponer que el proPG1 es totalmente clivado por esta proteinasa. Esta información había sido determinada por medio del análisis bioinformático realizado, donde además se determinó que el péptido señal de PG1 de *A. kawachii* tiene más posibilidades de ser clivado en comparación con los correspondientes a otras PGasas clonadas<sup>40, 67</sup>.

El estudio de la producción de la PG1 recombinante a partir del vector inducible pYES2 será analizado en próximas secciones de este trabajo, intentando optimizar las condiciones de producción de la enzima a los efectos de aplicarla en procesos Biotecnológicos.

## 4.5 Referencias Bibliográficas

1. Aspinall, G.O. *Chemistry of cell wall polysaccharides, The Biochemistry of plants* (Academic Press, New York, 1980).
2. McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C., & Albersheim, P. Structure and function of the primary cell wall of plants. *Ann. Rev. Biochem* **53**, 625 (1984).
3. Timell, T.E. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sc. Technol.* **1**, 45-70 (1967).
4. Wilkie, K. & Woo, S. A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. *Carbohydr Res* **57**, 145-162 (1977).
5. Van Buren, J.P. *The Chemistry and Technology of Pectin*. (Academic Press, San Diego, 1991).
6. Sakai, T. Degradation of pectins. in *Microbial degradation of natural products*. (ed. Winkelmann, G.) 57-81 Weinheim, Germany, 1992).
7. Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., & Vandamme, E.J. Pectin, pectinase, protopectinase: production, properties, and applications. *Adv Appl Microbiol* **39**, 213-294 (1993).
8. Pilnik W. & Rombouts, F.M. Utilization of pectic enzymes in food production in *Food Science and Technology* (eds. Chiba, H., Fujimaki, M., Iwai, K., Mitsuda, H. & Morita, Y.) 269-277 (Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1979).
9. Sakai, T. & Okushima, M. Microbial production of pectin from citrus peel. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 908-912 (1980).
10. Pilnik W. & Rombouts, F.M. Pectic Enzymes in *Enzymes and Food Processing*. (eds. Birch, G.G., Blakebrough, N. & Parker, K.J.) 105-128 (Applied Science Publishers LTD, London, 1981).
11. Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N., & Beg, Q.K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 409-418 (2002).
12. Crous, J.M., Pretorius, I.S., & van Zyl, W.H. Cloning and expression of an *Aspergillus kawachii* endo-1,4-xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **28**, 467-473 (1995).
13. Hara, Y., Hinoki, Y., Shimoi, H., & Ito, K. Cloning and sequence analysis of endoglucanase genes from an industrial fungus, *Aspergillus kawachii*. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 2010-2013 (2003).
14. Sakamoto, S. *et al.* Cloning and sequencing of cellulase cDNA from *Aspergillus kawachii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **27**, 435-439 (1995).
15. Ito, K., Ikemazu, T., & Ishikawa, T. Cloning and sequencing of the xynA Gene encoding xylanase A of *Aspergillus kawachii*. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**, 906-912 (1992).

16. Suykerbuyk, M., Schaap, P.J., Stam, H., Musters, W., & Visser, J. Cloning, sequence and expression of the gene coding for rhamnogalacturonase of *Aspergillus aculeatus*; a novel pectinolytic enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 861-870 (1995).
17. Cook, P.E. & Campbell-Platt, G. *Aspergillus* and fermented foods. in *The Genus Aspergillus* (eds. Powell K.A., Renwick, A. & Peberdy J.F.) 171-188 New York, 1993).
18. Toyama H & Toyama, N. Isolation of acid hyper-producing strains from hiperpolyploids of *Aspergillus kawachii*. *Microbios* **90**, 23-32 (1997).
19. Lee, S.C., Yuk, H.G., & Hwang, Y.I. Recovery yields of protopectinase depending of treatments of organic solvents. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* **40**, 107-111 (1997).
20. Contreras Esquivel, J.C., Hours, R.A., Voget, C.E., & Mignone, C.F. *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. *J Biosci Bioeng* **88**, 48-52 (1999).
21. Teramoto, Y., Saigusa, N., Yoshida, Y., Ueda, S., & Yoshizawa, K. Production and characteristics of red rice sake. *J. Inst. Brew* **100**, 3-6 (1994).
22. Obayashi, A. & Uchi, S. Manufacture of shochu from sweet potatoes. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 11032751*. 4 (1999).
23. Setoguchi, S., Takamine, K., Kamesawa, H., & Hamasaki, Y. Study on sweet potato koji. *Kagoshima-ken Kogyo Gijutsu Senta Kenkyu Hokoku* **7**, 13-19 (1993).
24. So, M.-H., Lee, Y.-S., Han, S.-H., & Noh, W.-S. Analysis of major flavor compounds in Takju mash brewed with a modified Nuruk. *Han'guk Sikp'um Yongyang Hakhoechi* **12**, 421-426 (1999).
25. Nunokawa, Y., Shiinoki, S., & Hirotsune, M. Production of mirin with use of shoshu-koji. II Quality improvement of mirin. *Nippon JozoKyokai Zasshi* **77**, 123-125 (1982).
26. Lee S.W. *Korean dietary culture*. Seoul, 1984).
27. Kawai, S., Takahashi, K., & Tamaki, Y. Production of citron-sake. III. *Nippon Jozo Kyokai Zasshi*, **72**, 680-681 (1977).
28. Chiyogiku, K.K. Manufacture of wine-like sake. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 80*, 676 (1982).
29. Shimamura, K., Sasaki, T., & Sato, T. Manufacture of alcoholic beverages using fruit juice and white koji. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, (2001).
30. Zhang, W. & Yang, R. Application of engineering-strain in preparation of acetic acid beverage with orange juice. *Zhongguo Niangzao*, **3**, 22-26 (2001).
31. Vita C.E., Contreras Esquivel, J.C., & Voget, C.E. Pectolytic enzymes of the industrial fungus *Aspergillus kawachii*. *Food Science and Biotechnology* (2009).
32. Mikami, S., Iwano, K., Shinoki, S., & Shimada, T. Purification and some properties of acid-stable -amylases from shoshu koji (*Aspergillus kawachii*). *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2495-2501 (1987).

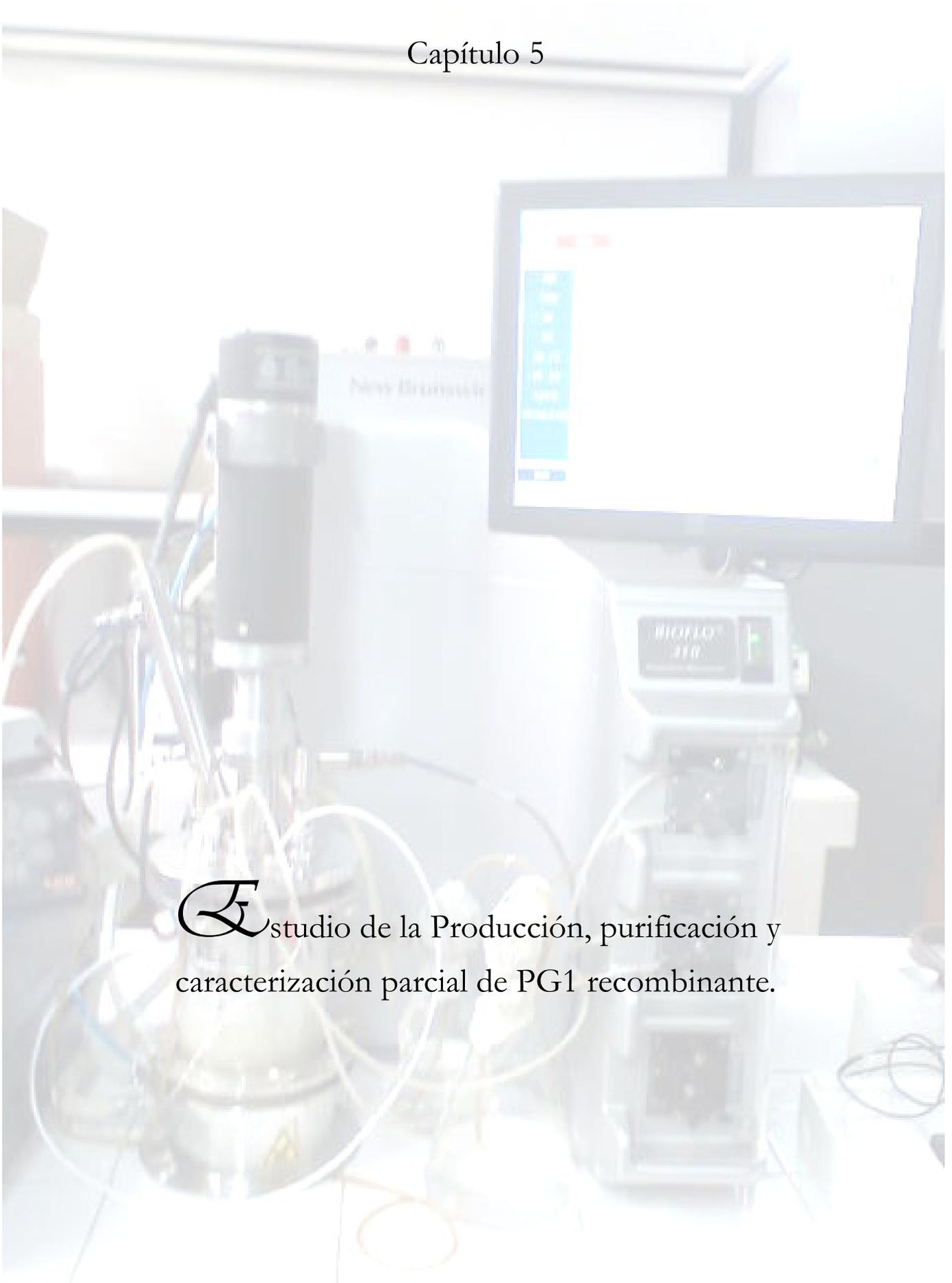
33. Sudo,S., Ishikawa,T., Sato,K., & Oba,T. Comparison of acid stable  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus kawachii* in solid state and submerged cultures. *J Ferment Bioeng* **77**, 483-489 (1994).
34. Omori,T., Takeshima,N., & Shimoda,M. Formation of acid-labile  $\alpha$ -amylase during barley-*koji* production. *J Ferment Bioeng* **78**, 27-30 (1994).
35. Yagi,F., Fan,J., Tadera,K., & Kobayashi,A. Purification and characterization of carboxyl proteinase from *Aspergillus kawachii*. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 1029-1033 (1986).
36. Iwashita,K. *et al.* The *bglA* Gene of *Aspergillus kawachii* Encodes Both Extracellular and Cell Wall-Bound beta -Glucosidases. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5546-5553 (1999).
37. Kojima,Y., Sakamoto,T., Kishida,M., Sakai,T., & Kawasaki,H. Acidic condition inducible polygalacturonase of *Aspergillus kawachii*. *J Mol Catal B-Enzym* **6**, 351-357 (1999).
38. Contreras Esquivel,J.C. & Voget,C.E. Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *J Biotechnol* **110**, 21-28 (2004).
39. Sambrook,J., Fritsch,E., & Maniatis,T. *Molecular cloning. A laboratory manual*(1989).
40. Hirose,N., Kishida,M., Kawasaki,H., & Sakai,T. Molecular cloning and expression of a polygalacturonase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng* **86**, 332-334 (1998).
41. Iguchi,K., Hirano,H., Kishida,M., Kawasaki,H., & Sakai,T. Cloning of a Protopectinase gene of *Trichosporon penicillatum* and its expression in *Sacharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143**, 1657-1664 (1997).
42. Giniger,E., Barnum,S.M., & Ptashne,M. Specific DNA Binding of GAL4, a Positive Regulatory Protein of Yeast. *Cell* **40**, 767-774 (1985).
43. Mumberg,D., Muller,R., & Funk,M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119-122 (1999).
44. Sikorski,R. & Hieter,P. A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces ceratisia*. *Genetics.* **122**, 19-27 (1989).
45. Becker,D. & Guarente,L. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol* **194**, 182 (1991).
46. Ling,M., Merante,F., & Robinson,B. A rapid and reliable DNA preparation method for screening a large number of yeast clones by polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* **23**, 4924-4925 (1995).
47. Herber D, Phipps P., & Strange P. Chemical analysis of microbial cells. in *Methods in Microbiology* (eds. Norris,J. & Ribbons,D.) 210-344 (London Academic Press, 1971).
48. Antranikian,G., Herzberg,C., & Gottschalk,G. Production of thermostable  $\alpha$ -amylase, pullulanase and  $\alpha$ -glucosidase in continuous culture by a new clostridium isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1668-1673 (1987).

