



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales y Agrimensura

“PRODUCCIÓN DE LAS ENZIMAS LACASA Y XILANASA PARA SU POTENCIAL UTILIZACIÓN EN LA ELABORACIÓN DE PANIFICADOS”

TESIS DOCTORAL

Lic. Melisa Antonella Molina

Directora: Dra. María Isabel Fonseca

Codirectora: Dra. Sonia Cecilia Sgroppo

Sub directora: Mgter. Laura Beatriz Milde

Corrientes, República Argentina 2023



AUTORIDADES DEL DEPARTAMENTO DE POSGRADO

Decana: Mgter. Viviana Godoy Guglielmone

Directora de la carrera del doctorado en Química: Dra. María Victoria Avanza

Integrantes del comité académico:

Dra. Laura Cristina Ana Leiva

Dra. Nelly Lidia Jorge

Dr. Dario Jorge Roberto Duarte

Dra. Patricia Risso

Dra. Jorgelina Altamirano

El presente trabajo de Tesis para optar por el Título de Doctora en Química de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) ha sido realizado en el Laboratorio de Biotecnología Molecular del Instituto de Biotecnología Misiones “Dra. María Ebe Reca” (InBioMis), perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, bajo la dirección de la Dra. María Isabel Fonseca y la codirección de la Dra. Sonia Cecilia Sgroppo.



Facultad de
Ciencias Exactas,
Químicas y
Naturales



Esta tesis está dedicada a Francesca

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Nordeste por permitirme realizar la carrera de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme la beca para desarrollar las actividades de investigación y contribuir así a mi formación académica.

A la Universidad Nacional de Misiones por brindarme el espacio para llevar a cabo este trabajo dentro del Laboratorio de Biotecnología Molecular del Instituto de Biotecnología Misiones “Dra. María Ebe Reca”.

Al Dr. Pedro Zapata por su acompañamiento académico.

A mi directora, la Dra. María Fonseca, por su dedicación, su guía, su paciencia, sus correcciones, por haberme acompañado desde mis inicios. Le estaré eternamente agradecida por estar siempre presente.

A mi codirectora por su guía durante todo el proceso, su disponibilidad a la hora de responder mis inquietudes y toda la ayuda brindada durante el proceso.

A los chicos del laboratorio por el acompañamiento, la predisposición, las charlas, el apoyo y todo lo compartido.

A mis papás y a Valy, por estar predispuestos a ayudarme y acompañarme para concretar una meta más.

A Goyo, por llevarse lo mejor y lo peor de mí todos los días.

A Franchu, por hacer aún más desafiante esta etapa, por entender que mamá se va a trabajar y esperarme todos los días incondicionalmente con una sonrisa y un abrazo.

LISTADO DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS

Artículos publicados en revistas

Molina, M. A., CAZZANIGA, A., MILDE, L. B., SGROPPO, S. C., ZAPATA, P. D. FONSECA. M. I. (2024). **Bioengineered xylanase from Misiones Argentina rainforest: a bakery enhancement approach.** Journal of Food Science, 1- 13. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17016>

Molina, M. A., CAZZANIGA, A., MILDE, L. B., SGROPPO, S. C., ZAPATA, P. D. FONSECA. M. I. (2023). **Purification and characterization of a fungal laccase expressed in *Kluyveromyces lactis* suitable for baking.** Journal of Food Science, 1–13. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16497>

Artículos publicados en congresos y reuniones científicas

Autores: Molina M. A., Milde L. B., Sgroppo S., Zapata P. D., Fonseca M. I.

Título: **Producción y caracterización de una xilanasa recombinante proveniente de *Trichoderma atroviride* LBM 117**

Nombre de la reunión científica: 50 años UNaM

Año: 2023.

Autores: Molina M. A., Milde L. B., Sgroppo S., Zapata P. D., Fonseca M. I.

Título: **Producción y caracterización de una xilanasa recombinante proveniente de *Trichoderma atroviride* LBM 117**

Nombre de la reunión científica: Jornadas Institucionales InBioMis

Año: 2022.

Autores: Molina M. A., Milde L. B., Sgroppo S., Zapata P. D., Fonseca M. I.

Título: **Addition of inorganic compounds to increase laccase enzyme activity.**

Nombre de la reunión científica: I Simpósio de Microbiologia de Rondônia: Saúde, Ambiente e Inovação (SIMICRON) (Virtual)

Año: 2021

Autores: Molina, M. A. Sgroppo S.C., Milde LB., Zapata P. D., Fonseca, M. I.

Título: **Análisis enzimático de una lacasa recombinante proveniente del hongo de pudrición blanca *Phlebia brevispora* BAFC633.**

Nombre de la reunión científica: 6º Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAPROBIO)

Año: 2021

Autores: Marquez, R.B., Molina, M. A. Ayala Schimpf A. R., Fonseca, M.I.

Título: **Modelado tridimensional de una xilanasa de *Trichoderma atroviride* LBM 117**

Nombre de la reunión científica: 6º Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAPROBIO)

Año: 2021

Autores: Molina, M. A. Sgroppo S.C., Milde LB., Zapata P. D., Fonseca, M. I.

Título: **Purification and characterization of a recombinant laccase from *Kluyveromyces lactis* GG799.**

Nombre de la reunión científica: RedTez

Año: 2021.

Autores: Molina M. A., Milde L. B., Sgroppo S., Zapata P. D., Fonseca M. I.

Título: **Expresión de una lacasa de *Phebia brevispora* en la levadura GRAS *Kluyveromyces lactis*.**

Nombre de la Reunión Científica: XV Congreso Argentino de Microbiología CAM 2019. Lugar: CABA

Año: 2019

GENBANK

Molina,M.A., Milde,L.B., Sgroppo,S.C., Zapata,P.D. and Fonseca, M.I.

DEFINITION Trichoderma atroviride.

ACCESSION OP382460.1

Submitted (22-AUG-2022) Posadas, Misiones, Argentina, InBioMis, Ruta 12 Km 7 1/2, Posadas, Misiones 3300, Argentina

LISTA DE ABREVIATURAS

°C:	grados Celsius
AA	ácido ascórbico
ADA	Azodicarbonamida
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ANOVA:	del inglés, <i>Analysis of Variance</i> , análisis de varianza
ARN:	ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
BI:	índice de pardeamiento
BLAST:	del inglés, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ; Herramienta de alineamiento local básico
CAZy:	del inglés, <i>Carbohydrate Active EnZymes</i> ; enzimas activas sobre carbohidratos,
CO₂	dióxido de carbono
DAG	diacilgliceroles
DNS:	del inglés 3,5- <i>DiNitroSalicylic acid</i> ; ácido 3,5-dinitrosalicílico
dNTPs:	desoxirribonucleótidos trifosfatos
DO:	densidad óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EX	Endoxilanasas
GH:	glicosil hidrolasas
GOX:	glucosa oxidasa
H₂O₂	peróxido de hidrógeno
h	Horas
HIS	Histidina
HSE:	elementos de choque térmico
InBioMis:	Instituto de Biotecnología Misiones
<i>K. lactis</i>:	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Kg:	Kilogramo
MAG	Monoacilgliceroles
MAG	Monoacilgliceroles
MEB	microscopio electrónico de barrido

mL:	Mililitros
MRE	Del inglés, <i>metal response elements</i> ; elementos de respuesta a metales
min	Minutos
NCBI	del inglés, <i>National Center for Biotechnology Information</i> ; Centro Nacional para Información Biotecnológica
ND-PAGE	del inglés, Non Denaturing PolyAcrylamide Gel Electrophoresis; electroforesis no desnaturalizante
ORF	del inglés, <i>open reading frame</i> : marco de lectura abierto
PB	bromato de potasio
PCR	del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> ; reacción en cadena de la polimerasa
PDA	del inglés, <i>Potato Dextrose Agar</i> ; agar papa dextrosa
pH	potencial de hidrógeno
PP	pérdida de peso
PVDF	difluoruro de polivinilideno
SDS-PAGE	del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> ; electroforesis desnaturalizante con sulfato dodecílico de sodio
Sp	Especie
TBE	Tris-Borato-EDTA
TGA	triacilglicerol
TPA	Análisis de perfil de textura
UNaM	Universidad Nacional de Misiones
VE	volumen específico
WE-AX	del inglés, <i>Water extractable arabinoxylan</i>
WRF	del inglés, <i>white rot fungi</i> , hongos de pudrición blanca
XRE	elementos de respuesta xenobiótica
Zn	Zinc
μl	Microlitros

ÍNDICE DE CONTENIDO

1	CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	EL TRIGO.....	3
1.1.1	La harina de trigo en la elaboración de productos panificados	3
1.1.2	Proceso de elaboración de panificados.....	8
1.1.3	Agregado de productos químicos a panificados	10
1.1.4	Proteínas recombinantes	20
2	CAPÍTULO II: ENDOXILANASAS INTRODUCCIÓN	27
2.1	ENZIMAS XILANOLÍTICAS	27
2.1.1	Endoxilanasas (EX)	27
2.1.2	Estructura de la enzima xilanasas	28
2.1.3	Características de las enzimas.....	30
2.1.4	Clasificación de xilanasas	30
2.1.5	Xilanasas GH10.....	31
2.1.6	Mecanismos de acción	34
2.1.7	Fuentes.....	35
2.1.8	Regulación transcripcional de xilanasas	38
2.1.9	Xilanasas recombinantes	39
2.1.10	Optimización del medio de cultivo para la producción de xilanasas.....	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
2.3	MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.3.1	<i>Trichoderma atroviride</i> LBM 117 y su mantenimiento	42
2.3.2	Inoculación de <i>T. atroviride</i> LBM 117	43
2.3.3	Extracción de Ácidos Nucleicos.....	44
2.3.4	Diseño de cebadores	45
2.3.5	Obtención de la región estructural	46
2.3.6	Electroforesis en geles de agarosa	47
2.3.7	Microorganismos utilizados y su mantenimiento	48
2.3.8	Digestión del amplicón y el vector con enzimas de restricción	48
2.3.9	Clonación del gen que codifica para la enzima endoxilanasas en <i>E. coli</i> DH5 α	49
2.3.10	Optimización de la producción de la enzima xilanasas en <i>K. lactis</i>	52
2.3.11	Determinación de actividad xilanasas	53
2.3.12	Caracterización de la actividad xilanasas recombinante presente en el sobrenadante.....	54
2.3.13	Purificación de la enzima xilanasas	56
2.3.14	Análisis electroforético y detección de la enzima xilanasas.....	56
2.3.15	Caracterización de la actividad xilanasas purificada	57
2.3.16	Especificidad del sustrato y cinética enzimática	58
2.3.17	Análisis estadístico.....	58
2.4	RESULTADOS.....	59
2.4.1	Extracción de ácidos nucleicos	59
2.4.2	Obtención de xilanasas recombinante	63
2.4.3	Optimización de la producción de la enzima xilanasas en <i>K. lactis</i> GG799.....	64
2.4.4	Purificación de la enzima xilanasas.....	70
2.4.5	Análisis electroforético y detección de la enzima xilanasas	70
2.4.6	pH y temperatura óptimos, estabilidad enzimática	71
2.4.7	Especificidad del sustrato y cinética enzimática	71
2.5	DISCUSIÓN	73
2.5.1	Obtención de la región estructural	74
2.5.2	Expresión de una xilanasas de <i>T. atroviride</i> LBM 117 en la levadura GRAS <i>K. lactis</i> GG799	75
2.5.3	Optimización del medio para la producción de la enzima xilanasas en <i>K. lactis</i> GG799	77
2.5.4	Caracterización bioquímica del extracto conteniendo xilanasas recombinante	81
2.5.5	Peso molecular	83

2.5.6	Caracterización bioquímica de la xilanasa recombinante	84
2.5.7	Estudios de cinética, especificidad de sustrato e inhibición.....	85
2.6	CONCLUSIONES.....	87
3	CAPÍTULO III: LACASAS INTRODUCCIÓN	89
3.1	LACASA	89
3.1.1	Estructura de la enzima lacasa.....	89
3.1.2	Mecanismo de acción de las lacasas	92
3.1.3	Fuentes.....	93
3.1.4	Genes que codifican para lacasa	96
3.1.5	Regulación génica de lacasa	97
3.1.6	Lacasa recombinante.....	100
3.1.7	Optimización del medio de cultivo para la obtención de lacasas	100
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	102
3.3	MATERIALES Y MÉTODOS	103
3.3.1	Diseño de cebadores	103
3.3.2	Microorganismos utilizados y su mantenimiento	105
3.3.3	Digestión de los amplicones y el vector con enzimas de restricción.....	105
3.3.4	Clonación del gen que codifica para la enzima lacasa en <i>E. coli</i> DH5 α	106
3.3.5	Optimización de la producción de la enzima lacasa en <i>K. lactis</i> GG799.....	109
3.3.6	Determinación de actividad lacasa.....	110
3.3.7	Caracterización de la actividad lacasa recombinante presente en el sobrenadante	111
3.3.8	Purificación de la enzima lacasa.....	113
3.3.9	Análisis electroforético y detección de la enzima lacasa	113
3.3.10	Caracterización de la actividad lacasa purificada.....	114
3.3.11	Especificidad de sustrato y cinética enzimática	115
3.3.12	Análisis estadístico.....	115
3.4	RESULTADOS.....	116
3.4.1	Amplificación de la región codificante.....	116
3.4.2	Obtención de lacasa recombinante	118
3.4.3	Optimización de la producción de la enzima lacasa en <i>K. lactis</i> GG799.....	119
3.4.4	Caracterización de la actividad lacasa recombinante presente en el sobrenadante	122
3.4.5	Purificación de la enzima lacasa.....	124
3.4.6	Análisis electroforético y detección de la enzima lacasa	124
3.4.7	pH y temperatura óptimos, estabilidad enzimática	125
3.4.8	Análisis de datos cinéticos.....	126
3.5	DISCUSIÓN	128
3.5.1	SECCIÓN I: OBTENCIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE UNA LACASA DE <i>Phlebia brevispora</i> BAFC 633 128	
	SECCIÓN II: OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ENZIMA LACASA RECOMBINANTE EN LA LEVADURA GRAS <i>K. lactis</i> GG799	129
3.5.2	SECCIÓN III: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LACASA RECOMBINANTE	137
3.6	CONCLUSIONES.....	139
4	CAPÍTULO IV: ELABORACIÓN DE PANIFICADOS CON LAS ENZIMAS XILANASA Y LACASA RECOMBINANTES 141	
4.1	INTRODUCCIÓN	141
4.1.1	Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los panificados:.....	142
4.1.2	Caracterización de las propiedades sensoriales de los panificados	152
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	159
4.3	MATERIALES Y MÉTODOS	160
4.3.1	Selección de la formulación para la elaboración de panificados	160
4.3.2	Elaboración de panificados con xilanasa y lacasa recombinantes.....	161
4.3.3	Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los panificados.....	163
4.3.4	Análisis de imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM)	164

4.3.5	<i>Humedad</i>	164
4.3.6	<i>Caracterización de las propiedades texturales de los panificados</i>	165
4.3.7	<i>Caracterización de las propiedades sensoriales de los panificados</i>	166
4.3.8	<i>Análisis estadístico</i>	171
4.4	RESULTADOS	172
4.4.1	<i>Selección de la formulación para la elaboración de panificados</i>	172
4.4.2	<i>Caracterización de las propiedades físicas de los panificados</i>	173
4.4.3	<i>Caracterización de las propiedades texturales de los panificados</i>	179
4.4.4	<i>Caracterización de las propiedades sensoriales de los panificados</i>	180
4.4.5	<i>Caracterización de las propiedades físicas de los panificados</i>	184
4.4.6	<i>Caracterización de las propiedades texturales de los panificados</i>	188
4.4.7	<i>Caracterización de las propiedades sensoriales de los panificados</i>	189
4.5	DISCUSIÓN	192
4.5.1	<i>Selección de la formulación para la elaboración de panificados</i>	192
4.5.2	<i>Propiedades físicas de los panificados</i>	192
4.5.3	<i>Humedad</i>	195
4.5.4	<i>Propiedades texturales de los panificados</i>	196
4.5.5	<i>Propiedades sensoriales de los panificados</i>	198
4.6	CONCLUSIONES	200
5	CONCLUSIONES GENERALES	201
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	202
7	BIBLIOGRAFÍA	203

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUCTURA DE LA CADENA DE AMILOSA, ASUMIDA COMO UNA ESPIRAL LEVÓGIRA DEBIDO A LOS ENLACES GLUCOSÍDICOS A (1→4) (N = 500 – 6000 UNIDADES DE A-D GLUCOPIRANOSILO). TOMADO DE MIGUEL Y COL. (2013).	5
FIGURA 2: ESTRUCTURA PARCIAL DE LA MOLÉCULA DE AMILOPECTINA CON SITIOS DE ACCIÓN DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS REPRESENTADOS POR FLECHAS: (A) A-AMILASAS; (B) AMILOGLUCOSIDASAS; (C) B-AMILASAS; (D) ISOAMILASAS Y PULULANASAS. SE MUESTRAN LOS ENLACES GLUCOSÍDICOS A (1→4) ENTRE LAS UNIDADES DE GLUCOSA EN LA CADENA LINEAL Y UN ENLACE GLUCOSÍDICO A (1→6) A UNA CADENA LATERAL DEL POLISACÁRIDO. TOMADO DE VALENCIA Y COL., 2007.	5
FIGURA 3: DIBUJO ESQUEMÁTICO DE LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS DEL GLUTEN, DONDE LAS GLIADINAS ESTÁN REPRESENTADAS POR ESFERAS Y LAS GLUTENINAS POR FILAMENTOS. LA ESTRUCTURA MÁS VOLUMINOSA EN LA PARTE SUPERIOR MUESTRA EL GAS RETENIDO EN LA RED DE GLUTEN Y LA CONSIGUIENTE EXPANSIÓN DEL VOLUMEN DE LA MASA OBSERVADA EN EL PROCESO DE HORNEADO. LA ESTRUCTURA MÁS DELGADA EN LA PARTE INFERIOR REPRESENTA LA PLASTICIDAD, LA EXTENSIBILIDAD Y LAS PROPIEDADES VISCOSAS DE LA MATRIZ DE GLUTEN. TOMADO DE MIGUEL Y COL. (2013).	6
FIGURA 4: ESTRUCTURA PARCIAL DE UN ARABINOXILANO: UNA CADENA PRINCIPAL LINEAL FORMADA POR XILANO (UN PENTOSANO QUE CONSISTE EN UNIDADES D-XILOSA CONECTADAS POR ENLACES B (1→4), UNIDAS ALEATORIAMENTE A RESIDUOS DE L-ARABINOFURANOSA POR ENLACES A (1→3) O A (1→2). TOMADA DE MIGUEL Y COL. (2013).	8
FIGURA 5: CAMBIOS MOLECULARES INDUCIDOS POR LA ADICIÓN DE XILANASA (A), GLUCOSA OXIDASA (B) O AMBAS (C) A SISTEMAS DE MASA DE TRIGO. TOMADO DE DAI Y TYL (2021).	17
FIGURA 6: PROCESO DE SECRECIÓN PROTEICA. EN EL NÚCLEO, SE EXPRESA UN VECTOR DE EXPRESIÓN INTEGRADO QUE CODIFICA LA FUSIÓN ENTRE EL DOMINIO A-MF (AZUL) Y LA PROTEÍNA DESEADA (NEGRO). UN PÉPTIDO SEÑAL EN EL DOMINIO A-MF DIRIGE LA ENTRADA DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (ER) Y ES RETIRADA POR LA PEPTIDASA SEÑAL (SP). LA PROTEÍNA DE FUSIÓN SE TRANSPORTA AL GOLGI, DONDE LA PROTEASA KEX ELIMINA EL DOMINIO A-MF. LA PROTEÍNA DE INTERÉS ES SECRETADA LUEGO DE LA CÉLULA. (TOMADO DE: MANUAL K. LACTIS PROTEIN EXPRESSION KI).	24
FIGURA 7: ESTRUCTURA DEL XILANO Y SITIOS DE ACCIÓN DE LAS ENZIMAS XILANOLÍTICAS. A) EL XILANO SE COMPONE DE UN ESQUELETO CENTRAL DE RESIDUOS DE XILOSA UNIDOS POR ENLACES 1,4-B; B) SU HIDRÓLISIS COMPLETA SE DA POR LA ACCIÓN DE B-D-XILOSIDASA. LAS ENZIMAS QUE CATALIZAN LAS REACCIONES SE SEÑALAN CON FLECHAS ENUMERADAS: (1) A-L-ARABINOFURANOSIDASA, (2) A-GALACTOSIDASA, (3) ACETIL-XILANO ESTERASA, (4) A-GLUCURONIDASA, (5) FERULOIL ESTERASA, (6) ENDO-B-1,4-XILANASA, (7) B-XILOSIDASA. TOMADO DE MALHOTRA Y CHAPADGAONKAR (2018).	28
FIGURA 8: MODELO TEÓRICO DE LA PROTEÍNA XILANASA. SE PUEDE OBSERVAR UNA A-HÉLICE Y HOJAS B. MODELADO TEÓRICO REALIZADO CON LA HERRAMIENTA SWISS- MODEL DISPONIBLE ONLINE.	29
FIGURA 9: ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL DOMINIO CATALÍTICO DE XILANASAS PERTENECIENTES A LA FAMILIA GH10. TOMADO DE PDB CRYSTALSTRUCTURE OF AN ENDO-BETA-1,4-XYLANASE (GLYCOSIDEHYDROLASEFAMILY 10/GH10) ENZYMEFROM ASPERGILLUS NIGER.	32