49. Smith B.J. *Methods in Molecular Biology*. (ed. Walker JM,E.e.) 41-56 New Jersey, 1984).
50. Nagai,M., Ozawa,A., Katsuragi,T., Kawasaki,H., & Sakai,T. Cloning and heterologous expression of gene encoding a polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 1580-1587 (2000).
51. Herbert A & Rich A. RNA processing and the evolution of eukaryotes. *Nature Genetics* **21**, 265-269 (1999).
52. Lander E.S Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
53. Grasso C, Modrek B., Xing Y, & Lee C Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences using partial order multiple sequence alignment graphs. *Pac. Symp. Biocomput*29-41 (2004).
54. Nagasaki H., Arita M, Nishizawa T, Suwa M, & Gotoh O Species-specific variation of alternative splicing and transcriptional initiation in six eukaryotes. *Gene* **364**, 53-62 (2005).
55. Chervitz SA *et al.* Using the Saccharomyces Genome Database (SGD) for analysis of protein similarities and structure. *Nucleic Acids Res* **27**, 74-78 (1999).
56. Hodges P.E, McKee A.H, Payne W.E, & Garrels J.I. The Yeast Proteome Database (YPD): a model for the organization and presentation of genome-wide functional data. *Nucleic Acids Res.* **27**, 69-73 (1999).
57. Lopez P.J & Seraphin B Genomic-scale quantitative analysis of yeast pre-mRNA splicing: implications for splice-site recognition. *RNA*. **5**, 1135-1137 (1999).
58. Spingola M, Grate L., Haussler D, & Ares M. Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. **5**, 221-234 (1999).
59. Kellis M., Patterson N., Endrizzi M., Birren B, & Lander E.S Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*. **423**, 241-254 (2003).
60. Juneau K., Miranda M., Hillenmeyer M.E., Nislow C., & Davis R.W. Introns regulate RNA and protein abundance in yeast. *Genetics*. **174**, 511-518 (2006).
61. Ares M., Grate L, & Pauling M A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA. *RNA*. **5**, 1138-1139 (1999).
62. Bon E. Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1121-1135 (2003).
63. West,R.W.J., Yocum,R.R., Yocum,R.R., & Ptashne,M. Saccharomyces cerevisiae GAL1-GAL10 Divergent Promoter Region: Location and Function of the Upstream Activator Sequence UASG. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2467-2478 (1984).
64. Archer,D., Mackenzie,D., & Jeenes,D. Genetic engineering; yeast and filamentous fungi in *Basic Biotechnology* (eds. Ratledge,C. & Kristiansen,B.) (Cambridge Universitu press, Cambridge, 2006).
65. Julius D, Schekman R, & Thorner J. Glycosylation and processing of prepro- $\alpha$ -factor through the yeast secretory pathway. *Cell* **36**, 309-318 (1984).

66. Brennan.S.O., Peach,R.J., & Bathurst,I.C. Specificity of yeast Kex2 protease for variant human proalbumins is identical to the *in vivo* specificity of the hepatic proalbumin convertase. *J. J. Biol. Chem.* **265**, 21494-21497 (1990).
67. Sakai,T., Sirasaka,N., Hirano,H., Kishida,M., & Kawasaki,H. Isolation and expression of the gene which encodes a novel enzyme with polymethoxygalacturonate degrading activity in *Trichosporon penicillatum*. *FEBS Lett* **414**, 439-443 (1997).

## Capítulo 5

*E*studio de la Producción, purificación y caracterización parcial de PG1 recombinante.





## Resumen

Se estudiaron las condiciones de cultivo de *S. cerevisiae* INVSC1 conteniendo el plásmido pYES2:*pg1ΔI* en términos de producción de PG1 recombinante en sistemas batch y batch alimentado con diferentes estrategias de inducción. Los resultados obtenidos señalaron que el sistema más adecuado para la producción de la enzima recombinante fue el batch alimentado con glucosa y galactosa simultáneamente. Una vez determinadas las mejores condiciones de cultivo, se desarrolló una estrategia de purificación de la proteína recombinante (PG1), que se inició con una concentración (10 ×) a presión reducida del sobrenadante del cultivo, seguida de precipitación con acetona (2,5/1, Vol. acetona/Vol. sobrenadante concentrado). Luego, la proteína fue resuspendida y adsorbida a una matriz de intercambio catiónico (Sephacryl SP FF). Por último, la proteína fue recuperada en una solución electroforéticamente homogénea desde una cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S100) con una recuperación de 26,5 % de la actividad original y una actividad específica de 77,4 U/mg.

Finalmente, se determinaron las características bioquímicas de la proteína recombinante. Los análisis en SDS-PAGE e IEF indicaron un PM de 60 KDa, y un PI de 3,5-3,6, respectivamente. La proteína es óptimamente activa a pH 4,0 y estable por, al menos, 2 h a 50°C. La identificación por mapeo peptídico indicó similitudes con algunos péptidos de una protopectinasa-AS de *A. awamori*, con una PGaA de *A. kawachii* y con una endo-poligalacturonasa de *A. niger*. Comparando las características bioquímicas de la proteína recombinante con las de la proteína silvestre se concluye que la expresión del gen que codifica para PG1 de *A. kawachii* por *S. cerevisiae* fue exitosa, confirmando las conclusiones del Capítulo 4.

## 5.1 Introducción

Las PGasas actúan básicamente sobre el HG hidrolizando las uniones glicosídicas entre residuos no esterificados. El potencial de aplicación de PGasas, relacionado con la clarificación de jugos y la desintegración de tejidos vegetales (particularmente en procesos de maceración y licuefacción), lleva a desarrollar estudios relacionados con la mejora de su producción. Tal como se indicó en el capítulo anterior, el gen *pg1* que codifica para la PG1 producida por *A. kawachii* fue clonado en un sistema de expresión heterólogo, *S. cerevisiae*, con el objeto de incrementar los niveles de producción de enzima con respecto a los naturales.

El clonado y la sobre expresión de una enzima permiten alcanzar niveles de producción superiores a los silvestres. Sin embargo, no menos importante es el desarrollo de un sistema de cultivo apropiado para su producción de manera de aprovechar al máximo el potencial del sistema de expresión. La optimización de un proceso de fermentación tiene lugar una vez que se haya demostrado la factibilidad de la producción en el microorganismo seleccionado, es decir, que el sistema de expresión haya sido correctamente construido y sea funcional. Cabe destacar que el protocolo de fermentación afecta el perfil de impurezas presentes en el medio de cultivo, impactando marcadamente sobre el diseño del downstream processing. Por ello es que el diseño de la fermentación debe ser llevado a cabo en paralelo con el del proceso de purificación<sup>1</sup>. La fermentación puede realizarse en sistemas tipo batch, batch alimentado o cultivo continuo. Sin embargo, el cultivo continuo no es muy recurrido para la producción ya que el gran número de generaciones que transcurren en el mismo hace que sea proclive a la contaminación y a la aparición de mutaciones espontáneas con el consiguiente cambio en la cepa de producción. Los procesos batch son simples y robustos pero presentan una serie de limitaciones debidas a la falta de control sobre el crecimiento microbiano. Por un lado, el hecho de que los microorganismos crezcan a  $\mu_{\max}$  durante buena parte del batch hace que el consumo de  $O_2$  sea alto cuando la concentración celular final deseada es alta, tal como ocurre en los procesos en los que el producto a obtener está asociado al crecimiento celular o es proporcional a la biomasa obtenida. La transferencia de  $O_2$  de la fase gaseosa a la fase líquida representa generalmente un reto en los cultivos microbianos. Además, la única forma de obtener una alta concentración de biomasa es partir de un medio con una alta concentración de sustrato, hecho que puede generar problemas de inhibición y/o de alteraciones en el medio de cultivo durante el proceso de esterilización. Por último, *S. cerevisiae* presenta, como otros microorganismos, metabolismo de sobreflujo en el cual, cuando crece a velocidades específicas elevadas, presenta un

metabolismo respirofermentativo dando lugar a la generación de productos (en este caso etanol) a pesar de poseer suficiente cantidad de  $O_2$ <sup>2</sup>. Este tipo de metabolismo se conoce como efecto Crabtree positivo<sup>3</sup>. Para subsanar todos estos posibles inconvenientes se elige generalmente al sistema de cultivo batch alimentado, ya que la alimentación restringida de FCE permite que las células crezcan a una alta densidad con metabolismo respiratorio manteniendo una baja velocidad específica de crecimiento<sup>4</sup>. El criterio de selección del proceso económicamente más viable se basa en la evaluación de la obtención de producto recombinante a lo largo del tiempo.

Los medios de cultivo definidos (o sintéticos) suelen ser más caros que los no definidos que contienen componentes complejos de origen natural. Sin embargo, los medios mínimos generalmente brindan no sólo mayor reproducibilidad al sistema, sino que también aportan una menor cantidad de impurezas al medio, facilitando la separación y purificación de la proteína de interés. La elección de la FCE y la optimización del pH son parámetros cruciales, ya que si bien las levaduras pueden crecer en un amplio rango de pH, la elección de este parámetro depende de la estabilidad de la proteína recombinante expresada.

En este capítulo se estudiará el crecimiento de un *S. cerevisiae* recombinante en un medio de cultivo sintético y la producción de PG1 recombinante. Posteriormente, se describirá un estudio relacionado con el efecto que tiene el sistema de cultivo (batch o batch alimentado) sobre la producción de la enzima. Por último, se estudian las condiciones óptimas de concentración y como así también la purificación y estabilidad de la PG1 recombinante.

## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1. Reactivos químicos

Ácido poligalacturónico (APG) y ácido galacturónico monohidrato (AGA) fueron provistos por Sigma Chemical Co. El Broad pl Kit (pH 3-10) y los patrones de peso molecular de proteínas (Broad range: MW 6.500 a 205.000) fueron de GE Healthcare (Wiscosin, USA). Todos los demás reactivos empleados son de grado analítico y están comercialmente disponibles.

### 5.2.2. Medios de cultivo

Se utilizó inicialmente el medio sintético sugerido por el fabricante (Invitrogen). Este medio, el cual se denominará a partir de ahora medio de *S. cerevisiae* (SC), fue modificado en función de mejorar las condiciones del proceso. Este medio contiene rafinosa (o glucosa) como FCE y sulfato de amonio (o urea) como FN y su composición se detalla en las Tablas 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4.

Tanto los componentes mayoritarios del SC como los microelementos y aminoácidos fueron esterilizados en autoclave (15 min, a 121°C) mientras que las vitaminas y la urea fueron filtradas a través de membranas de celulosa (0,22 µm, Osmonics, EE.UU) y se agregaron al resto de los componentes del medio ya esterilizados, previamente a su inoculación.

### 5.2.3. Microorganismo y mantenimiento de la cepa

La cepa que se utilizó en todos los ensayos fue el clon 1 de *S. cerevisiae* INVSc1 conteniendo la construcción *pYES2:pg1ΔI*. La misma fue conservada por periodos de tiempo prolongados mediante congelación a -70°C en solución de glicerol (15 %, v/v; Master bank). A partir de las muestras congeladas se hicieron repiques en tubos de ensayo con medio de cultivo SC. Los cultivos se incubaron a 30°C hasta crecimiento abundante y se mantuvieron a 4°C bajo capa de vaselina estéril (Working bank), durante un máximo de 6 meses, tiempo a partir del cual fueron descartados. Previo a cada fermentación se hicieron repiques sobre SC a partir de los cultivos almacenados a 4°C, y a partir de ellos se prepararon los inóculos para los distintos ensayos realizados.

**Tabla 5.1:** Composición del medio SC

Componente	Concentración (g/l)
Rafinosa o glucosa (FCE)	20,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,1
NaCl	0,1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> o urea	3,0
Solución de microelementos	1,0 ml/l
Solución de vitaminas	1,0 ml/l
Solución de aminoácidos	10 ml/l
pH	5,0

**Tabla 5.2** Composición de microelementos para el medio SC, solución 1000 x

Componente	Concentración (g/l)
Ácido bórico	0,5
Sulfato de cobre	0,04
Ioduro de potasio	0,1
Cloruro férrico	0,2
Sulfato de magnesio	0,4
Molibdato de amonio	0,15
Sulfato de zinc	0,45

**Tabla 5.3** Composición de vitaminas para el medio SC, solución 1000 x

Vitaminas	Concentración (g/l)
Biotina	0,020
Pantotenato de calcio	0,4
Ácido fólico	0,0020
Inositol	2,0
Ácido nicotínico	0,4
PABA	0,20
AC. piridoxínico HCl	0,4
Tiamina HCl	0,4
Riboflavina	0,2

**Tabla 5.4:** Composición de aminoácidos para el medio SC, solución 100 x

Aminoácido	Concentración (g/l)
Arginina	10
Adenina	10
Cisteína	10
Leucina	10
Lisina	10
Treonina	10
Triptófano	10
Ác. aspártico	5
Histidina	5
Isoleucina	5
Metionina	5
Fenilalanina	5
Prolina	5
Serina	5
Tirosina	5
Valina	5

## 5.2.4 Cultivos en frascos agitados

La cepa se repicó en una placa conteniendo SC sólido. Luego de incubarla a 30°C por un lapso de 24 h, los microorganismos se resuspendieron mediante el agregado de 10 ml de medio de cultivo fresco estéril. Esta suspensión se utilizó para sembrar frascos de 1.000 ml de capacidad, con 100 ml de SC, alcanzando en todos los casos una  $DO_{620}$  inicial de 0,4. Esta relación entre el volumen de medio y el volumen del frasco busca asegurar una adecuada transferencia de oxígeno al medio. Los cultivos se realizaron en un agitador rotatorio (New Brunswick-Scientific), a 30°C y 200 rpm. El crecimiento microbiano se monitoreó por medidas de  $DO_{620}$ , de consumo de FCE y de pH. En cada determinación se tomó una muestra en tubo cónico tipo Eppendorf (1,5 ml), se centrifugó (10 min, 4°C) a 9.000 g, y a partir del sobrenadante se determinó la actividad PGasa.

## 5.2.5 Cultivos en biorreactor en sistema tipo batch

### 5.2.5.1 Biorreactor

Se utilizó un biorreactor de 1,5 l de capacidad máxima (Bioflo 310, New Brunswick-Scientific), con un volumen de SC (10 g/l de glucosa) de 1,1 l, aproximadamente, agitación constante a una velocidad de 450 rpm, y una aireación de 1 vvm. El pH fue mantenido en 5,5 durante el crecimiento y en 4,5 durante la inducción. El fermentador cuenta con los accesorios necesarios para la medida y el control automático de pH (con un electrodo de vidrio, Mettler Toledo) y monitoreo de  $O_2$  disuelto (con un electrodo de tipo polarográfico, Mettler Toledo). El fermentador fue esterilizado con el medio de cultivo en autoclave (15 min, a 121 °C).

### 5.2.5.2 Inóculo

En todos los casos el biorreactor fue inoculado a partir de un cultivo en frascos agitados conteniendo 100 ml de SC modificado (con una concentración inicial de 10 g/l de glucosa).

### 5.2.5.3 Medida de pH, de oxígeno disuelto y de gases

El pH y el oxígeno disuelto en el medio de cultivo fueron determinados mediante los correspondientes accesorios del biorreactor. Las medidas del contenido en  $O_2$  y en  $CO_2$  de los gases de salida fueron realizadas mediante un detector de tipo paramagnético (Servomex, UK) y de un detector infrarrojo (Horiba Pir 2000, Japón), respectivamente. El coeficiente respiratorio (CR) se calculó como la relación entre la velocidad de formación de  $CO_2$  ( $rCO_2$ ) y la velocidad de consumo de  $O_2$  ( $rO_2$ ).

### 5.2.5.4 Toma de muestras líquidas

Cuando fue necesario se tomaron volúmenes de 20 ml de muestra del biorreactor, de

los cuales 10 ml se usaron para medir biomasa, y el resto se centrifugó a 9.000 g (10 min, a 4°C). Los sobrenadantes recuperados se guardaron en tubos tipo Eppendorf (1,5 ml) a -18°C para la realización de las determinaciones analíticas correspondientes.

#### 5.2.5.5 Determinación de biomasa

La concentración de biomasa de los cultivos se determinó por medio de la medida de peso seco. Las determinaciones de peso seco se realizaron por centrifugación a 5000 g de 10 ml de muestra de cultivo luego de lo cual la biomasa precipitada fue lavada y secada en estufa a 105°C hasta peso constante<sup>13</sup>

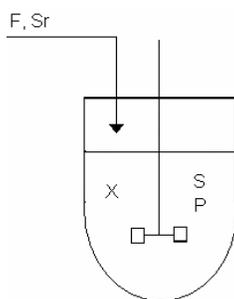
### 5.2.6 Cultivos en biorreactor en sistema tipo batch alimentado

#### 5.2.6.1 Biorreactor y procedimientos del cultivo

Se utilizó el mismo equipo que el mencionado previamente para los cultivos en batch. Inicialmente se cultivó *S. cerevisiae* en cultivo tipo batch utilizando 0,8 l de SC, a una velocidad de agitación de 450 rpm y una aireación de 1 vvm. Después de consumida la totalidad de la FCE, se inició la alimentación por medio de una bomba peristáltica bajo régimen de flujo constante de 0,5 l de SC concentrado. La agitación se controló en forma automática a fin de mantener el O<sub>2</sub> disuelto por encima de un 30 % de saturación. Tanto el biorreactor como el reservorio de alimentación fueron esterilizados en autoclave (15 min, a 121 °C) con el medio de cultivo. Para el inóculo, las medidas de pH, O<sub>2</sub> disuelto y gases, así como la toma de muestras líquidas, se usaron los mismos instrumentos y procedimientos descritos previamente para el sistema de cultivo en batch.

#### 5.2.6.2 Diseño del sistema batch alimentado

El diseño del cultivo en batch alimentado (concentración de FCE y velocidad de alimentación) fue realizado con base en las ecuaciones derivadas de los balances para biomasa (Ec. 5.1) y sustrato (Ec. 5.2). La nomenclatura utilizada se detalla en el diagrama que se muestra en la Figura 5.1:



**Figura 5.1:** Diagrama representativo de un biorreactor en sistema batch alimentado. Sr: concentración de la FCE en el medio de alimentación (g/l). F: flujo de alimentación (l/h). X: concentración de

biomasa (g/l). S: concentración de sustrato en el reactor (g/l). P: concentración de producto en el reactor (g/l).

A partir del diagrama anterior, pueden realizarse los siguientes balances de materia en fase líquida:

Balance de biomasa:

$$\frac{d(xV)}{dt} = \mu \cdot x \cdot V \text{ o bien } \frac{d(xV)}{dt} = r_x \cdot V \quad \text{Ec. 5.1}$$

Balance de sustrato

$$\frac{d(S \cdot V)}{dt} = F S_R - \frac{d(S \cdot V)}{dt} = F S_R - V \cdot r_S \quad \text{Ec. 5.2}$$

Si se toma como válido el modelo de Pirt<sup>8</sup>, el consumo de sustrato ( $r_S$ ) se destina a la formación de biomasa (crecimiento) y al mantenimiento de las funciones celulares no asociadas al crecimiento (mantenimiento celular) (Ec. 5.3).

$$r_S = \frac{r_x}{Y'_{x/s}} + m_s \cdot x \quad \text{Ec. 5.3}$$

donde  $Y'_{x/s}$  es el rendimiento verdadero de biomasa (gramos de biomasa por gramos de FCE) y  $m_s$  es el coeficiente de mantenimiento celular. En cultivos a gran escala y con alta concentración celular, el gasto de sustrato en mantenimiento puede representar una fracción importante del gasto total, por lo que el rendimiento experimental puede disminuir significativamente. En los cultivos realizados en el presente trabajo, debido a que el periodo de alimentación no fue muy prolongado y la concentración final deseada de biomasa fue relativamente baja, se asumió que el mantenimiento celular ( $m_s$ ) fue despreciable. Entonces:  $m_s \cdot X \ll r_S$ . En ese caso,

$r_S \approx \frac{r_x}{Y'_{x/s}}$  y puede considerarse constante en el tiempo a lo largo del cultivo por lo que

el balance de acumulación de sustrato puede expresarse en función de la biomasa de la siguiente forma:

$$\frac{d(S.V)}{d t} = F S_R - \frac{\mu X V}{Y_{x/s}} \quad \text{Ec. 5.4}$$

$$V \frac{dS}{dt} + S \frac{dV}{dt} = F.S_R - \frac{\mu X V}{Y_{x/s}}$$

donde X y S son las concentración de biomasa y sustrato (g/l), respectivamente, S<sub>R</sub> es la concentración de FCE en el medio de alimentación (g/l), F es el flujo de alimentación (l/h), V es el volumen del medio (l), μ es la velocidad específica de crecimiento (h<sup>-1</sup>) y r<sub>x</sub> y r<sub>s</sub> son las velocidades de formación de biomasa y consumo de sustrato, respectivamente (g/l.h).

Para el sistema de cultivo en batch alimentado se cumple que S ≈ 0 y dS/dt = 0, con lo que la Ec. 5.3 se transforma en:

$$F . S_R - \frac{\mu X V}{Y_{x/s}} = 0 \quad \text{Ec. 5.5}$$

de aquí, y recordando que r<sub>x</sub> = μ . X

$$F . S_R = \frac{r_x V}{Y_{x/s}} \quad \text{Ec.5.6}$$

Combinando las Ecs. 5.1 y 5.6 e integrando (bajo la condición de que rendimiento es constante debido a la ausencia de mantenimiento) entre las condiciones iniciales y finales del cultivo en batch alimentado se obtiene el perfil de acumulación de biomasa en función del tiempo para las condiciones de alimentación definidas:

$$X V = x_0 V_0 + Y_{x/s} F S_R t \quad \text{Ec. 5.7}$$

En los cultivos en batch alimentado el volumen no es constante, sino que varía con el tiempo (F = dV/dt). Integrando, para un perfil de alimentación a F constante, se tiene:

$$V = V_0 + F t \quad \text{Ec. 5.8}$$

Reemplazando en 5.7 y despejando X, se tendrá:

$$X = \frac{x_0 V_0}{Ft + V_0} + \frac{Y_{x/s} F S_R t}{Ft + V_0} \quad \text{Ec. 5.9}$$

Las Ecs. 5.5 y 5.7 son denominadas ecuaciones de diseño de un sistema de cultivo en batch alimentado, donde  $X_0$  es la concentración inicial de biomasa que corresponde a la concentración final del cultivo en la etapa batch,  $X$  es la concentración final de biomasa,  $V_0$  es el volumen del medio de cultivo al inicio del proceso de alimentación (correspondiente al volumen trabajado en la etapa batch),  $V$  es el volumen al final del proceso de alimentación, y  $\mu_0$  es la velocidad específica de crecimiento al inicio del proceso de alimentación, la cual es definida arbitrariamente en un valor menor o igual que  $\mu_{\max}$ .

### 5.2.6.3 Diseño de las estrategias de inducción

Finalizado el batch alimentado se procedió a inducir el sistema de expresión por medio del agregado de galactosa. Esta inducción se llevo a cabo siguiendo tres estrategias diferentes:

- 1- Inducción con un pulso de galactosa: Se agregó al reactor el volumen necesario de una solución stock de galactosa al 10 % (p/v) para alcanzar una concentración del 1 % (p/v) de galactosa en el medio de cultivo.
- 2- Inducción con 2 pulsos de galactosa: Se agregó al reactor el volumen necesario de una solución stock de galactosa al 10 % (p/v) para alcanzar una concentración del 1 % (p/v) de galactosa en el medio de cultivo (idem 1). Una vez agotado el inductor, se repitió la inducción en las mismas condiciones.
- 3- Inducción durante la alimentación: En este caso, la galactosa fue adicionada junto con el  $S_r$ , en una concentración de 10 % (p/v).