FIGURA 10: ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL DOMINIO CATALÍTICO DE XILANASAS PERTENECIENTES A LA FAMILIA GH11. TOMADO DE PDB. X-RAYSTRUCTUREANALYSIS OF XYLANASE	33
FIGURA 11: MECANISMO DE ACCIÓN GENERAL DE B-GLICOSIDASAS DE RETENCIÓN. TOMADA DE VALENZUELA (2012).....	35
FIGURA 12: OBSERVACIÓN AL MO DEL GÉNERO TRICHODERMA. MAGNIFICACIÓN DE 100X. TOMADA DE BARCHUK (2017).....	37
FIGURA 13: FOTOGRAFÍA DE <i>T. ATROVIRIDE</i> LBM 117 CULTIVADO DURANTE 8 DÍAS EN MEDIO MEA.	38
FIGURA 14: ADN GENÓMICO EXTRAÍDO DE TRICHODERMA ATROVIRIDE LBM 117 EN GEL DE AGAROSA AL 0,8 %. SE MUESTRAN TRES EXTRACCIONES REALIZADAS DE MANERA INDEPENDIENTE.	59
FIGURA 15: ARN TOTAL EN GEL DE AGAROSA AL 0,8 %. SE MUESTRAN CUATRO EXTRACCIONES REALIZADAS DE MANERA INDEPENDIENTE. LAS PRIMERAS (C1 Y C2) SON DE CULTIVO EN PLACA Y LAS ÚLTIMAS (C3 Y C4) CORRESPONDEN AL CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO.	60
FIGURA 16: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%. C1= MP, C2= AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE ACTINA A PARTIR DE RT-PCR DE DE ADN GENÓMICO DE 200 PB, C3= AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE ACTINA A PARTIR DE RT-PCR DE 150 PB.	61
FIGURA 17: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%. AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE UNA ENDOXILANASA. EL PRIMER CARRIL ES EL MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1500 PB (C1), EL SEGUNDO, LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE INTERÉS (C2).	61
FIGURA 18: SECUENCIAS NUCLEOTÍDICA Y AMINOACÍDICA QUE CODIFICA PARA EL GEN ENDO-B-1,4-XILANASA EN <i>T. ATROVIRIDE</i> LBM 117. LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA ESTÁ REPRESENTADA POR LETRAS DE COLOR NEGRO, LA SECUENCIA AMINOACÍDICA POR LETRAS DE COLOR AZUL. EL PÉPTIDO SEÑAL ESTÁ REPRESENTADO EN AMARILLO. EN EL PRESENTE TRABAJO SE CLONÓ EL GEN QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA XILANASA SIN EL PÉPTIDO SEÑAL. IMAGEN TOMADA DE GENBANK OP382460.1.	62
FIGURA 19: EJEMPLO DE UNA PRUEBA CUALITATIVA DE ACTIVIDAD XILANOLÍTICA DEL SOBRENADANTE DE <i>K. LACTIS</i> RECOMBINANTES PARA XILANASA Y DE <i>T. ATROVIRIDE</i> LBM 117 (CONTROL POSITIVO SEÑALADO CON X), LA LETRA W INDICA EL CLON CON MAYOR ACTIVIDAD. EN LOS POCILLOS REALIZADOS A LA PLACA SUPLEMENTADA CON XILANO 0,1%, SE AGREGÓ 20 ML DE SOBRENADANTE Y SE DEJÓ ACTUAR POR 1 H A TEMPERATURA AMBIENTE, LUEGO SE TIÑÓ CON ROJO CONGO 0,1% (P/V) Y SE ENJUAGÓ CON AGUA HASTA LA APARICIÓN DE HALOS.	63
FIGURA 20: REPRESENTACIÓN DE LA ACTIVIDAD XILANASA EN MEDIO YPGAL LÍQUIDO DE <i>K. LACTIS</i> GG799/XIL DURANTE 7 DÍAS DE CULTIVO.	64
FIGURA 21: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS CULTIVOS DE <i>K. LACTIS</i> GG799/XIL CUYAS DO INICIALES FUERON 1,5, 1,8 Y 3. EL 100 % DE ACTIVIDAD CORRESPONDE A 9500 UL ⁻¹	64
FIGURA 22: GRÁFICO DE BARRAS CORRESPONDIENTE A LA OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO DE <i>K. LACTIS</i> GG799/XIL. LA MÁXIMA ACTIVIDAD XILANOLÍTICA CORRESPONDE A 9900 UL ⁻¹	65
FIGURA 23: INFLUENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COMPUESTOS SOBRE LA ACTIVIDAD XILANOLÍTICA DURANTE 72 H DE INCUBACIÓN. A) CLORURO DE HIERRO, B) CARBONATO DE CALCIO, CLORURO DE POTASIO, D) CLORURO DE MAGNESIO, E) CLORURO DE ZINC, F) DEXTROSA Y G) GLICINA. LOS ENSAYOS SE REALIZARON A 28°C EN AGITACIÓN.	67

FIGURA 24: DETECCIÓN DE LA ENZIMA XILANASA. ND- PAGE EN CONDICIONES NATIVAS UTILIZANDO TINCIÓN CON ROJO CONGO. LOS CARRILES 1,2 Y 3 CORRESPONDEN A LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO SUPLEMENTADO CON DEXTROSA 1 MM A LAS 6, 12 Y 24 H DE INCUBACIÓN. SE SEMBRARON 20 µG DE PROTEÍNAS POR POCILLO.	68
FIGURA 25: EFECTOS DEL PH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD XILANOLÍTICA DE LA ENZIMA XILANASA PURIFICADA (FIG. A Y B). EFECTOS DE TEMPERATURA Y PH SOBRE LA ESTABILIDAD XILANOLÍTICA DE LA ENZIMA XILANASA PURIFICADA (FIG. C Y D). ESTOS ENSAYOS FUERON REALIZADOS A 60°C (FIG. 25 A Y D) Y A PH 4,8 (FIG. 25 B Y C).	69
FIGURA 26: ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA ENZIMA XILANASA PURIFICADA. A) SDS/PAGE PLATA. B) ZIMOGRAMA CON XILANO 1% EL GEL SE INCUBÓ EN TAMPÓN ACETATO DE SODIO PH 4,8 A 50 °C 60 MIN MIN Y LUEGO SE TIÑÓ CON ROJO CONGO 0,1% (P/V) DURANTE 30 MIN. FINALMENTE SE DECOLORÓ CON NACL 1M HASTA LA APARICIÓN DE LA BANDA. CARRIL 1: MP. CARRIL 2: XILANASA RECOMBINANTE. SE SEMBRARON 20 µG DE PROTEÍNAS/POCILLO.	70
FIGURA 27: EFECTOS DEL PH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD XILANOLÍTICA DE LA ENZIMA XILANASA PURIFICADA (FIG. A Y B). EFECTOS DE TEMPERATURA Y PH SOBRE LA ESTABILIDAD XILANOLÍTICA DE LA ENZIMA XILANASA PURIFICADA (FIG. C Y D). ESTOS ENSAYOS FUERON REALIZADOS A 60°C (FIG. 27 A Y D) Y A PH 4,8 (FIG. 27 B Y C).	71
FIGURA 28: REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA ENZIMA LACASA DE STREPTOMYCES COELICOLOR. TOMADA DE SKÁLOVÁ Y COL., 2009.	91
FIGURA 29: CENTRO ACTIVO DE LACASA DE 3 DOMINIOS. TOMADA DE MANZANO (2012)	91
FIGURA 30: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA REDUCCIÓN DE OXÍGENO POR ACCIÓN CATALÍTICA DE LACASA. TOMADO DE SOSNA Y COL. (2013).	92
FIGURA 31: PHLEBIA BREVISPOBA BAFC 633 CECIDO EN PDA DURANTE 7 DÍAS.	95
FIGURA 32: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5% TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO. AMPLIFICACIONES DE LA REGIÓN CODIFICANTE. LA BANDA AMPLIFICADA TIENE 1000 PB APROXIMADAMENTE. (C1): AMPLIFICACIÓN OBTENIDA CON LOS CEBADORES LAK-S Y LAKL-AS1, (C2): MP, (C3): AMPLIFICACIÓN OBTENIDA CON LOS CEBADORES LAK-S Y LAKL-AS2, EN CADA CARRIL SE SEMBRARON 5 ML DE PCR MÁS 1ML DE TAMPÓN DE SIEMBRA. B PURIFICACIONES DE AMPLIFICACIONES. (C1): PCR REALIZADA CON LOS CEBADORES LAK-S Y LAKL-AS1; (C2): PCR REALIZADA CON LOS CEBADORES LAK-S Y LAKL-AS2. EN CADA CARRIL SE SEMBRÓ 2 ML DE PCR MÁS 1ML DE TAMPÓN DE SIEMBRA.	116
FIGURA 33: SECUENCIAS NUCLEOTÍDICA Y AMINOACÍDICA CORRESPONDIENTE AL GEN QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA LACASA. LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA ESTÁ REPRESENTADA POR LETRAS DE COLOR NEGRO, LA SECUENCIA AMINOACÍDICA POR LETRAS DE COLOR AZUL. EL PÉPTIDO SEÑAL SE ENCUENTRA RESALTADO DE COLOR AMARILLO. EN EL PRESENTE TRABAJO SE CLONÓ LA REGIÓN CODIFICANTE DE LA ENZIMA LACASA SIN EL PÉPTIDO SEÑAL. FOTOGRAFÍA TOMADA DE GENBANK JQ728448.1.	117
FIGURA 34: A) EJEMPLO DE DETECCIÓN DE ACTIVIDAD LACASA EN PLACA DE YCB CONTENIENDO ABTS Y DMP COMO SUSTRATO. LAS ZONAS VERDES Y NARANJA INDICAN LA PRESENCIA DE LACASA. B) ACTIVIDAD LACASA EN YPGAL LÍQUIDO CON Y SIN ETIQUETA DE HIS LUEGO DE 8 DÍAS DE INCUBACIÓN.	119
FIGURA 35: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS CULTIVOS CUYAS DO INICIALES FUERON 1,5, 1,8 Y 3. EL 100 % DE ACTIVIDAD CORRESPONDE A 265 UL ⁻¹	119

FIGURA 36: GRÁFICO DE BARRAS CORRESPONDIENTE A LA OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO DE K.LACTISGG799/LACI. LA MÁXIMA ACTIVIDAD LACASA CORRESPONDE A 289 U L ⁻¹	120
FIGURA 37: INFLUENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COMPUESTOS SOBRE LA ACTIVIDAD LACASA DURANTE 9 DÍAS DE INCUBACIÓN. A) TWEEN, CLORURO DE POTASIO, CLORURO DE ZINC Y SULFATO DE AMONIO. B) CARBONATO DE CALCIO, C) CLORURO DE HIERRO D) SULFATO DE HIERRO. EL 100% DE ACTIVIDAD LACASA CORRESPONDE A 890 U L ⁻¹	121
FIGURA 38: ZIMOGRAMA REVELADO CON DMP. SOBRENADANTE DE CULTIVO EN MEDIO YPGAL SUPLEMENTADO CON SULFATO DE HIERRO 1 MM CORRESPONDIENTE A LOS DÍAS 2, 4, 6 Y 8 CON MAYOR ACTIVIDAD LACASA.	122
FIGURA 39: EFECTOS DEL PH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD LACASA EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO (FIG. A Y B). EFECTOS DE TEMPERATURA Y PH SOBRE LA ESTABILIDAD LACASA EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO (FIG. C Y D). EL 100% DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CORRESPONDE A 890 U L ⁻¹ . ESTOS ENSAYOS FUERON REALIZADOS A 60°C (FIG. 39 A Y D) Y A PH 4,8 (FIG. 39 B Y C).	123
FIGURA 40: ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA ENZIMA LACASA PURIFICADA. A) SDS/PAGE PLATA. B) SE SEMBRARON 20 µG DE PROTEÍNAS/POCILLO PARA CADA CONDICIÓN EVALUADA, UTILIZANDO GELES AL 7,5% P/V ND-PAGE LOS QUE LUEGO SE INCUBARON CON DMP ZIMOGRAMA REVELADO CON DMP. CARRIL 1: MP. CARRIL 2: LACASA RECOMBINANTE. SE SEMBRARON 5 MG ML ⁻¹ DE PROTEÍNA.	125
FIGURA 41: EFECTOS DEL PH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD LACASA DE LA ENZIMA PURIFICADA (FIG. A Y B). EFECTOS DE TEMPERATURA Y PH SOBRE LA ESTABILIDAD LACASA DE LA ENZIMA PURIFICADA (FIG. C Y D). EL 100% DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CORRESPONDE A 1289 U L ⁻¹ . ESTOS ENSAYOS SE REALIZARON A 30°C (FIG. 41 A Y D) Y PH 3.6 (FIG. 41 B Y C).	126
FIGURA 42: ESPACIO DE COLOR CIE L*A*B. TOMADA DE MIRANDA (2018).	144
FIGURA 43: GRÁFICA GENERAL DEL ANÁLISIS DE PERFIL DE TEXTURA TPA. (TOMADO DE DIAZ MOLINS, 2009). ...	150
FIGURA 44: FORMULARIO A) FORMULARIO DIGITAL (GOOGLE FORMS) PARA EVALUADORES CONSUMIDORES PANARIOS. B) FORMULARIO DIGITAL (GOOGLE FORMS) PARA LA EVALUACIÓN SENSORIAL DE PANIFICADOS ELABORADOS A PARTIR DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAS ENZIMAS XILANASA Y LACASA. C) FORMULARIO DIGITAL (GOOGLE FORMS) PARA CATA DE PANIFICADOS ELABORADOS A PARTIR DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAS ENZIMAS XILANASA Y LACASA.....	170
FIGURA 45: A) FOTOGRAFÍAS DE PANIFICADOS ELABORADOS A PARTIR DE 3, 6 Y 9 U DE XILANASA RECOMBINANTE Y EL CONTROL SIN EL AGREGADO DE LA ENZIMA. B) IMÁGENES OBTENIDAS MEDIANTE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO CON UNA MAGNIFICACIÓN DE 45X.....	174
FIGURA 46: COLOR SÓLIDO REPRESENTATIVO DE LOS VALORES CIE-L*A*B* PROMEDIO OBTENIDO PARA CADA MUESTRA ANALIZADA.	178
FIGURA 47: RESULTADOS DEL ANÁLISIS SENSORIAL DE PANIFICADOS ELABORADOS CON 3, 6, 9 U DE XILANASA Y EL PAN CONTROL.	182
FIGURA 48: GRÁFICO DE FRECUENCIAS PARA LOS DESCRIPTORES COLOR SUAVE, SABOR ARTIFICIAL, SABOR INTENSO, SABOR A COCIDO, SABOR PERSISTENTE, SABOR DESAGRADABLE, AROMA AGRADABLE Y AROMA NO AGRADABLE.....	183

FIGURA 49: A) FOTOGRAFÍAS DE PANIFICADOS ELABORADOS A PARTIR 1,5 U DE LACASA RECOMBINANTE Y EL CONTROL CORRESPONDIENTE. B) IMÁGENES OBTENIDAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO CON UNA MAGNIFICACIÓN DE 45X.....	185
FIGURA 50: COLOR SÓLIDO REPRESENTATIVO DE LOS VALORES CIE-L*A*B* PROMEDIO OBTENIDO PARA CADA MUESTRA ANALIZADA.	187
FIGURA 51: RESULTADOS DEL ANÁLISIS SENSORIAL DE PANIFICADOS ELABORADOS CON 1,5 U DE LA ENZIMA LACASA RECOMBINANTE Y CONTROL.	190
FIGURA 52: GRÁFICO DE FRECUENCIAS PARA LOS DESCRIPTORES COLOR SUAVE, SABOR ARTIFICIAL, SABOR INTENSO, SABOR A COCIDO, SABOR PERSISTENTE, SABOR DESAGRADABLE, AROMA AGRADABLE Y AROMA NO AGRADABLE.....	191

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: CEBADORES UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE UN GEN QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA XILANASA. EN LOS CEBADORES SENTIDO Y ANTISENTO SE ENCUENTRAN SUBRAYADOS LOS SITIOS DE CORTE PARA LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN XHOI Y NOTI RESPECTIVAMENTE. EN LILA SE MUESTRA EL SITIO DE CORTE PARA LA PROTEASA KEX	46
TABLA 2: PARÁMETROS CINÉTICOS CALCULADOS PARA LA ENZIMA XILANASA PURIFICADA. DETERMINACIÓN DE K_M Y V_{MAX} EN FUNCIÓN DE LA TASA DE HIDRÓLISIS DEL XILANO DE BEECHWOOD A CONCENTRACIONES QUE VARIARON DE 0,05– 5 MM	72
TABLA 3: SECUENCIA DE CEBADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR EL GEN QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA LACASA. LOS NUCLEÓTIDOS EN <i>ITÁLICA</i> SON COMPLEMENTARIOS A LAS SECUENCIAS DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE LA ENZIMA LACASA. En NEGRITA SE MUESTRAN LOS SITIOS RECONOCIDOS POR LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN NOTI Y XHOI Y EN <i>CURSIVA</i> Y SUBRAYADO EL SITIO DE CORTE PARA LA PROTEASA KEX.	104
TABLA 4: PARÁMETROS CINÉTICOS CALCULADOS PARA LA ENZIMA LACASA PURIFICADA. DETERMINACIÓN DE K_M Y V_{MAX} EN FUNCIÓN DE LA TASA DE HIDRÓLISIS DE DMP Y ABTS A CONCENTRACIONES QUE VARIARON DE 0,05 A 5 MM. 100% DE ACTIVIDAD LACASA CORRESPONDE A 1289 U L ⁻¹	127
TABLA 5: CLASIFICACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS TEXTURALES (SZCZESNIAK, 2002)	149
TABLA 6: VOLUMEN ESPECÍFICO Y PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE PESO DE PANIFICADOS ELABORADOS A PARTIR DE 3, 6 Y 9 U DE XILANASA RECOMBINANTE ($P < 0,05$). SUPERÍNDICES IGUALES INDICAN QUE NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.	173
TABLA 7: VALORES DE COLOR EN SISTEMA CIE-L*A*B* OBTENIDOS PARA LA MUESTRA CONTROL SIN ADICIÓN DE ENZIMA Y CON 3, 6 Y 9 U DE XILANASA RECOMBINANTE. VALORES PROMEDIO \pm DESVÍO ESTÁNDAR. SUPERÍNDICES IGUALES INDICAN QUE NO EXISTEN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS VALORES DE LA MISMA COLUMNA.	175
TABLA 8: VALORES DE ÍNDICE DE BI OBTENIDOS A PARTIR DE LOS PROMEDIOS \pm DESVÍO ESTÁNDAR DE LA SECCIÓN 4.4.2.2, PARA LA CORTEZA SUPERIOR Y LATERAL, HUE Y CHROMA.	177
TABLA 9: VALORES DE DIFERENCIA TOTAL DE COLOR PARA LAS MUESTRAS OBTENIDAS A PARTIR DE LOS PROMEDIOS DE LA SECCIÓN 4.2.2.	177
TABLA 10: HUMEDAD. VALORES PROMEDIOS DE 3 MUESTRAS	178
TABLA 11: PARÁMETROS OBTENIDOS MEDIANTE LA PRUEBA DE TPA SOBRE PANIFICADOS ELABORADOS A PARTIR DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE XILANASA RECOMBINANTE. VALORES PROMEDIO \pm DESVÍO ESTÁNDAR. HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS VALORES QUE COMPARTEN DISTINTO SUPERÍNDICE.	179
TABLA 12: VALORES OBTENIDOS A PARTIR DEL ENSAYO DE FIRMEZA REALIZADO SOBRE PANIFICADOS ELABORADOS A PARTIR DE 3, 6 Y 9 U DE LA ENZIMA XILANASA RECOMBINANTE. VALORES PROMEDIO \pm DESVÍO ESTÁNDAR. HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS VALORES QUE COMPARTEN DISTINTO SUPERÍNDICE.	180
TABLA 13: VOLUMEN ESPECÍFICO Y PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE PESO DE PANIFICADOS ELABORADOS A PARTIR DE 1,5 U DE LACASA RECOMBINANTE ($P < 0,05$).	184
TABLA 14: VALORES DE COLOR EN SISTEMA CIE-L*A*B* OBTENIDOS PARA LA MUESTRA CONTROL Y CON LA ADICIÓN DE 1,5 U DE LA ENZIMA LACASA RECOMBINANTE. VALORES PROMEDIO \pm DESVÍO ESTÁNDAR. SUPERÍNDICES	

IGUALES INDICAN QUE NO EXISTEN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS VALORES DE LA MISMA COLUMNA.	186
TABLA 15: VALORES DE BI PROMEDIO, HUE Y CHROMA PARA LA CORTEZA DE LOS PANIFICADOS CON Y SIN LACASA ADICIONADA	187
TABLA 16: VALORES DE DIFERENCIA TOTAL DE COLOR PARA LA CORTEZA Y MIGA DEL PANIFICADO ELABORADO CON LACASA RECOMBINANTE OBTENIDOS A PARTIR DE LOS PROMEDIOS DE LA SECCIÓN 4.10.	187
TABLA 17: HUMEDAD DE PANES CONTROL Y ADICIONADOS DE LACASA. VALORES PROMEDIOS OBTENIDOS DE 3 MUESTRAS.....	188
TABLA 18: PARÁMETROS OBTENIDOS MEDIANTE LA PRUEBA DE TPA SOBRE PANIFICADOS ELABORADOS A PARTIR DE 1,5 U DE LACASA RECOMBINANTE. VALORES PROMEDIO ± DESVÍO ESTÁNDAR.	188
TABLA 19: VALORES OBTENIDOS A PARTIR DEL ENSAYO DE FIRMEZA REALIZADO SOBRE PANIFICADOS ELABORADOS A PARTIR DE 1,5 U DE LA ENZIMA LACASA.	189

RESUMEN

Trichoderma atroviride LMB 117 y *Phlebia brevispora* BAF633 son hongos de la provincia de Misiones que producen las enzimas xilanasa y lacasa. Mediante técnicas de biología molecular e ingeniería genética, los genes que codifican para dichas enzimas, se clonaron y expresaron en la levadura GRAS *Kluyveromyces lactis* GG799. Tras la optimización en la producción y la caracterización enzimática, se procedió a la purificación de las enzimas recombinantes. Con éstas se prepararon panificados con harina de trigo para evaluar el efecto en la mejora de las propiedades de dichos productos. Los resultados revelaron que la incorporación de xilanasa y lacasa tuvo un impacto positivo en cuanto a propiedades texturales como masticabilidad, elasticidad y cohesividad, lo que sugiere que dichas enzimas podrían ser utilizadas como mejoradores naturales en la producción de panificados.

En este sentido, la presente investigación representa un avance significativo en la aplicación de xilanasas y lacasas provenientes de hongos de Misiones para la mejora de productos de panificados. El proceso de obtención, clonación, expresión y purificación de estas enzimas representa nuevas posibilidades en la industria alimentaria, ofreciendo una alternativa más sostenible y natural para la optimización de los productos de panadería.

ABSTRACT

Trichoderma atroviride LMB 117 and *Phlebia brevispora* BAF633 are fungi from the Misiones province known for their production of xylanase and laccase enzymes. Through the application of molecular biology techniques and genetic engineering, the genes responsible for these enzymes were successfully cloned and expressed in the Generally Recognized as Safe (GRAS) yeast strain *Kluyveromyces lactis* GG799. Subsequent to optimizing production and enzymatic characterization, the recombinant enzymes were purified. These purified enzymes were then utilized in the formulation of baked goods using wheat flour to assess their impact on product properties.

The findings from this study revealed a positive influence on textural properties such as chewiness, elasticity, and cohesiveness following the incorporation of xylanase and laccase. This suggests that these enzymes have the potential to serve as natural enhancers in baked goods production. In this regard, the present research signifies a noteworthy advancement in the application of xylanases and laccases from Misiones fungi for the enhancement of bakery products. The process of obtaining, cloning, expressing, and purifying these enzymes introduces new possibilities within the food industry, offering a more sustainable and natural alternative for optimizing bakery products.