En todos los casos, se tomaron muestras a intervalos regulares determinando las concentraciones de biomasa, proteína y actividad enzimática.

### 5.2.7 Purificación de la enzima

Una vez alcanzado el máximo de actividad PG1 los cultivos fueron cosechados y centrifugados a 9000 g durante 10 min. Debido a que la enzima es extracelular, el pellet formado por biomasa y restos de medio de cultivo fue descartado. A fin de extraer restos de micelio, el sobrenadante fue filtrado a través de papel de filtro (Whatman N°1) y luego a través de filtros de acetato de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

El extracto filtrado fue concentrado por evaporación a presión reducida con un rotavapor a escala banco (Büchi; 30 vueltas por min, a 40°C). Luego se efectuó una

nueva etapa de concentración por precipitación. Para ello, se ensayó una precipitación con sulfato de amonio y otra con acetona. La concentración con sulfato de amonio se realizó por medio de precipitaciones sucesivas a 0°C. Dichas precipitaciones se realizaron a 25 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 % y 100 % de saturación. Entre cada paso, la muestra fue agitada durante 20 min en baño de agua / hielo y centrifugada a 10.000 g durante 10 min. La precipitación con solvente se realizó empleando distintas relaciones de acetona / muestra de enzima (1/1; 1,5/1; 2/1; 2,5/1; 3/1; 10/1) incubando las soluciones con agitación continua a 0-2°C (baño de agua / hielo, el solvente se preenfrió a -20°C y se agregó al concentrado lentamente bajo agitación, tiempo de contacto: 3 h). En ambos casos, para separar el precipitado, la mezcla se centrifugó a 7000 g, 20 min a 2-5°C. El sobrenadante se desechó y el pellet se disolvió en BCP (pH 5,0) a una concentración 10 × respecto del volumen original de concentrado.

Una vez concentrado el extracto enzimático, este fue sometido a dos pasos de purificación. El primero consiste en un paso de captura, en el que la proteína es adsorbida a una matriz de intercambio catiónico. El segundo consiste en una cromatografía de exclusión molecular. Todos los pasos cromatográficos se realizaron en un equipo ÄKTA FPLC-U900 System (Amersham GE). Luego de cada paso cromatográfico, las muestras se analizaron en términos de actividad enzimática, de cantidad de proteínas por el método de Bradford<sup>9</sup> y de pureza por medio de SDS-PAGE 10 % teñido con la técnica de Coomassie Brilliant Blue coloidal.

La muestra concentrada fue pasada a través de una columna cromatográfica XK 26/20 conteniendo 56 ml de relleno Sepharosa SP FF pre-equilibrada con buffer BCP ¼ a un flujo de 3,0 ml/min. La columna fue lavada con el mismo buffer con 2 volúmenes de columna al mismo flujo, y las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal de BCP ¼ de 0-1 M NaCl en 4 vols de columna. La solución enzimática resultante (con actividad PG1) fue inyectada a una columna de exclusión molecular XK 16/100 Sephacryl<sup>®</sup> S100 HR (120 ml de relleno, equilibrada con BCP ¼). La elución se llevó a cabo con el mismo buffer, en 5 volúmenes de columna a un flujo de 1,5 ml/min y los picos con actividad fueron recogidos en fracciones de 15 ml.

## 5.2.8 Técnicas bioquímicas y analíticas

### 5.2.8.1 Medida de actividad enzimática

Se determinó la actividad de PG1 como liberación de poder reductor utilizando APG como sustrato mediante el siguiente protocolo. Se incubaron 180 µl de sustrato (0,5 % de polímero en BCP ½), pH 2,5, con 20 µl de muestra enzimática durante 30 min. Transcurrido dicho tiempo, las muestras se enfriaron inmediatamente en baño de

agua/hielo y la concentración de azúcares reductores en las mismas se determinó por Somogyi-Nelson<sup>10</sup> empleando AGA como patrón. La unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que genera un  $\mu\text{mol}$  de AGA por minuto en las condiciones de reacción establecidas

#### *5.2.8.2 Técnicas bioquímicas*

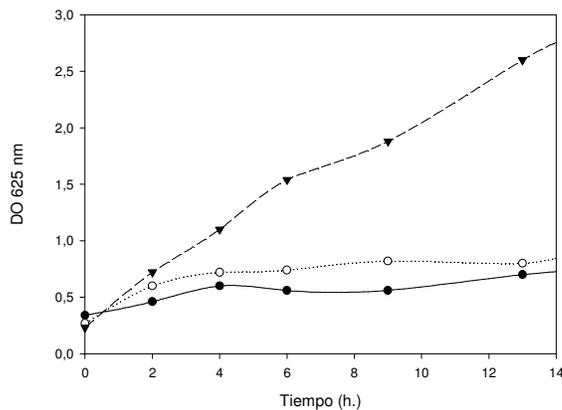
Los análisis mediante SDS-PAGE fueron llevados a cabo en un equipo Mighty Small II Unit (Hoefer SE 260) de acuerdo a Smith<sup>11</sup>. El isoelectroenfoque (IEF) fue realizado en una unidad de electroforesis (LKB Bromma 2117, Multiphor II) a 10°C. El gel se preparó con una capa fina de poliacrilamida en el rango de 3-10 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Como buffer catódico se utilizó una solución de ácido sulfúrico (0,1 M) y como buffer anódico una solución de NaOH (0,1 M).

La concentración de glucosa se determinó por el método enzimático de glucosa oxidasa - peroxidasa (Wiener Lab., Argentina)<sup>12</sup> en tanto que para la de galactosa se utilizó el de galactosa deshidrogenasa –  $\beta$ -galactosidasa (Enzytec, Scil Diagnostics GmbH, Alemania).

## 5.3 Resultados y discusión

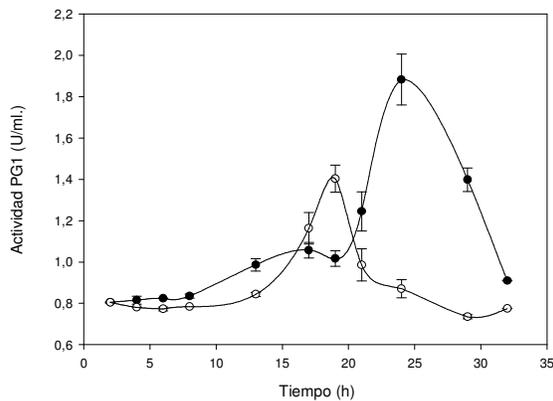
### 5.3.1 Cultivos en sistema batch a escala frascos agitados

A los efectos de estudiar las características de crecimiento de la levadura recombinante, se realizaron cultivos en batch a escala de frascos agitados de diferentes clones de *S. cerevisiae* INVSc1 siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen). En la Figura 5.2 se observa el perfil de crecimiento de los clones 1 y 2 (conteniendo la construcción pYES2:pg1ΔI) y de un control conteniendo el plásmido pYES2 vacío, inducidos con galactosa después de 8 h de crecimiento. Tal como puede observarse, los dos clones (1 y 2) muestran un perfil de crecimiento similar, mientras que el control presenta una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) mayor, es decir, la introducción de un plásmido conteniendo el gen que codifica para PG1, redujo la velocidad específica de crecimiento de *S. cerevisiae* INVSc1. La expresión de PG1 generó una carga metabólica (metabolic burden) sobre las células de levadura, lo cual ha causado esta disminución de  $\mu$ . Ha sido reportado que este tipo de carga metabólica ejerce efectos sobre diferentes caracteres fenotípicos tales como la velocidad específica de crecimiento (como es este caso); rendimiento en biomasa<sup>14</sup> y la velocidad específica de consumo de glucosa<sup>15</sup>.



**Figura 5.2:** Crecimiento (determinado por  $A_{625}$ ) en cultivos en batch a escala erlenmeyers de 2 clones de *S. cerevisiae* INVSC1 conteniendo la construcción pYES2:pg1ΔI y de un control conteniendo el plásmido vacío. ●: clon 1. ○: clon 2. ▼: control con el plásmido sin inserto. Inducción con Gal a las 8 h de cultivo.

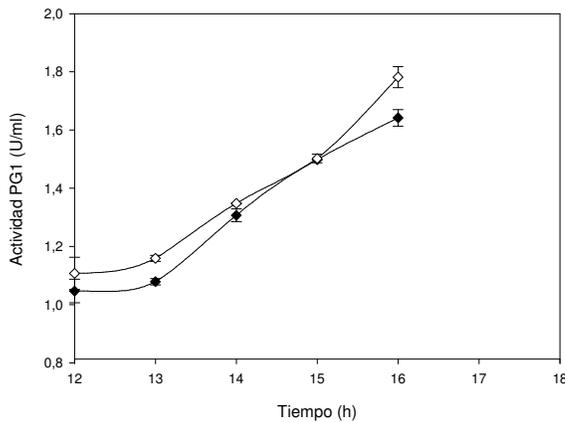
En este sistema de cultivo también fue estudiada la cinética de producción de enzima recombinante por parte de varios clones. La Figura 5.3 muestra los resultados obtenidos en dos de ellos, en la que claramente se observa que existe un máximo entre las 20 y las 24 h de inducción (aproximadamente 2 U/ml), dependiendo del caso. Cabe destacar que la proteína generada por *A. kawachii* en este mismo medio alcanzaba apenas las 28 mU/ml<sup>16</sup>.



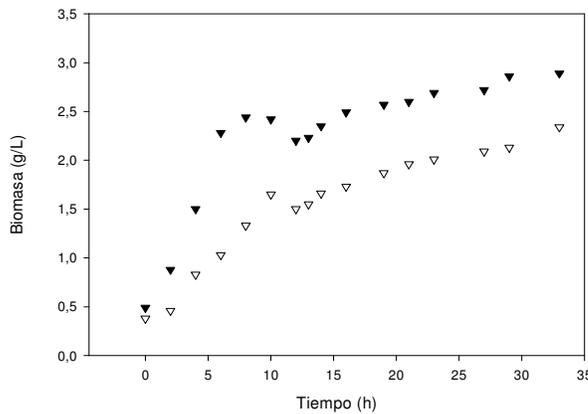
**Figura 5.3:** Cinética de producción de PG1 (determinada por actividad enzimática con PGA como sustrato) de dos clones de *S. cerevisiae* recombinantes, luego de inducción con galactosa. ●: clon 1. ○: clon 2. Inducción con galactosa a las 8 h de cultivo.

Una vez determinada la cinética de producción de PG1, se decidió evaluar la composición del medio de cultivo empleado. Esto es, inicialmente se efectuaron los cultivos siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen). Este medio de cultivo contenía rafinosa como FCE y sulfato de amonio como FN.

En las típicas cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* INVSc1, la transcripción del promotor GAL1 está reprimida por la presencia de glucosa<sup>17</sup>. La transcripción puede ser inducida por medio de la remoción de la glucosa y la adición de galactosa como FCE<sup>18</sup>. El crecimiento de las células en glucosa conduce a una mayor represión y una menor transcripción basal del promotor GAL1. La transferencia de las células desde glucosa a un medio con galactosa causa que este promotor se desreprima y permite la inducción de la transcripción. Alternativamente las células pueden ser mantenidas en un medio conteniendo rafinosa como FCE. La presencia de rafinosa no reprime ni induce la transcripción del promotor GAL1. La adición de galactosa al medio induce la transcripción del promotor incluso en presencia de rafinosa. Esta segunda opción permite que la inducción ocurra más rápidamente<sup>19</sup>. Sin embargo, el costo de la rafinosa es muy alto respecto al de la glucosa. Es por esto que se decidió estudiar la expresión del gen *pg1* clonado en pYES2 por parte del clon 1 de *S. cerevisiae* INVSc1, cuando es cultivado en glucosa o en rafinosa como FCE. Los resultados se presentan en la Figura 5.4, donde se observa que los perfiles de expresión son muy similares, alcanzándose niveles de actividad PG1 equivalentes. Por este motivo, se decidió continuar los cultivos utilizando glucosa como FCE. Por otro lado, se observa en la Figura 5.5, las velocidades de crecimiento son distintas para cada FCE. Cuando se trata de glucosa, esta velocidad es marcadamente mayor que la obtenida cuando se emplea rafinosa. Además, el crecimiento de la biomasa en la fase de inducción es más lento que en fase exponencial, confirmando que la expresión de la enzima recombinante le provoca a la célula cierto stress que retrasa su crecimiento.