Capítulo I

INTRODUCCIÓN



1 CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos en un gran número de procesos tanto industriales como biotecnológicos. El desarrollo de tecnologías enzimáticas y la continua investigación en este campo se deben a que la aplicación de enzimas ofrece un gran potencial en diversas áreas. Tradicionalmente, las fuentes enzimáticas han sido principalmente microorganismos, plantas y animales. Sin embargo, se ha observado que las fuentes nativas no siempre son capaces de producir cantidades suficientes de enzimas para satisfacer las crecientes demandas de las diferentes industrias. Esta limitación cuantitativa ha llevado a la búsqueda de nuevas estrategias de producción enzimáticas para optimizar su rendimiento y aprovechar su potencial en aplicaciones industriales.

La necesidad de superar esta limitación ha impulsado la investigación en el ámbito de la ingeniería enzimática, con el objetivo de mejorar la producción, purificación y estabilidad de las enzimas para satisfacer la creciente demanda en distintos sectores de la industria.

Debido a los altos costos de producción y purificación, las enzimas necesarias en diferentes procesos productivos no pueden obtenerse en cantidades suficientes para una aplicación biotecnológica sustentable. Considerando la relación costo- beneficio, una alternativa es expresar el gen de interés en un hospedero adecuado, clonarlo, expresarlo y purificarlo.

Esta tesis doctoral plantea, en primer lugar, el diseño de un protocolo que permita obtener las enzimas xilanasa y lacasa recombinantes, partiendo de hongos autóctonos de la provincia de Misiones, purificarlas y finalmente utilizarlas en la elaboración de panificados. Además, se propone evaluar el efecto de xilanasas y lacasas en los panificados. Esto

representaría una alternativa eficiente y sostenible para la industria panadera, ya que reduciría la utilización de aditivos químicos en la generación de sus productos. Además, podrá contribuir a satisfacer la demanda de panificados de alta calidad y promover la sostenibilidad en su producción y elaboración.

1.1 El trigo

El trigo ha sido un cultivo fundamental en áreas templadas desde tiempos prehistóricos, debido a que es un recurso básico para la elaboración de alimentos destinados tanto a seres humanos como al ganado. Se lo reconoce por sus altas cualidades nutricionales, ya que su composición es rica en almidón, nitrógeno, micronutrientes y fibra dietética, pero también se sabe que puede tener efectos adversos en personas sensibles que padecen enfermedad celíaca, intolerancia o alergia al trigo.

Este cereal es la base para la fabricación de una diversidad de alimentos (Chaudhary y col., 2021). De hecho, se estima que la producción mundial de trigo para el año 2020 alcanzó aproximadamente 761 millones de toneladas contenidas en un área de 219 millones de hectáreas. Las dos especies de trigo más cultivadas en el mundo son el trigo común (*Triticum aestivum* L.) y el trigo túrgido (*Triticum turgidum* L.) (Shewry y Hey 2015), representando el primero del 95% de la producción mundial.

Se estima que los alimentos elaborados a base de trigo pueden proporcionar aproximadamente el 20% de los requerimientos energéticos de la población (Wieser y col., 2020). Por esta razón, se utiliza en una amplia variedad de alimentos y bebidas, desde la producción de pan, pasta y fideos orientales (Goel y col., 2021), hasta la elaboración de cervezas y bebidas destiladas (Shengli y col., 2009). Además, el trigo es el ingrediente principal en los panes típicos, aunque éstos también se pueden producir utilizando diferentes tipos de harinas de cereales.

1.1.1 La harina de trigo en la elaboración de productos panificados

La cocción de pan fermentado con levadura es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos debido a su papel fundamental en la dieta humana. Este alimento es consumido regularmente por habitantes de Europa, Medio Oriente, India, América y Oceanía. En la elaboración de panificados, una vez mezclada la harina, la levadura y el agua, comienzan complejos procesos bioquímicos y biofísicos, catalizados tanto por las enzimas del trigo como por la levadura, iniciando así la formación de la masa. Estos procesos continúan en el horneado, lo que caracteriza la producción de un pan típico.

La harina de trigo es una mezcla de almidón, gluten, lípidos, polisacáridos no amiláceos y enzimas. El almidón es el principal componente de los productos panificados. Actúa como espesante, aglutinante de agua, estabilizador de emulsiones, agente gelificante y sustituto de grasa (Wang y col., 2015). Se trata del polisacárido de reserva más abundante e importante en muchas plantas, incluidos los cereales, y se encuentra en forma de gránulos semi cristalinos intracelulares.

A nivel molecular, los componentes principales del almidón son los polímeros de glucosa amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula esencialmente lineal, compuesta por hasta 6000 unidades de glucosa con enlaces α -(1,4)-glucosídicos (Fig. 1). La amilopectina es un polisacárido altamente ramificado compuesto por cadenas lineales cortas unidas en enlaces α -1,4 de 10 a 60 unidades de glucosa y cadenas laterales unidas en enlaces α -1,6 con 15 a 4 unidades de glucosa (Fig. 2), y contiene un promedio de 2 millones de unidades de glucosa.

Si bien es cierto que muchos componentes de la harina, como el almidón, los arabinoxilanos y los lípidos afectan las propiedades reológicas de la masa de los panificados, (Yazar y col., 2021), el gluten le proporciona extensibilidad, viscosidad, elasticidad, cohesión y contribuye a su capacidad de absorción de agua (Li y col., 2023).

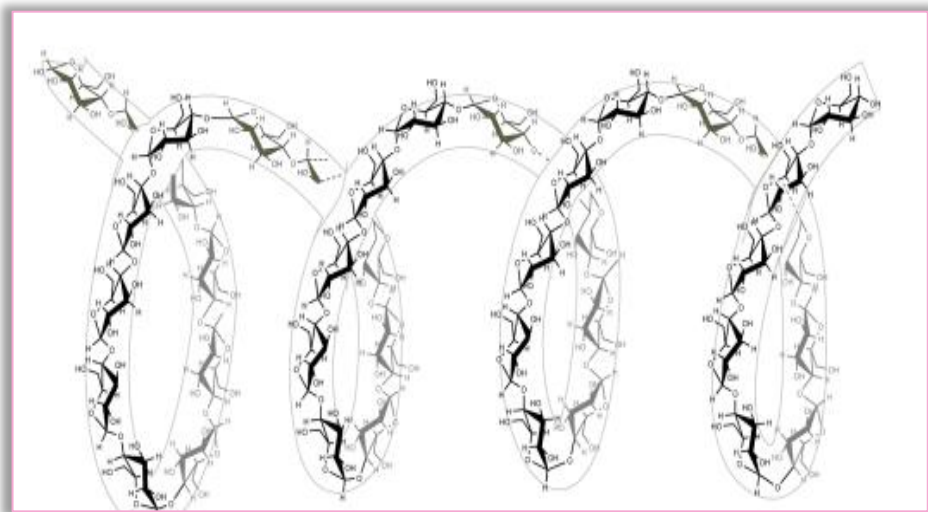


Figura 1: Estructura de la cadena de amilosa, asumida como una espiral levógira debido a los enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ ($n = 500 - 6000$ unidades de α -D glucopiranosilo).
Tomado de Miguel y col. (2013).

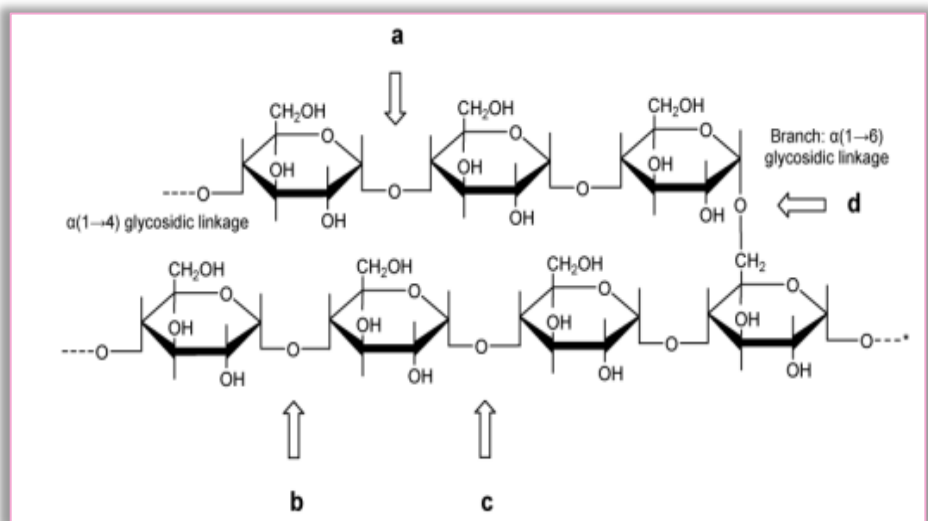


Figura 2: Estructura parcial de la molécula de amilopectina con sitios de acción de enzimas amilolíticas representados por flechas: (a) α -amilasas; (b) amiloglucosidasas; (c) β -amilasas; (d) isoamilasas y pululanastas. Se muestran los enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ entre las unidades de glucosa en la cadena lineal y un enlace glucosídico $\alpha(1\rightarrow6)$ a una cadena lateral del polisacárido. Tomado de Valencia y col., 2007.

La capacidad única de la harina de trigo para formar una masa viscoelástica con propiedades de retención de gases se debe principalmente a las proteínas del gluten, que son las principales proteínas de almacenamiento del trigo y tienen un papel esencial en la

elaboración del pan (Bonilla y col., 2020). En este sentido, las gliadinas son conocidas por su rol, junto con la glutenina, en la formación del gluten. Estas proteínas son esenciales ya que permiten el leudado y que los panes adquieran la forma adecuada durante la cocción.

Las gliadinas monoméricas son proteínas globulares con pesos moleculares que oscilan entre 30.000 y 80.000 Da y se clasifican en tres grupos: α -/ β -gliadinas, que son solubles en alcoholes de bajo porcentaje, γ -gliadinas, correspondiente a la forma ancestral de la gliadina rica en cistina con solo puentes disulfuros intercatenarios y ω -gliadinas, que son solubles en acetonitrilos de alto porcentaje (30-50% ácidos). Por su parte, las gluteninas poliméricas consisten en una mezcla heterogénea de polímeros lineales con un amplio rango de peso molecular, que abarca desde los 300.000 hasta los 900.000 Da, compuestas de subunidades de glutenina reticuladas por enlaces disulfuro que están bioquímicamente relacionadas con las gliadinas. Los enlaces disulfuro intermoleculares estabilizan los polímeros de glutenina (Iqbal y col., 2023).

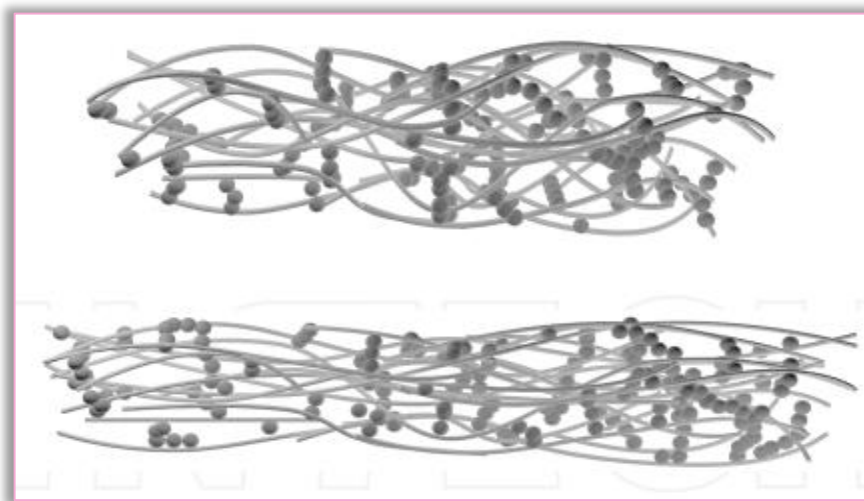


Figura 3: Dibujo esquemático de la estructura de las proteínas del gluten, donde las gliadinas están representadas por esferas y las gluteninas por filamentos. La estructura más voluminosa en la parte superior muestra el gas retenido en la red de gluten y la consiguiente expansión del volumen de la masa observada en el proceso de horneado. La estructura más delgada en la parte inferior representa la plasticidad, la extensibilidad y las propiedades viscosas de la matriz de gluten. Tomado de Miguel y col. (2013).