**Figura 5.4:** Cinética de producción de PG1 a partir del clon 1 de *S. cerevisiae* INVSc1, crecido en medio sintético conteniendo rafinosa o glucosa como FCE en frascos agitados, a partir de las 12 h de crecimiento (momento de inducción con galactosa). ◆: glucosa como FCE. ◇: rafinosa como FCE.



**Figura 5.5:** Cinética de crecimiento del clon 1 de *S. cerevisiae* INVSc1, crecido en medio sintético conteniendo rafinosa o glucosa como FCE en frascos agitados. A las 12 h se realiza la inducción con galactosa (se observa una dilución de la biomasa). ▼: glucosa como FCE. ▽: rafinosa como FCE.

Una vez seleccionada la FCE más adecuada, se decidió estudiar el efecto de la FN. Los primeros cultivos se realizaron en sulfato de amonio tal como es indicado por el fabricante. Sin embargo, como *S. cerevisiae* es un microorganismo Ureasa+, se evaluó el efecto de este cambio de FN. Los resultados de producción de enzima fueron similares a los encontrados en el caso anterior, es decir, tanto el perfil de la cinética de la producción de PG1 como la cantidad de unidades de actividad enzimática fueron los mismos utilizando ambas FN.

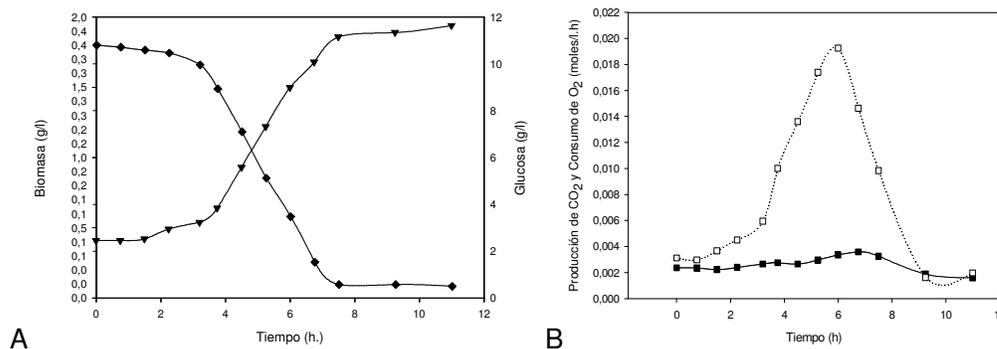
El incremento de pH en los cultivos realizados con urea como FN es un buen indicador del agotamiento de la FCE ya que la urea es hidrolizada en forma periplasmática liberando  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$  y mientras haya FCE en el medio, el  $\text{NH}_3$  es consumido por la biomasa. Cuando la FCE se agota, el  $\text{NH}_3$  se libera al medio de cultivo, incrementando rápidamente el valor del pH del mismo. Este es una consecuencia de cuidado en este caso debido a que la PGasa de *A. kawachii* es inestable a partir de valores de pH superiores a 6,0 propiedad compartida por PGasas de otro origen <sup>5, 6,7</sup>. Si bien el uso de una sal de amonio simplifica el proceso de esterilización (puede hacerse en autoclave conjuntamente con el resto del medio), un

proceso en el que se utiliza una sal de amonio como FN se caracteriza por un descenso continuo de pH. Este motivo llevó a preferir el empleo de urea como FN ya que de esta forma se evita el excesivo aumento de la osmolaridad del medio debido a la adición constante de ácido o base para mantener el pH constante.

### 5.3.2 Cultivos en batch a escala de biorreactor

Una vez determinados la FCE y FN más adecuados para llevar a cabo los cultivos, se estudiaron los parámetros de crecimiento del microorganismo.

Cabe destacar que en los cultivos realizados en biorreactor el pH fue mantenido constante (a pesar del uso de urea como FN) por medio del control automático del sistema por medio de agregado de NaOH (0,5 N) o de HCl (0,5 N), según fuera necesario para evitar posibles fluctuaciones de este parámetro. En la Figura 5.6 se observa el perfil de crecimiento, concentración remanente de FCE, consumo de O<sub>2</sub> (rO<sub>2</sub>) y producción de CO<sub>2</sub> (rCO<sub>2</sub>) durante el cultivo en biorreactor operado en sistema batch. Se observa que a las 8,5 h se consume la totalidad de la FCE, alcanzando una concentración final de biomasa de 1,9 g/l (antes de la inducción). La velocidad específica crecimiento máxima ( $\mu_m$ ) fue de 0,28 h<sup>-1</sup>. En el momento de máximo consumo de O<sub>2</sub> el valor del O<sub>2</sub> disuelto es 60 % del valor de saturación, lo cual indica que el cultivo transcurrió sin limitación en oxígeno.

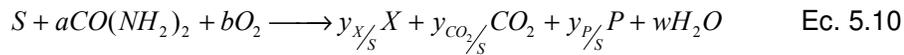


**Figura 5.6:** Perfiles de crecimiento, de consumo de glucosa y de O<sub>2</sub>, producción de biomasa y de CO<sub>2</sub> durante el cultivo en batch de *S. cerevisiae* INVSc1 conteniendo la construcción pYES2:pg1ΔI. Volumen de biorreactor de 1,5 l (1,1 l volumen de medio). Condiciones de operación: 450 rpm y 30°C. A: glucosa residual (◆); concentración de biomasa (▼) B: producción de CO<sub>2</sub> (□); consumo de O<sub>2</sub> (■).

El perfil de rO<sub>2</sub> y rCO<sub>2</sub>, con un CR mayor que 1, muestra el comportamiento típico de metabolismo de sobreflujo en el que parte del poder reductor obtenido durante la etapa de fosforilación a nivel de sustrato es re oxidado en forma anaeróbica con la

concomitante obtención de etanol y  $\text{CO}_2$ . Este hecho es razonable considerando el efecto Crabtree positivo que presenta esta levadura en condiciones aeróbicas cuando crece a  $\mu_m$ .

Teniendo en cuenta ese comportamiento metabólico se propuso el siguiente modelo de crecimiento para *S. cerevisiae INVSc1* en medio sintético:



donde S es la FCE,  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  es urea, X es biomasa, a y b son los coeficientes estequiométricos para urea y  $\text{O}_2$  (mol de urea y  $\text{O}_2$  consumido por c-mol de FCE consumida, respectivamente), mientras que  $y_{X/S}$ ,  $y_{P/S}$  e  $y_{\text{CO}_2/S}$  son los coeficientes de rendimiento para biomasa, producto y  $\text{CO}_2$  (c-mol de biomasa y  $\text{CO}_2$  producida por c-mol de FCE consumida, respectivamente).

Debido a que no se midió urea en forma experimental, el valor del coeficiente a se determinó por cálculo en base al balance de nitrógeno mediante la expresión:  $a = 0,2 \times y_{X/S}$ , asumiendo una fórmula mínima de biomasa estándar ( $\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$ ). Todos los demás coeficientes se determinaron en forma experimental. El valor de los coeficientes b e  $y_{\text{CO}_2/S}$  se calcularon a partir de las medidas de consumo de  $\text{O}_2$  y producción de  $\text{CO}_2$  que surgen de un balance de materia en fase gaseosa<sup>20</sup>.

Las Ecs 5.11 y 5.12 muestran los balances de carbono (BC) y energía (By)<sup>21</sup>, los cuales permiten observar si existe consistencia interna en los resultados experimentales obtenidos.

$$\text{BC: } a+1 = y_{X/S} + y_{\text{CO}_2/S} + y_{P/S} \quad \text{Ec. 5.11}$$

$$\text{By: } 1 = y_{X/S} \gamma_X / \gamma_S + y_{P/S} \gamma_P / \gamma_S + 4b / \gamma_S \quad \text{Ec. 5.12}$$

Donde  $\gamma_X$  y  $\gamma_S$  representan los grados de reducción de biomasa y sustrato respectivamente, los cuales son definidos como el número de electrones disponibles que son transferidos al  $\text{O}_2$  durante la combustión de un c-mol de biomasa y FCE. Mediante el uso de balances elementales se demuestra formalmente que para un c-mol de cualquier sustancia genérica  $\text{CH}_a\text{O}_b\text{N}_c$ ,  $\gamma = 4 + a - 2b - 3c$  (tomando como referencia  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ ). Con base en lo anterior,  $\gamma_X = 4,2$  (para biomasa estándar) y  $\gamma_S = 4$ .

La Tabla 5.5 muestra los parámetros estequiométricos del cultivo y los resultados de

los BC y  $B_y$  obtenidos para el cultivo en batch en biorreactor. La concordancia de los valores obtenidos experimentalmente con los esperados para los balances de carbono (0,95) y de grado de reducción (1,05) indica que no hay generación de ningún otro producto carbonado diferente de biomasa, etanol y  $\text{CO}_2$ . Además se comprueba que el modelo planteado representa adecuadamente el crecimiento de *S. cerevisiae*.

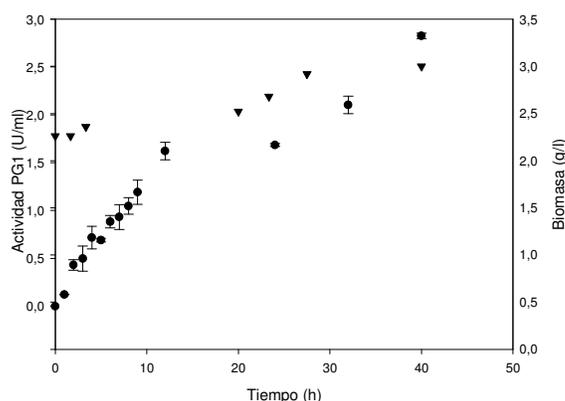
**Tabla 5.5** Parámetros estequiométricos del cultivo de *S. cerevisiae* en sistema batch.

$\text{O}_2$ total consumido (mmoles)	$\text{CO}_2$ total producido (mmoles)	$y_{x/s}$ (c-mol)	$y_{\text{CO}_2/s}$ (c-mol)	b (c-mol)	$y_{p/s}$ (c-mol)	a (c-mol)	BC	$B_y$
28,30	101,2	0,173	0,291	0,082	0,523	0,0345	0,95	1,05

BC: balance de carbono.  $B_y$ : balance de energía

Una vez determinados los parámetros estequiométricos y cinéticos de crecimiento de esta cepa, los cultivos fueron inducidos por medio del agregado de un pulso de galactosa. A partir de esto, se determinaron las proteínas en el sobrenadante por la técnica de Bradford<sup>9</sup> y se analizaron por medio de SDS-PAGE teñidos con Coomassie Brilliant Blue. Del mismo modo se determinó la producción de PG1 mediante medida de la actividad enzimática.

La biomasa total obtenida en este sistema de cultivo después de la inducción fue de 2,2 g/l y las proteínas totales obtenidas fueron de 10 mg/l.



**Figura 5.7:** Perfil de crecimiento de *S. cerevisiae* recombinante ( $\blacktriangledown$ ) y de la cinética de expresión de PG1 ( $\bullet$ ) en cultivo batch en reactor de 1,1 l, a 30°C y 450 rpm, pH: 4,5 (controlado). El tiempo cero se refiere a Tiempo cero de inducción.

Tal como puede observarse en la Figura 5.7, la actividad alcanzada en sistema batch en reactor ( $\cong 3$  U/ml) fue superior a la encontrada en frascos agitados ( $\cong 1,8$  U/ml). Esto puede deberse en parte al control de pH que puede realizarse en este tipo de sistema. Tal como fue indicado por Contreras<sup>22</sup>, PG1 es estable en un rango de pH de 2,5 a 5. Es posible que debido a esto, cuando se realizan cultivos en erlenmeyer, en los que el pH supera el valor de 5,0, la actividad resultante es menor que en el reactor, donde fue posible mantener el pH en 4,5, valor óptimo para esta actividad enzimática.

### 5.3.3 Cultivos en sistema batch alimentado

Una vez realizados los cultivos en sistema batch y determinados los parámetros estequiométricos y cinéticos del mismo, se decidió realizar un estudio de la inducción de PG1 luego de cultivar la levadura en sistema batch alimentado. Esta estrategia se implementó a fin de evitar la acumulación de etanol típica del cultivo batch que origina una reducción en la cantidad final de biomasa antes de inducir y, consecuentemente, disminuye el rendimiento en la proteína de interés. En base a los datos estequiométricos y cinéticos para *S. cerevisiae* INVSc1 obtenidos en sistema batch y usando las ecuaciones de diseño para batch alimentado (Ec. 5.5 y 5.7) se definieron las condiciones de alimentación para dicho cultivo. Se fijaron las siguientes parámetros para la alimentación:  $X_0 = 2,20$  g/l,  $X_f = 15$  g/l (antes de la inducción),  $V_0 = 0,8$  l y  $V_f = 1,12$  l,  $S_r = 320$  g/l y  $F = 10$  ml/h,  $\mu_m = 0,28$  h<sup>-1</sup>,  $y_{x/s}(c-mol) = 0,173$ .

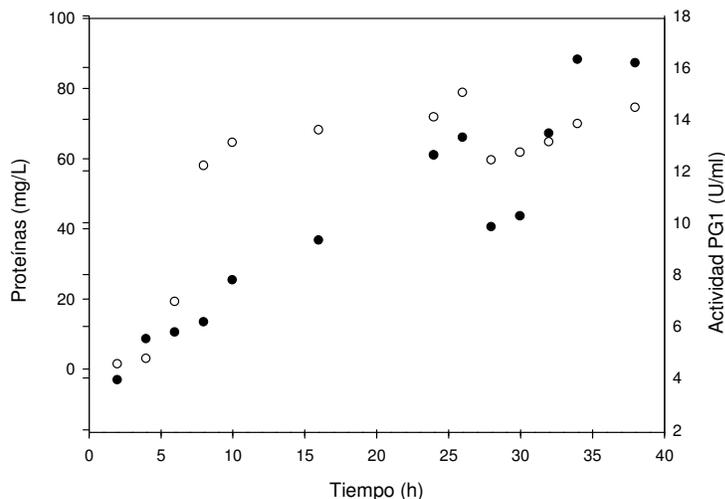
La levadura recombinante fue inoculada en un reactor con un volumen final de 800 ml desde un pre-cultivo de 200 ml crecido en el medio sintético SC (modificado, 10 g/l) y fue cultivado en batch hasta fase estacionaria. Una vez finalizado el cultivo batch, el batch alimentado fue iniciado con una alimentación constante de medio SC concentrado. Se tomaron muestras de 20 ml a intervalos regulares y se analizaron en términos de biomasa, contenido de etanol y de sustrato. La concentración de biomasa total obtenida en este sistema de cultivo antes de la inducción fue de 11,11 g/l.

Una vez finalizada la alimentación con glucosa, el cultivo fue inducido por medio del agregado de un pulso de medio SC conteniendo galactosa. A intervalos regulares se tomaron muestras de 10 ml y se analizaron en términos de biomasa y producción de PG1. La cantidad de PG1 producidas fue evaluada mediante determinación de actividad enzimática y cantidad de proteína por la técnica de Bradford. Las proteínas totales secretadas en el batch alimentado fueron de 67 mg/l, con una actividad de 12,2 U/ml.

La actividad PG1 alcanzada en el sistema batch es superada ampliamente por los valores obtenidos en el cultivo batch alimentado. Esto puede deberse a que la

cantidad de biomasa alcanzada en el primero al momento de la inducción (1,92 g/l) es notablemente menor que la del segundo (11,11 g/l).

Visto los resultados logrados, se intentó incrementar la actividad enzimática alcanzada mediante el uso de alguna alternativa en el manejo del proceso. En la bibliografía se han reportado experimentos similares al descrito, pero con una segunda etapa de inducción por galactosa<sup>23, 24</sup>. Por lo tanto, se estimó conveniente realizar un batch alimentado similar al anterior, pero seguido de una segunda etapa de inducción con galactosa (en idénticas condiciones que la primera). A partir de este ensayo, se lograron 18 g/l de biomasa, 73,6 mg/l de proteína y 16 U/ml de PGasa, valores que en todos los casos superan a los alcanzados con una sola etapa de inducción (Figura 5.8).



**Figura 5.8:** Perfil de crecimiento de producción de proteínas (○) y de actividad PG1 (●) por *S. cerevisiae* recombinante en cultivo batch alimentado. En este caso se realizaron dos inducciones, la primera a t = 0 h y la segunda a t = 25 h.

Finalmente, se ensayó una estrategia de inducción en la que la galactosa fue alimentada junto con la glucosa del reservorio de alimentación. La idea de esta estrategia se basaba en el hecho que durante la alimentación la concentración de glucosa en el reactor debe ser cercana a cero. De esta forma, el promotor GAL no estaría reprimido, y el gen *pg1* debería ser expresado. A partir de este ensayo, se obtuvieron 19,7 g/l de biomasa final, 54 mg/l de proteínas y 50 U/ml de actividad PGasa. Evidentemente, de las estrategias de inducción evaluadas esta última aparenta ser la más conveniente. Cabe destacar, además, la productividad de este

sistema, ya que esas unidades de actividad fueron obtenidas en sólo 30 h de alimentación (en lugar de las 72 h de la estrategia utilizando dos pulsos de galactosa). Este es un factor de suma importancia en términos de obtención de proteína activa, debido a la potencial degradación a la que se expone la proteína recombinante cuando los tiempos de cultivo son extremadamente largos.

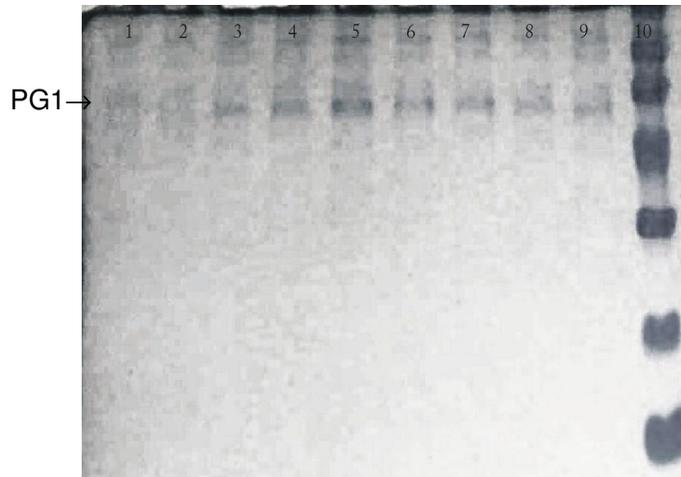
### 5.3.4 Purificación de la PG1 recombinante

La purificación de la PG1 recombinante se realizó a partir de 2 l de sobrenadante de una serie de cultivos en sistema batch alimentado. El mismo fue concentrado 10 × a presión reducida previo ajuste del pH a 3,0, alcanzando una recuperación del 90-95 % de la actividad. Por otro lado, y como alternativa, se evaluó la concentración de la enzima por medio de liofilización sobre un volumen de 100 ml de sobrenadante crudo. Sin embargo, se observó que al liofilizar la muestra de cultivo sin la presencia de un crioprotector, la actividad PGasa, a pH 2,5, se perdía completamente. Por lo tanto, se adoptó la concentración en rotavapor como etapa primaria de concentración. Luego, se efectuó una nueva etapa de concentración, esta vez por precipitación. Estas técnicas son en general de baja selectividad, pero eliminan contaminantes de bajo peso molecular. Se ensayaron dos alternativas de precipitación: con sulfato de amonio y con acetona. Los mejores resultados se obtuvieron con acetona y las condiciones de precipitación finalmente seleccionadas fueron las siguientes: relación acetona/concentrado: 2,5/1,0, temperatura: 0-2°C similares a las condiciones propuestas por Contreras *et al.*<sup>22</sup> para la proteína silvestre. Luego de centrifugar, el sobrenadante se desechó y el pellet se disolvió en BCP (pH 5,0) a una concentración 10 × respecto del volumen original de concentrado. La recuperación de la actividad enzimática de este paso fue del 85-90 %. El concentrado obtenido se dializó frente al buffer de equilibrio de la cromatografía de intercambio catiónico (CICA).

Las condiciones de separación de la CICA se establecieron en ensayos preliminares usando la matriz de la cromatografía (Sephacosa SP FF) en sistemas tipo batch a distintos valores de pH. De estos ensayos se determinó que la mejor condición de absorción de la proteína a la matriz es a pH 3,0 (Figura 5.9). En dicha condición, la proteína no fue degradada y es completamente adsorbida.

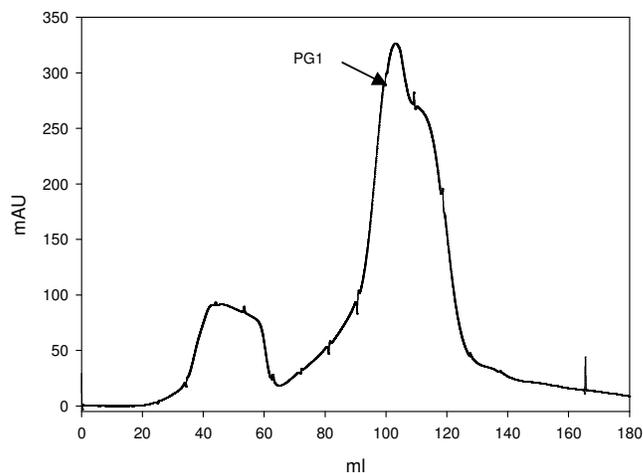
A pH 3,0 la PGasa ácida se adsorbió fuertemente a la matriz catiónica, mientras que la mayoría de las proteínas contaminantes fueron eliminadas en la etapa de lavado de la columna. El lavado se efectuó con buffer BCP ¼. La elución se llevó a cabo con un gradiente de NaCl en el rango 0-1,0 M obteniéndose un pico de actividad a una

concentración 0,3 M de NaCl, mientras que a mayor fuerza iónica eluyeron sustancias coloreadas. Esta etapa de alta resolución fue sumamente efectiva para purificar la PGasa, obteniéndose una solución de enzima altamente concentrada. Las fracciones activas correspondientes al 80-90 % de la actividad recolectada (se descartaron las fracciones de los extremos del pico) se juntaron y dializaron. Las pérdidas de actividad en las operaciones de la CIAN fueron del orden del 35 %.



**Figura 5.9:** SDS-PAGE correspondiente a la adsorción de PG1 a la matriz de intercambio catiónico en batch. Calles 1-5: sobrenadantes obtenidos luego de la adsorción a distintos valores de pH (2,5, 3,0; 3,5; 4,0 y 4,5). Calles 6-9: enzima incubada en buffer a los mismos valores de pH sin interaccionar con la matriz. Calle 10: LMWM.

La última etapa de la purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular para el pulido final. Esta etapa permitió eliminar compuestos de bajo peso molecular y algunas proteínas que se adsorbieron a la CICA en las condiciones seleccionadas. En esta etapa se observó un pico único de actividad PGasa. Las fracciones activas fueron colectadas, dializadas frente a BCP  $\frac{1}{4}$  y empleadas para los estudios de caracterización que se detallan a continuación (Figura 5.10)



**Figura 5.10:** Perfil de elución de la PGasa ácida recombinante en la cromatografía de intercambio catiónico (Sephacrose SP). Columna: XK 26/20, 60 ml gel. Lavado: 150 ml de BCP  $\frac{1}{4}$  Elución: gradiente de NaCl (0 a 1,0 M en BCP  $\frac{1}{4}$ ). Caudal: 3 ml/min, Volumen de fracción: 5 ml.