Las gliadinas aportan principalmente las propiedades de plasticidad, extensibilidad y viscosidad a la masa de harina de trigo, mientras que las gluteninas son más bien responsables de la elasticidad y la fuerza cohesiva. (Fig. 3). Aspectos como la estructura del polímero de glutenina, la distribución de tamaño y la composición de subunidades, así como la proporción de gliadina/glutenina son importantes para determinar el contenido de gluten, su calidad y el potencial panificable de la harina de trigo (Cao y col., 2023).

Los polisacáridos no amiláceos de los cereales son los que conforman la fibra dietética, y están compuestos principalmente de arabinoxilanos, β -glucano y péptidos de arabinogalactano. Los arabinoxilanos constituyen la mayor fracción de polisacáridos no amiláceos de las paredes celulares de muchos cereales, como el trigo y el centeno, representando un promedio del 2 al 3% de la harina. Se trata de polisacáridos dispersos con propiedades estructurales similares, teniendo entre un 0,31 a 0,69% de fracciones extraíbles con agua (WE-AX; *water extraction arabinoxilans*) y un 70-85% de fracciones no extraíbles con agua (WN-AX *water non extraction arabinoxilans*) (Autio, 2006, Iqbal y col., 2023).

Los menores constituyentes de la harina son los arabinoxilanos. Éstos tienen la capacidad de afectar significativamente las propiedades de la masa y el producto horneado final y la capacidad para absorber aproximadamente 10 veces su peso en agua. Poseen un esqueleto de D-xilopiranosilo unido a β -1,4 sustituido con residuos de α -L-arabinofuranosa en las posiciones C(O)₃ y/o C(O)₂. Los residuos de arabinosa se pueden acoplar aún más en el C(O)₅ al ácido ferúlico a través de un enlace éster (Figura 4).

Los arabinoxilanos y arabinogalactanos poseen importantes propiedades funcionales para la industria cerealera. Pueden afectar el desarrollo y la estabilidad de la masa, modificando su capacidad de absorción de agua. Los arabinoxilanos no extraíbles compiten con el gluten por la absorción del agua, interfieren en el proceso de formación de la red y la

formación del film proteico durante el proceso de mezclado. Por su parte, los arabinoxilanos extraíbles de peso molecular intermedio, favorecen el aumento de volumen (Li y col., 2022).

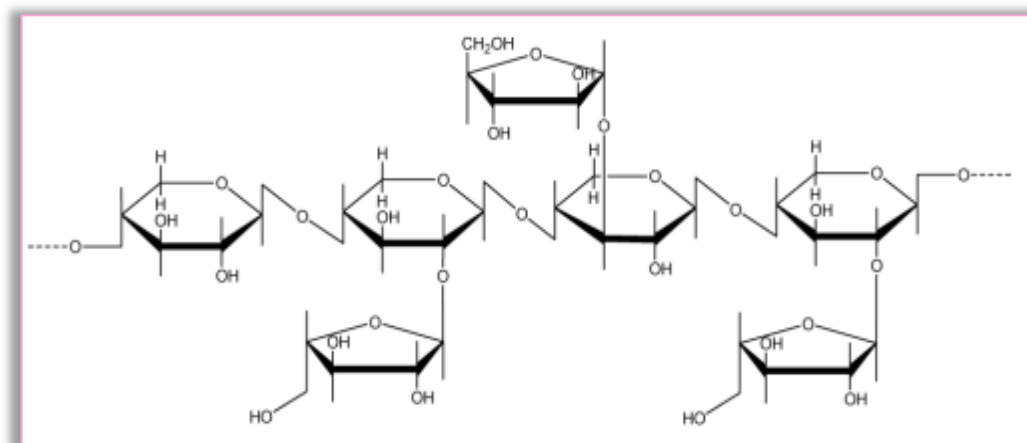


Figura 4: Estructura parcial de un arabinoxilano: una cadena principal lineal formada por xilano (un pentosano que consiste en unidades D-xilosa conectadas por enlaces β (1 \rightarrow 4), unidas aleatoriamente a residuos de L-arabinofuranosa por enlaces α (1 \rightarrow 3) o α (1 \rightarrow 2). Tomada de Miguel y col. (2013).

1.1.2 Proceso de elaboración de panificados

El proceso de elaboración del pan consta de diversas etapas, que varían según el sistema de elaboración y el tipo de pan.

En primer lugar, se encuentra el **amasado**, cuyo objetivo es lograr la mezcla íntima de los ingredientes y obtener, por medio del trabajo mecánico, una masa plástica y oxigenada. Posteriormente, la masa se divide en trozos y se realiza una etapa de reposo para permitir su recuperación después de la desgasificación. Esta etapa se lleva a cabo a temperatura ambiente. La **fermentación** es otra etapa crucial, en la cual las levaduras transforman los azúcares fermentables en etanol, CO₂ y otros productos secundarios. Este proceso tiene como propósito lograr la esponjosidad del pan y mejorar su sabor. Se produce durante el tiempo que transcurre desde que se mezclan todos los ingredientes (amasado) hasta que, el interior de la masa, ya dentro del horno, llegue a 50 °C. Por último, durante el **horneado**, el calor

aplicado al almidón presente en la harina provoca la ruptura de los enlaces entre las moléculas de amilosa y amilopectina, lo que resulta en la gelatinización del almidón. Esto transforma la masa fermentada en pan, mediante la evaporación del etanol producido en la fermentación y parte del agua contenida en la masa, la coagulación de las proteínas, la transformación del almidón en dextrinas y azúcares menores y el oscurecimiento de la corteza. Este paso se realiza a temperaturas que van desde los 220 a los 260 °C, aunque el interior de la masa nunca llega a los 100 °C.

1.1.2.1 Cambios en el proceso de horneado

Durante el proceso de horneado, se producen cambios en la estructura del pan. El calor, la humedad y el tiempo inducen la gelatinización y la formación de pasta del almidón lo que, junto con el endurecimiento por calor de las proteínas del gluten, genera la típica estructura del pan horneado. Asimismo, la red de gluten se convierte en una estructura continua permanente de redes amorfas, transitorias y gelatinizadas de almidón. Los gránulos de almidón gelatinizados hinchados se deforman, parte de los polímeros de almidón se filtran fuera de ellos y forman una red continua en la miga del pan.

Por otra parte, durante el proceso de horneado, la red transitoria de gluten formada en la masa, se convierte en una red continua y permanente debido a modificaciones en la hidrofobicidad de la superficie de la proteína, intercambios de sulfhidrilo/disulfuro y la formación de nuevos enlaces cruzados de disulfuro (Pareyt y col., 2011).

Los cambios macroscópicos durante el horneado incluyen una mayor expansión de la masa y el oscurecimiento de su corteza, lo que está directamente relacionado con los azúcares reductores (glucosa, fructosa, maltosa, entre otros), que, durante el calentamiento, se caramelizan y reaccionan con los grupos de aminoácidos libres de las proteínas. A este efecto

se lo conoce como “reacción de Maillard”. El horneado también origina un cambio en el sabor, que le otorga al pan su olor característico.

Durante el enfriamiento se producen interacciones adicionales entre los biopolímeros en la miga de pan, como la formación de estructuras de amilosa y complejos de inclusión con lípidos polares. Estas interacciones dan como resultado una miga blanda en el pan fresco.

1.1.3 Agregado de productos químicos a panificados

Aunque el pan tiene cinco ingredientes básicos (harina, levadura, agua, aceite y sal), la industria panadera busca constantemente alternativas para mejorar sus formulaciones, pretendiendo extender la vida útil, mejorar la cohesión, viscosidad y elasticidad de la masa, aumentar el volumen, la estructura de las migas, el sabor y el color del producto final o bien estandarizar la producción (Vargas y col., 2021).

En este sentido, agentes oxidantes, reductores, tampones, enzimas, mejoradores/ acondicionadores de masa y conservantes, son solo algunos ingredientes de una larga lista que se utilizan como aditivos en los panificados para lograr diferentes propósitos. Se trata de químicos muchas veces dañinos, que pueden conducir a diferentes tipos de problemas en la salud (Vargas y col., 2021). Azodicarbonamida (ADA), ácido ascórbico (AA), bromato de potasio (PB), ácidos propiónicos y sórbicos, están prohibidos en la Unión Europea, pero, aun así, los siguen utilizando como aditivos en países como EEUU, Canadá, Brasil, sin importar sus efectos cancerígenos o que sean los causales de enfermedades crónicas, como es el caso de la ADA y el PB, (Daud, y col., 2016).

En los últimos años, los consumidores han mostrado preocupación por la presencia de aditivos y conservantes en los panificados (Sheikholeslami y col., 2020), exigiendo productos más naturales y orgánicos, libres de aditivos dañinos para la salud. La industria ha respondido

a esta demanda buscando formulaciones alternativas para reemplazar aditivos químicos con ingredientes naturales. En este sentido, el concepto de “*clean level*”, que traducido del inglés significa “etiqueta limpia”, se ha desarrollado en respuesta a esta demanda, para identificar aquellos productos estándares más naturales y saludables (Rahman y col., 2022).

1.1.3.1 Enzimas

Las enzimas son proteínas especializadas que funcionan como catalizadores bioquímicos, acelerando la velocidad de reacción. En la mayoría de los casos, son de naturaleza proteica y son esenciales para los seres vivos. También son ampliamente utilizadas en diferentes tipos de industrias.

El uso de enzimas se remonta mucho antes de que se reconociera su capacidad para catalizar reacciones y su naturaleza química (Chen y col., 2020). Su uso en diversas formulaciones, ha aumentado después de la Segunda Guerra Mundial debido a los grandes avances en la industria microbiológica y en la ingeniería bioquímica (Illanes, 2008).

Actualmente, al menos el 50% de las enzimas comerciales se obtienen de organismos modificados genéticamente mediante ingeniería genética y proteica. Las enzimas se utilizan para convertir la materia prima en el producto principal, en condiciones óptimas y controladas para incrementar su potencial catalítico o bien para alterar una característica funcional del producto como aditivos, aunque en este último caso es más difícil asegurar condiciones óptimas y controlar la reacción enzimática (Shevkani, 2021).

Las enzimas tienen aplicaciones en áreas tan diversas como alimentos, bebidas, detergentes, textiles, lavandería, curtiembre, y así también en las industrias farmacéutica y cosmética. Estas aplicaciones constituyen más del 80% del mercado mundial de enzimas

(Shevkani 2021), siendo la industria alimentaria la que representa la mayor parte del mercado (Fernandez y col., 2023).

1.1.3.1.1 Mecanismo de acción enzimática en productos panificados

Las enzimas desempeñan un papel importante en la elaboración de productos panificados, ya que pueden mejorar aspectos cualitativos como el sabor, el volumen, la estructura de la miga y la durabilidad del pan (Dong y Karboune. 2020). Su uso ha aumentado especialmente en la industria panadera debido a la mecanización del proceso de panificación y la demanda de productos naturales (Nieter y col., 2016).

Las enzimas utilizadas en la elaboración de panificados, actúan sobre los principales polímeros de la harina, como la amilosa y la amilopectina, las proteínas formadoras de gluten y los arabinoxilanos e interaccionan con la masa otorgándole propiedades beneficiosas. Esto ocurre cuando los componentes de la harina son hidrolizados parcialmente por enzimas amilasas, lipasas, proteasas y xilanasas, o cuando son polimerizados a través de glucosa oxidasas (GOX), transglutaminasas o lacasas (Gioia y col., 2017).

1.1.3.2 Enzimas utilizadas en productos panificados

La elaboración de los panificados comprende el uso de enzimas provenientes de tres fuentes: las enzimas endógenas de la harina, las enzimas asociadas con la actividad metabólica de los microorganismos dominantes y las enzimas exógenas añadidas a la masa (Raveendran y col., 2018). Estas pueden ser agregadas individualmente o en mezclas, si responden de manera sinérgica en la producción.

1.1.3.2.1 Hidrolasas EC 3 utilizadas en productos panarios

Las hidrolasas son enzimas que se encargan de hidrolizar distintos tipos de enlaces químicos en muchos compuestos diferentes, los principales son los enlaces éster, los glucosídicos y los peptídicos.

El procesamiento industrial del almidón comienza comúnmente con α -amilasas (α -1,4-glucanohidrolasa). La mayoría de las enzimas conversoras de almidón pertenecen a la familia de las α -amilasas o a la familia de las glicosil hidrolasas (GH), según la secuencia de aminoácidos y las similitudes estructurales.

Las α -amilasas (EC 3.2.1.1) son endoenzimas que catalizan la escisión de los enlaces α -1,4-glucosídicos en la parte interna de la cadena de amilosa o amilopectina. Los productos finales de la acción de la α -amilasa son oligosacáridos con configuración α y longitud variable, y las dextrinas límite α , que son oligosacáridos ramificados (Tebben y col., 2018). Estas enzimas pueden obtenerse de fuentes de cereales, hongos, bacterias y bacterias modificadas biotecnológicamente. Las diferencias en el número de sitios de unión y la ubicación de las regiones catalíticas, determinan la especificidad de sustrato de las α -amilasas, la longitud de los fragmentos de oligosacáridos liberados después de la hidrólisis y, en consecuencia, el perfil de carbohidratos del producto final.

Las enzimas amilasas α maltogénicas (EC 3.2.1.133) son eficientes tanto para retrasar el envejecimiento del pan debido a la retrogradación del almidón, como para disminuir la dureza de los productos de trigo (Tebben y col., 2020).

La enzima amiloglucosidasa exoactiva (EC 3.2.1.3) cataliza la ruptura de enlaces α -1,4 y, en menor medida, enlaces α -1,6 glucosídicos. Este tipo de enzimas se utiliza para reducir el tiempo de horneado y mejorar el color de la miga del pan, debido a la generación de glucosa durante la reacción de Maillard (Struyf y col., 2017).

Por otro lado, las proteasas 3.4 pueden subdividirse en dos grandes grupos según su sitio de acción: exopeptidasas y endopeptidasas. Las exopeptidasas escinden el enlace peptídico próximo a los extremos amino o carboxi del sustrato, mientras que las endopeptidasas escinden los enlaces peptídicos alejados de los extremos del sustrato (Gioia y col., 2017). La mayor parte de la actividad proteolítica de las harinas de trigo y centeno corresponde a proteasas aspárticas y carboxipeptidasas, ambas activas a valores de pH ácido. Las proteasas que presentan pH óptimo entre 5 y 8, son generalmente las preferidas para su uso como mejoradoras de panificados (Gioia y col., 2017). Esto se debe a la hidrólisis de las proteínas formadoras de gluten por parte de las proteasas, que disminuyen la resistencia a la extensibilidad de la masa y mejoran la suavidad y elasticidad de la miga de los productos panificados. Estas enzimas se utilizan a gran escala en la producción comercial de diversos tipos de productos panificados. Se añaden con el objetivo de reducir el tiempo de amasado, disminuir la consistencia de la masa, asegurar su uniformidad, regular la fuerza del gluten en el pan, controlar la textura del y mejorar el sabor (Dai y Tyl, 2021).

Las lipasas (EC 3.1.13) o triacilglicerol acil hidrolasas, hidrolizan triacilgliceroles (TAG) produciendo monoacilgliceroles (MAG), diacilgliceroles (DAG), glicerol y ácidos grasos libres. Estas enzimas se encuentran ampliamente en la naturaleza. Si bien están presentes en todos los granos de cereales, la actividad de la lipasa de la harina blanca suele ser baja como para evitar la acidez debido a la hidrólisis de los lípidos nativos. El uso de lipasas en el segmento de panificación es mucho más reciente en comparación con las α -amilasas y las proteasas, su introducción en el mercado data de principios de los años 1990.

Las lipasas generan mono- y diacilgliceroles, modificando así el lípido endógeno (Melis y Delcour, 2020). Los lípidos no polares reducen el volumen del pan, mientras que los lípidos polares tienen el efecto contrario y se comportan de manera similar a algunos tensioactivos

de uso común. Ciertos estudios han informado que la enzima lipasa mejora el volumen de los panificados (Gerits y col., 2014), resultando en mayores cantidades de lípidos polares, como fosfolípidos y galactolípidos (Melis y col., 2019).

Sin embargo, como el término lipasas se refiere a un grupo de enzimas que actúan sobre una amplia gama de sustratos, la hidrólisis de algunos lípidos puede ser beneficiosa para las propiedades de la masa y el pan, mientras que otros lípidos deben permanecer preferentemente intactos. Por lo tanto, no se puede esperar que con todas las lipasas se obtengan resultados similares en un sistema de masa de pan dado. En este sentido, Melis y Delcour (2020) resumieron las características de las lipasas relacionadas a un uso exitoso en la panificación y destacaron la importancia de lograr un perfil lipídico equilibrado.

1.1.3.2.2 Endoxilanasas (EX)

Las xilanasas o endo- β -(1,4) - D-xilanasas (EC 3.2.1.8) son enzimas hidrolíticas que se encuentran en bacterias, hongos y algunas plantas. Su función principal es descomponer la xilosa, un tipo de azúcar complejo presente en la hemicelulosa, que es un componente estructural de las plantas.

En la industria de los panificados con harina de trigo, la xilanasa se utiliza como mejoradora de la calidad del pan. Esta enzima tiene la capacidad de romper los enlaces de xilanos presentes en la hemicelulosa de la harina, resultando en una mejora de la calidad de la masa y del producto final. La acción de la xilanasa ayuda a hidrolizar la hemicelulosa, disminuyendo el peso molecular y modificando su capacidad de absorción de agua, facilitando la fermentación de la levadura presente en la masa de pan, lo que otorga efectos beneficiosos en los panificados, ya que mejora la extensibilidad y elasticidad de la masa, facilita su manejo durante el proceso de panificación (Zhan y col., 2014) y favorece además la retención de agua

en la masa, resultando en una mayor humedad y una mejor textura del pan. Esta enzima también tiene un efecto positivo sobre la vida útil del panificado (Zheng y col., 2011).

Para lograr estos efectos, es conveniente que la especificidad de las xilanasas sea alta para las fracciones no extraíbles de arabinoxilanos y baja con las fracciones extraíbles, además de tener baja sensibilidad a los inhibidores presentes en la harina. Asimismo, el pH y la temperatura óptima de actividad de la enzima influyen en el proceso de elaboración y las características finales del producto, siendo preferible el empleo de xilanasas con alta estabilidad térmica (Li y col., 2018).

En la fig. 5 se observa la hidrólisis de arabinoxilanos por xilanasas. Esta ocurre dentro de la región no sustituida de la columna vertebral y da como resultado una reducción de la capacidad de retención de agua y la viscosidad (Fig. 5 A). El peróxido de hidrógeno producido después de la oxidación de β -D-glucopiranosas por glucosa oxidasa se puede utilizar para convertir grupos sulfhidrilo en enlaces disulfuro o para inducir enlaces cruzados en arabinoxilanos a través de la formación de deshidrodiferulato. (Fig. 5 B). Otras oxidorreductasas catalizan reacciones similares, pero usan sustratos adicionales o se oxidan en diferentes posiciones. En la fig. 5 C, se muestra la hidrólisis de arabinoxilanos no extraíbles en agua y como facilita la formación de red inducida por glucosa oxidasa. Si bien dicha hidrólisis también puede conducir a la reticulación de fragmentos de arabinoxilano, esos productos de reacción pueden ser lo suficientemente pequeños como para no interferir con la agregación de proteínas (mecanismo propuesto por Primo-Martín y col., 2005). Los enlaces

discontinuos entre las cadenas de proteínas en (B) y (C) representan interacciones no covalentes entre residuos peptídicos.

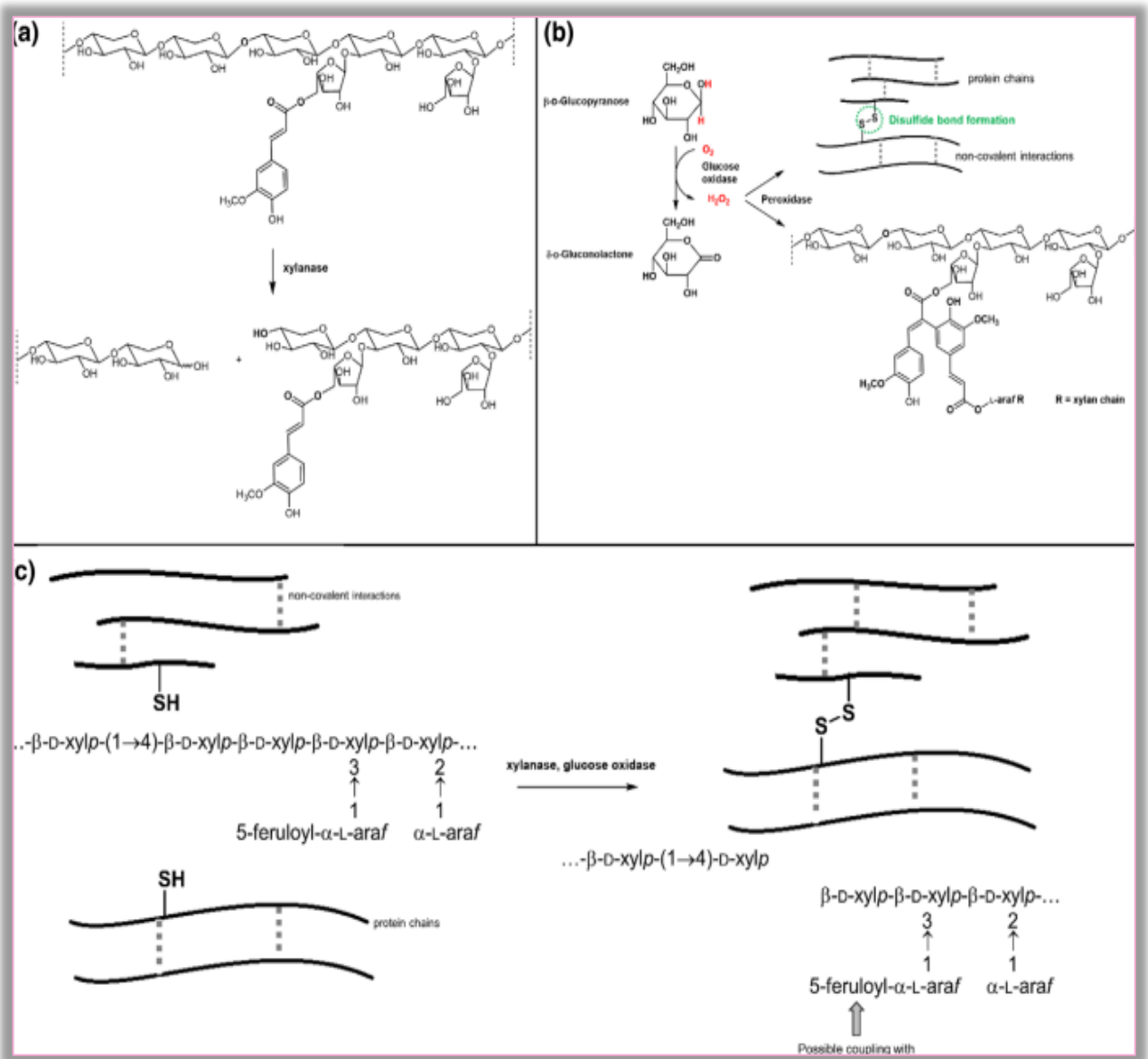


Figura 5: Cambios moleculares inducidos por la adición de xilanasa (a), glucosa oxidasa (B) o ambas (C) a sistemas de masa de trigo. Tomado de Dai y Tyl (2021).