En la Tabla 5.6 se resumen los resultados obtenidos en las distintas etapas del proceso de purificación de PGasa ácida recombinante.

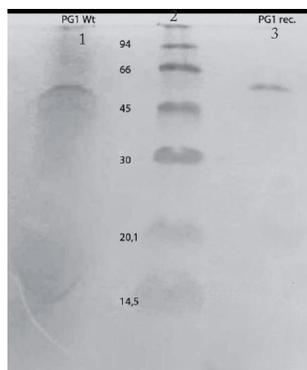
**Tabla 5.6:** Resumen del procedimiento de purificación de la PGasa ácida recombinante.

Paso de purificación	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)
Concentración por evaporación rotatoria	16.000,0	31,6	506,3	100,0
Captura en Sepharosa SP	10.398,3	20,9	496,8	65,0
Exclusión molecular	4.235,0	4,23	773,7	26,5

### 5.3.5 Caracterización de la PG1 recombinante

#### 5.3.5.1 Peso molecular y Punto isoeléctrico

La purificación de la PG1 recombinante fue verificada por medio de un SDS-PAGE teñido con Coomassie Brilliant Blue (coloidal), resultando en una muestra homogénea de proteína luego de la cromatografía de exclusión molecular (Figura 5.11).



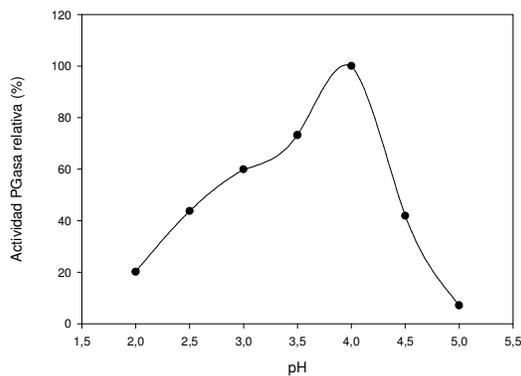
**Figura 5.11:** SDS-PAGE correspondiente a las PG1 recombinante y silvestre. Calle 1: proteína silvestre de *A. kawachii* purificada. Calle 2: LMWM. Calle 3: PG1 recombinante de *S. cerevisiae* purificada.

Esta fracción de proteína purificada fue empleada para su caracterización. El peso molecular estimado por SDS-PAGE fue  $60 \pm 1,15$  kDa. En el IEF se observa la presencia de una banda grande en la zona de pI 3,5-3,6. A partir del SDS-PAGE y el IEF se verifica que el producto final de la purificación es electroforéticamente homogéneo. Por otro lado, al realizar el SDS-PAGE de las dos proteínas (silvestre y

recombinante), se observan bandas de RF similares.

### 5.3.5.2 Efecto de pH sobre la actividad enzimática

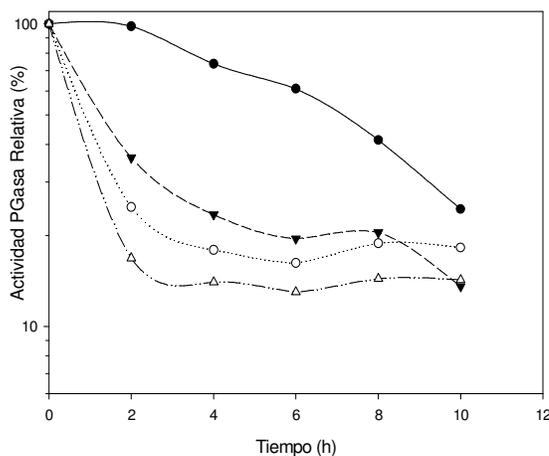
El perfil pH/actividad de PGI se muestra en la Figura 5.12. El pH óptimo para la hidrólisis de APG se desplazó hacia la región menos ácida (pH 4,0) pero manteniendo un 45 % de actividad a pH 2,5. Los valores de actividad con APG a pH < 2,5 deben interpretarse con precaución debido a la baja solubilidad del sustrato en ese rango de pH. La propiedad más resaltante de la enzima fue su capacidad de actuar a pH < 3,0 y de ser inactiva a pH 5,0, condiciones opuestas a las que exhiben la mayoría de las PGasas fúngicas.



**Figura 5.12:** Perfil de actividad relativa de PG1 a distintos valores de pH. El efecto del pH sobre la actividad fue determinado utilizando un buffer cítrico fosfato ajustado a distintos valores de pH. La actividad enzimática se determinó en condiciones estándar.

### 5.3.5.3. Estabilidad térmica

Los experimentos realizados para determinar la estabilidad térmica de PG1 mostraron que a 50 °C, la enzima purificada es estable por 2 h, mientras que a temperaturas mayores, este tiempo se reduce drásticamente (Figura 5.13). Cabe destacar que estos ensayos fueron llevados a cabo con la enzima purificada, lo que puede ejercer un efecto negativo sobre la estabilidad de la proteína.



**Figura 5.13:** Estabilidad térmica de PG1 recombinante. Actividad residual medida luego de incubación distintas temperaturas. Las soluciones de enzima fueron incubadas a las temperaturas indicadas y a determinados intervalos de tiempo, muestras fueron tomadas, enfriadas y usadas para determinar la actividad residual bajo condiciones estándares. Condiciones de incubación: BCP, concentración de proteína 0,6-1,0 µg/ml. ● 50 °C, ▼ 55 °C, ○ 60 °C, △ 70 °C.

#### 5.3.5.4. Mapeo peptídico de las proteínas silvestre y recombinante

Se escindió una banda de proteína con actividad PGasa de un PAGE, se digirió con tripsina y analizó por MALDI ToF/ToF. Al analizar los resultados con la base de datos NCBI nr se encontraron similitudes con algunos péptidos de una protopectinasa-AS de *A. awamori* (gi|7707789). Este péptido (K.FFYAHDLDDSKISGLYIK.N) también comparte considerable similitud con una PGaA de *A. kawachii* (gi|22450158) y una endo poligalacturonasa de *A. niger* (gi|145252974). Estos resultados también son indicativos de la expresión exitosa del gen que codifica para PG1 de *A. kawachii* por *S. cerevisiae*. El link al resultado obtenido en dicho análisis es el que se detalla a continuación:

[http://www.matrixscience.com/cgi/master\\_results.pl?file=../data/20081114/FtTmliYES.d](http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20081114/FtTmliYES.d)  
at

## 5.4 Conclusiones

Muchas proteínas se producen hoy en día por medio de la tecnología de DNA recombinante. Sin embargo, estos procedimientos pueden presentar algunos problemas cuando se pretende aumentar la escala de producción. Se ha estudiado el efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento de levaduras recombinantes, demostrándose que el DNA foráneo origina un gran estrés metabólico<sup>25,26</sup>. En el presente capítulo se determinó que el cultivo de *S. cerevisiae* INVSc1 en biorreactor permite una mayor producción de biomasa y, consecuentemente, de proteína recombinante, con respecto a los cultivos en frascos agitados, por los problemas de transferencia de materia que presentan estos últimos. Además, los cultivos en

bioreactor se realizaron en condiciones de pH controlado (pH 4,5 al momento de inducir), mientras que en frascos agitados este control no es posible. El incremento en la actividad enzimática obtenida en bioreactor indica que las condiciones controladas de este sistema favorecen la estabilidad de la proteína recombinante en el medio de cultivo. Del mismo modo, a partir del cultivo batch alimentado con glucosa seguido por una simple inducción con galactosa fue posible lograr una mayor densidad celular y, consecuentemente, mayores concentraciones de proteína. Sin embargo, el batch alimentado con una mezcla de glucosa y galactosa (simultáneamente) resultó ser la mejor opción de todas las estudiadas en cuanto a productividad de enzima. En este sistema, la concentración de glucosa en el reactor es cercana a cero, permitiendo la transcripción del promotor inducible por galactosa. Si bien la concentración de biomasa alcanzada fue similar a la del cultivo batch alimentado con glucosa e inducido con un pulso de galactosa, en el sistema alimentado con los dos azúcares en simultáneo la proteína de interés es producida en menor tiempo, por lo tanto la exposición a degradación proteolítica es menor, resultando en mayor actividad enzimática.

Asimismo, se desarrolló una estrategia de purificación que permitió obtener una solución electroforéticamente homogénea de proteína. Cabe destacar la importancia del desarrollo del proceso de purificación en paralelo con el diseño de la fermentación, ya que de esta forma la purificación de la proteína resulta más simple.

A continuación, se llevó a cabo la caracterización de la proteína clonada, concluyendo que la misma tiene idénticas propiedades bioquímicas que la proteína silvestre acidofílica de *A. kawachii*, lo cual confirma que el clonado y sobreexpresión de *pg1* en *S. cerevisiae* fue exitoso.

Finalmente, se debe mencionar la necesidad de continuar los presentes estudios para evaluar la aplicación de PG1 recombinante en diferentes procesos industriales a los efectos de optimizar las condiciones de empleo de la misma. En este sentido, la búsqueda de nuevas aplicaciones biotecnológicas para la enzima debe resaltarse en virtud de sus peculiares características aquí expuestas.

## 5.5 Referencias Bibliográficas

1. Thiry,M. & Cingolani,D. Optimizing scale-up fermentation processes. *Trends in Biotechnology* 20, 103-105 (2002).
2. Käpelli,O. Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* 28, 181-208 (1986).
3. Postma,E., Verduyn,C., Scheffers,W.A., & van Dijken,J. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucos limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 468-477 (1989).
4. Mendoza-Vega,O. Industrial production of heterologous proteins by fed-batch cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol* 15, 369-410 (1994).
5. Pardo,C., Lapeña,M.A., & Gacto,M. Purification and characterization of an extracellular exopolysaccharuronase from *Geotrichum lactis*. *Can. J. Microbiol.* 37, 974-977 (1991).
6. Blanco,P., Sierio,C., Diaz,A., & Villa,T.G. Production and partial characterization of an endopolysaccharuronase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* 40, 974-977 (1994).
7. Cavalitto,S.F., Hours,R.A., & Mignone,C.F. Quantification of protopectinase SE, an endopolysaccharuronase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnol Tech* 13, 385-390 (1999).
8. Pirt,S.J. *Principles of microbe and cell cultivation* Oxford, England, 1975).
9. Bradford,M.M. 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 (1976).
10. Somogyi,N. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19-23 (1952).
11. Smith B.J. *Methods in Molecular Biology*. . (ed. Walker JM,E.e.) 41-56 New Jersey, 1984).
12. Bergmeyer,H.U. & Bernt,E. *Methods of enzymatic analysis*(Academic press, New York, 1977).
13. García-Garibay,M., Gomez-Ruiz,L., & Bárzana,E. Studies on the simultaneous production of single cell protein and polysaccharuronase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotech. Lett.* 9, 411-416 (1987).
14. Krogh,A. *et al.* Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* expressing a heterologous protein. *J Biotechnol* 137, 28-33 (2008).
15. Görgens,J., van Zyl,W.H., Knoetze,J., & Hahn,M.G. The Metabolic Burden of the PGK1 and ADH2 Promoter Systems for Heterologous Xylanase Production by *Saccharomyces cerevisiae* in Defined Medium . *Biotechnol Bioeng* 73, 238-245 (2000).

16. Contreras Esquivel, J.C. Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*. 127-151. 2003. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
17. West, R.W.J., Yocum, R.R., Yocum, R.R., & Ptashne, M. Saccharomyces cerevisiae GAL1-GAL10 Divergent Promoter Region: Location and Function of the Upstream Activator Sequence UASG. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2467-2478 (1984).
18. Giniger, E., Barnum, S.M., & Ptashne, M. Specific DNA Binding of GAL4, a Positive Regulatory Protein of Yeast. *Cell* 40, 767-774 (1985).
19. Guthrie, C. & Fink, G. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1990).
20. Cooney, C.L., Wang, H., & Wand, D. Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. *Biotechnol Bioeng* 19, 55-67 (1977).
21. Erickson, L.E., Minkevich, I.G., & Eroshin, V.K. Application of mass and energy balance regularities in fermentation. *Biotechnol Bioeng* 20, 1595-1621 (1978).
22. Contreras Esquivel, J.C. & Voget, C.E. Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *J Biotechnol* 110, 21-28 (2004).
23. Chung, B.H., Seo, D.J., Nam, S.W., Na, J.G., & Chang, Y.K. Optimization of feeding strategy for overproduction of human lipocortin-I in *Saccharomyces cerevisiae* controlled by the GAL10 promoter. *J Ferment Bioeng* 84, 466-470 (1997).
24. Chung, B.H., Kim, B.-M., Rhee, S.K., Park, Y.H., & Nam, S.W. Effect of Galactose Feeding Strategy on Heterologous Human Lipocortin-I Production in the Fed-Batch Culture of *Saccharomyces cerevisiae* Controlled by the GAL10 promoter. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 5, 224-228 (1995).
25. Copella, S. & Dhurjati, P. A detailed analysis of *Saccharomyces*. *Chem. Eng. J.* 41, b27-b35 (1989).
26. Alexander, M. & Jeffries, T. Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeasts. *Enzyme Microbiol. Technol.* 2-19 (1990).

## Capítulo 6

*P*onclusiones Generales



## Conclusiones Generales

En el presente trabajo se estudiaron 3 enzimas fúngicas extracelulares capaces de mantener su actividad en condiciones extremas de pH. Estas enzimas, dos  $\alpha$ -L-ramnosidasas (Rhasas) alcalinas de los hongos filamentosos *Acrostalagmus luteo-albus* y *Acremonium murorum* y una poligalacturonasa ácida (PG1) de *Aspergillus kawachii*, fueron producidas bajo diferentes condiciones y caracterizadas bioquímicamente. La producción de estas enzimas extremófilas se abordó utilizando dos estrategias. En primer lugar, utilizando microorganismos silvestres (para las dos Rhasas) y, en segundo lugar, a través del clonado y sobre expresión del gen que codifica para el biocatalizador en un huésped adecuado (para PG1). En ambas estrategias se analizaron diferentes variables de proceso involucradas en la producción enzimática para luego purificar y caracterizar a las respectivas enzimas.

A partir de los objetivos planteados y los resultados obtenidos es posible arribar a las siguientes conclusiones generales:

- La fermentación en sustrato sólido, utilizando perlita impregnada con diferentes medios, es un sistema de cultivo adecuado para simular ambientes naturales a fin de estudiar la producción de enzimas fúngicas extracelulares. Todos los hongos alcalinofílicos estudiados en este caso mostraron un perfil metabólico heterogéneo debido a su capacidad de crecer utilizando diferentes FCE. Los mismos pueden ser empleados como fuentes alternativas de actividades enzimáticas alcalinas, relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal, con potenciales aplicaciones industriales. En particular, de los hongos estudiados, *A. luteo-albus* resultó ser el más interesante debido a que posee una gran versatilidad respecto al crecimiento y la producción de enzimas alcalinas extracelulares, siendo capaz de depolimerizar las ramificaciones laterales de las regiones pilosa y lisa de la pectina.
- Se estudiaron dos proteínas con actividad Rhasa producidas por los hongos alcalofílicos *A. luteo-albus* y *A. murorum*. La síntesis de la enzima en ambos microorganismos está regulada por un mecanismo de inducción y represión catabólica similar al que ocurre con la mayoría de las glicosidasas fúngicas. El mejor inductor para ambas Rhasas fue la ramnosa, obteniéndose valores de dicha actividad en *A. murorum* muy superiores a los alcanzados en *A. luteo-albus*. Ambas Rhasas fueron purificadas y caracterizadas. Particularmente, se determinaron las condiciones óptimas de reacción frente a distintos sustratos. La propiedad más representativa de estas enzimas cuando

se las compara con otras Rhasas fúngicas, es su capacidad para hidrolizar sustratos solubles e insolubles en el rango de pH 8,5-9,5. Las Rhasas descritas en este trabajo muestran una amplia capacidad para hidrolizar distintos sustratos, lo que permite suponer su potencial aplicación en procesos biotecnológicos tales como la hidrólisis industrial de ramnósidos.

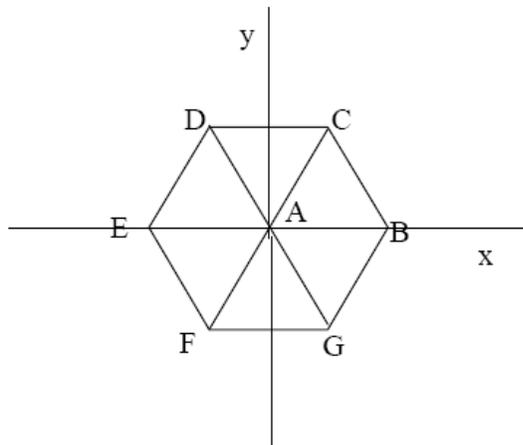
- El gen que codifica para PG1 de *A. kawachii* se clonó y sobreexpresó en *S. cerevisiae*. El intrón presente en el gen debió ser removido *in Vitro* para lograr la expresión de la proteína. Sin embargo, el péptido señal fue correctamente reconocido por *S. cerevisiae*, por lo que la proteína fue exportada al medio de cultivo. Esta estrategia permitió obtener altos niveles de PG1, lo que permitiría su aplicación en procesos Biotecnológicos.
- El empleo de un biorreactor tipo tanque agitado para la fermentación de *S. cerevisiae* INVSc1, permitió una mayor producción de biomasa y, consecuentemente, de proteína recombinante, con respecto a los cultivos en frascos agitados, por los problemas de transferencia de materia y de control de pH que presentan estos últimos. El batch alimentado con una mezcla de glucosa y galactosa (simultáneamente) resultó ser la mejor opción en cuanto a productividad de enzima. Como la proteína de interés es producida en menor tiempo, la exposición a degradación proteolítica es menor, resultando en una mayor actividad enzimática. Por último, a partir de la caracterización de la proteína recombinante, se determinó que la misma tiene las mismas características que la proteína silvestre acidofílica de *A. kawachii*.
- La experiencia adquirida durante la realización de la presente Tesis Doctoral abre la posibilidad de continuar con esta línea de trabajo, específicamente con la búsqueda, caracterización y aplicación de nuevos biocatalizadores de potencial aplicación industrial, particularmente a partir de microorganismos extremófilos.

## Anexo 1



## Diseño experimental: Método de Doehlert

El método de Doehlert es un diseño de superficie de respuesta en el que los puntos experimentales se eligen de forma tal que queden equidistantes de un punto central. Este diseño permite describir una región alrededor de una respuesta óptima y contiene  $k^2 + k + 1$  puntos, donde  $k$  es el número de variables <sup>1,2</sup>. Si se estudia el efecto de dos variables, como se hizo en este trabajo, deben estudiarse la respuesta en 7 puntos distintos, uno central y 6 distribuidos alrededor de él. La figura resultante en este caso es un hexágono. En este caso la cantidad de experimentos necesarios son 9 debido a que el punto central se realiza por triplicado para determinar la varianza propia del experimento.



**Figura A1:** Puntos del hexágono utilizados en el diseño de las superficies de respuesta.

A fin de determinar el valor en todos los puntos de las variables  $x$  e  $y$ , y para asegurar que estos estén equidistantes se toma como imagen generatriz al triángulo equilátero ABC de lado unitario y se determina la posición de cada punto tomando arbitrariamente al punto A como  $x = 0$ ,  $y = 0$ . Teniendo en cuenta este valor, los extremos del triángulo quedan situados en:

A (0.000, 0.000)

B (1.000, 0.000)

C (0.500, 0.866)

El resto de los extremos del hexágono se ubican en los siguientes puntos.

D (-0.500, 0.866)

E (-1.000, 0.000)

F (-0.500, -0.866)

G (0.500,-0.866)

A fin de generalizar las coordenadas de los vértices de la figura característica del modelo (en este caso el hexágono) se aprovecha la propiedad de que cada punto surge de la sustracción de dos puntos cualesquiera de la figura generatriz (en este caso el triangulo ABC). Por ejemplo, el punto D resulta de C – B, E resulta de A – B, etc. Este cálculo resulta poco útil en el caso de trabajar con dos variables debido a la simpleza de la figura pero es muy práctico cuando el modelo se complica y se usan tres variables o más.

Las coordenadas del hexágono se denominan variables codificadas y a partir de ellas se calculan los valores reales de las variables x e y. Para ello se deben definir los límites del universo muestral, es decir, los valores máximos y mínimos de las variables a ensayar. En base a ellos se calculan los rangos para cada variable (real) y se calcula el resto de los puntos basándose en una relación lineal entre el valor codificado y el valor real según la expresión:

$$x_{real} = x_{codif} \times \frac{\Delta x_{real}}{\Delta x_{codif}} + x_0$$

Donde  $X_0$  es el valor real del punto central del diseño (el valor central del rango correspondiente)  $X_{codif}$  es el valor codificado que entrega el modelo y  $\Delta X_{real}$  y  $\Delta X_{codif}$  son las diferencias entre el valor más alto y el valor más bajo de los números reales y codificados respectivamente. Para dos variables, se estudian tres valores de la primera y cinco de la segunda.

Una vez realizada la experiencia y medida la variable dependiente (en nuestro caso actividad Rhasa) se determinan los coeficientes de un polinomio del tipo  $z = b_0 + b_1x + b_2y + b_{11}x^2 + b_{22}y^2 + b_{12}xy$ . Los coeficientes se determinan por el método de cuadrados mínimos. La forma más sencilla de manejar este número de datos es mediante el cálculo matricial.

Si se definen las siguientes matrices.

$$X = \begin{pmatrix} 1 & x_1 & y_1 & x_1^2 & y_1^2 & x_1y_1 \\ 1 & x_2 & y_2 & x_2^2 & y_2^2 & x_2y_2 \\ 1 & x_3 & y_3 & x_3^2 & y_3^2 & x_3y_3 \\ 1 & x_4 & y_4 & x_4^2 & y_4^2 & x_4y_4 \\ 1 & x_5 & y_5 & x_5^2 & y_5^2 & x_5y_5 \\ 1 & x_6 & y_6 & x_6^2 & y_6^2 & x_6y_6 \\ 1 & x_7 & y_7 & x_7^2 & y_7^2 & x_7y_7 \\ 1 & x_8 & y_8 & x_8^2 & y_8^2 & x_8y_8 \\ 1 & x_9 & y_9 & x_9^2 & y_9^2 & x_9y_9 \end{pmatrix} \quad B = \begin{pmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \\ b_5 \end{pmatrix} \quad Z = \begin{pmatrix} z_1 \\ z_2 \\ z_3 \\ z_4 \\ z_5 \\ z_6 \\ z_7 \\ z_8 \\ z_9 \end{pmatrix}$$

Donde los  $x_i$  e  $y_i$  son los valores codificados de  $x$  e  $y$  para cada experiencia,  $B$  es el vector de los coeficientes a determinar y  $Z$  es el vector de los resultados experimentales de cada ensayo, se observa que  $X \times B = Z$ . Este es un sistema de ecuaciones redundantes, con más ecuaciones que incógnitas, así que no puede despejarse directamente  $B$  del producto anterior. Para resolverse este sistema se debe obtener la matriz pseudo inversa de  $X$  a partir de  $(X^T X)^{-1} \cdot X^T$ , donde  $X^T$  es la matriz transpuesta de  $X$ .

Como hay más ecuaciones que incógnitas los valores obtenidos para los parámetros son estimadores que minimizan la distancia entre las variables reales y las obtenidas. Realizando el análisis de varianza de los resultados obtenidos para cada parámetro del polinomio se decide cuales de ellos son significativos y cuales no. Con aquellos que son significativos se vuelven a calcular los parámetros del polinomio y con ellos puede realizarse el grafico de la superficie de respuesta o bien calcular en forma analítica la existencia de máximos o mínimos en la zona del estudio.

## Referencias Bibliográficas:

1. Doehlert, D.H. Uniform shell designs. *Applied Statistics* 231-239 (1970).
2. Cavalitto, S.F. & Mignone, C.F. Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Process Biochem* 42, 175-179 (2007).