1.1.3.2.3 Oxidasas EC 1 utilizadas en productos panarios

Las oxidasas son enzimas que catalizan una reacción de oxidación/reducción empleando oxígeno molecular (O_2) como aceptor de electrones. En estas reacciones el oxígeno se reduce a agua (H_2O) o a peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La glucosa oxidasa (GOX EC 1.1.3.4), cataliza la oxidación de β -d-glucosa a δ -d-gluconolactona y H_2O_2 (Bamburowicz Klimkowska y col., 2023) (Fig. 5 B). Esta enzima se puede obtener a partir de diferentes fuentes fúngicas, principalmente los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, siendo *A. niger* el más utilizado.

El H_2O_2 generado en la reacción catalizada por esta enzima es utilizado por peroxidases endógenas para oxidar grupos sulfhidrilo en gluteninas o para entrecruzar oxidativamente unidades de ácido ferúlico (Li y col., 2018). Estas reacciones pueden promover la gelificación de WE-AX, lo que aumenta la cantidad de agua retenida, ejerciendo así un efecto positivo sobre las características de la masa de trigo y del pan. Se ha informado que la adición de GOX fortalece la masa de pan, lo que se refleja en una mayor resistencia a la extensibilidad de la masa (Altinel y Ünal, 2017).

La tirosinasa (EC 1.14.18.1) es una enzima que puede oxidar monofenoles, incluyendo la tirosina presente en las cadenas laterales de las proteínas. Esta enzima promueve el entrecruzamiento de proteínas como las gliadinas encontradas en el trigo. La tirosinasa mejora la polimerización de las globulinas de avena, fortaleciendo así la red de proteínas resultante y aumentando el volumen específico de pan de avena (Flander y col., 2011). Por otro lado, un estudio realizado por Manhivi y col., (2020) encontró una disminución de los grupos sulfhidrilo en el pan de amadumbe sin gluten suplementado con tirosinasa, lo que indica un aumento de los enlaces disulfuro y, como consecuencia, una red de proteínas más fuerte en este sistema sin gluten.

1.1.3.2.3.1 Lacasa 1.10.3.2

Las lacasas (EC 1.10.3.2) oxidan los compuestos fenólicos, como el ácido ferúlico y a un ritmo más lento la tirosina, a través de un proceso inducido por radicales libres (Pezzella y col.,

2015) y, por lo tanto, promueve la reticulación de los polímeros de la harina de trigo, particularmente arabinoxilanos. También se informó que la gelación de los arabinoxilanos inducida por esta enzima es dependiente de la concentración inicial de ácido ferúlico. Asimismo, los radicales fenoxi pueden reducirse con tioles, como el glutatión o la cisteína, que conducen a la formación de enlaces disulfuro (Selinheimo y col., 2007).

Se ha sugerido que la lacasa oxidaría en primer lugar a los arabinoxilanos en la masa, para lo cual, se propusieron dos explicaciones. Una de ellas es que la masa está formada por redes de gluten y arabinoxilanos interpenetrados o bien que las partículas gelificadas de arabinoxilano conforman una fase separada inmersa en la red de gluten. No se encontraron evidencias de la formación de redes entre el arabinoxilano y el gluten formando enlaces covalentes. Además, se ha demostrado que la red de arabinoxilanos evitaría la formación de la red de gluten (Autio, 2006). Se han utilizado lacasas para aumentar el volumen de los panificados, para mejorar sus migas y para extender su vida útil (Agrawal y col., 2018; Ayala Soto y col., 2017). Pueden mejorar el desarrollo y la estabilidad de la masa, optimizando su capacidad de absorción de agua. Estos polisacáridos también confieren viscosidad y aumentan la permeabilidad a los gases al contribuir a la elasticidad de la película proteica que los rodea. Además, durante la elaboración del pan, mejoran el volumen, otorgan la firmeza a la miga, reducen la retrogradación y, mejoran la vida útil y la estabilidad del pan (Zanini y col., 2022).

En la provincia de Misiones, existen diversos tipos de microorganismos y hongos nativos que producen enzimas con propiedades beneficiosas para ser utilizada con el fin de mejorar las propiedades de los panificados. Sin embargo, el alto costo y la baja producción de las cepas nativas, así como la secreción de otros productos no deseados, limitan su aplicación industrial (Molina y col., 2023). Por lo tanto, es necesario buscar alternativas para obtener el producto deseado a través de un vector de expresión.

1.1.4 Proteínas recombinantes

La Biología Molecular y la Biotecnología han sido una de las ramas de la Biología que más ha crecido durante los últimos años, tanto desde el punto de vista de sus contenidos como de su metodología. Sus aplicaciones se extienden a diversos campos de la Ciencia, logrando a través de sus avances importantes desarrollos en ambiente, alimentos, biomedicina y bioprocesos. El área de la biotecnología se encarga de producir enzimas que son ampliamente utilizadas en la vida cotidiana (Tripathi y col., 2019). Según un informe reciente de Market.biz, el mercado de las proteínas recombinantes ha experimentado un desarrollo excepcional durante el año 2022, y se espera un aumento exponencial hasta el año 2030. Entre las empresas líderes en este sector a nivel mundial se encuentran Novozymes, Danisco, DSM, AB Enzymes, y BASF (Spohner y col., 2016). En Argentina, el mercado está representado por KECLON. Estos proveedores, son responsables de comercializar hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, enzimas metabólicas, proteínas de plasma, factores recombinantes, que son utilizadas principalmente por empresas biofarmacéuticas, institutos académicos e investigadores.

Las proteínas recombinantes, también conocidas como proteínas quiméricas o heterólogas, son aquellas que se obtienen al expresar un gen clonado en una especie o línea celular diferente a la original.

Para obtener una proteína recombinante, se parte de ADN recombinante, que es una molécula de ADN artificial formada de manera deliberada *in vitro* insertando secuencias de ADN provenientes de un organismo, en el genoma de uno diferente. Deben cumplirse las siguientes condiciones:

- El gen debe clonarse y caracterizarse.

- El gen debe subclonarse en un vector de expresión adecuado, para luego transferirse a la célula donde se va a expresar.
- La proteína recombinante debe retener su funcionalidad biológica.

La producción de proteínas recombinantes es uno de los aportes más importantes de la biotecnología moderna. Estas proteínas juegan un papel trascendental en el estudio de procesos biológicos. Para producirlas, se requiere el uso de un sistema de expresión, que se selecciona en función de las características y la aplicación prevista para la proteína (Tripathi y col., 2019). El sistema de expresión recombinante permite la obtención de enzimas fáciles de purificar y facilita la realización de estudios de ingeniería genética con el objetivo de obtener proteínas con las propiedades deseadas.

Las proteínas recombinantes se pueden producir en diversos sistemas biológicos como bacterias, levaduras, insectos y mamíferos. En general, bacterias y levaduras son los sistemas más usados en la obtención de estas proteínas para su aplicación en panificados.

La bacteria *Escherichia coli* fue el primer organismo utilizado para expresar proteínas recombinantes debido a su rápido crecimiento y facilidad de manipulación genética (Owczarek y col., 2019). Utilizando bacterias, se han producido enzimas con distintos objetivos en diversos tipos de panificados como amilasas y maltotetra hidrolasas para retrasar el envejecimiento (Lin y col., 2023; Su y col., 2020), proteasas para aumentar el valor nutricional en pan sin gluten, (Heredia Sandoval y col., 2016), hemicelulasas y lipasas para obtener migas más suaves y con una estructura más fina, así como para aumentar el volumen de los panificados (Bock, 2015).

Las levaduras fueron las primeras células eucariotas utilizadas para expresar proteínas recombinantes. Como sistema de producción, éstas son consideradas hospederos valiosos debido a que presentan importantes ventajas, entre las que se incluyen la capacidad de

realizar modificaciones postraduccionales adecuadas, un rápido crecimiento, una manipulación genética simple, fermentación escalable, altas concentraciones de biomasa y producción segura (Kim y Kim, 2016). La primera levadura utilizada para la expresión de proteínas recombinantes fue *Saccharomyces cerevisiae* (Strausberg y Strausberg, 2001). Hasta la fecha, muchas enzimas se expresaron en levaduras con el fin de ser utilizadas en la industria panadera (Ahmad y col., 2014, Molina y col., 2023, Zhan y col. 2014).

Los desarrollos en tecnología aliados al uso de técnicas recombinantes durante las últimas décadas, permitieron mejorar considerablemente los rendimientos por fermentación, aumentar la estabilidad y alterar la especificidad y selectividad enzimáticas (De Brabander y col., 2023). Estas técnicas han impulsado y continúan ampliando las aplicaciones de las enzimas tanto en tecnología de los alimentos como así también en diversas áreas.

1.1.4.1 Expresión de proteínas recombinantes en *Kluyveromyces lactis*

Kluyveromyces lactis es una levadura de elevado interés biotecnológico debido a su capacidad para expresar altos niveles a gran escala proteínas recombinantes mediante rápido crecimiento de alta densidad celular y sin presentar *background* de expresión celular durante los pasos de clonación en *E. coli* además de un fácil y ligero procedimiento de transformación celular (Spohner y col., 2016).

Trabajando con la levadura *Kluyveromyces lactis* (E100S, *K. lactis*, Protein Expression Kit, NEBiolabs) las proteínas pueden ser producidas intracelularmente o ser secretadas usando el vector de expresión integrativo pKLAC2.

Para lograr la secreción de proteínas, un gen de interés se clona aguas abajo del dominio de secreción del factor de apareamiento α de *K. lactis* (α – MF) el cual es finalmente procesado en el aparato de Golgi resultando en la secreción de la proteína deseada (Fig. 6).

Las principales ventajas que ofrece este método son:

- Tiene una alta eficiencia de transformación, lo que hace que el sistema sea adecuado para métodos que requieren gran número de transformantes.
- La selección de levaduras transformadas utiliza un único método libre de antibióticos en la que la enzima acetamida (amdS) expresada a partir de las células transformadas con pKLAC2, permite utilizar acetamida como única fuente de nitrógeno en un medio definido.
- Dicha selección promueve la generación de células que contienen múltiples integraciones de pKLAC2 que resultan en mayores rendimientos de proteína.
- Poseen la capacidad para lograr rápidamente cultivos de alta densidad y abundante producción de proteínas recombinantes.
- Por último, las proteínas expresadas en *K. lactis* tienen acceso a la maquinaria de plegamiento y glicosilación de proteínas eucariotas (*K. lactis* expression Kit, NeB).

Además, las enzimas de *K. lactis* cuentan con el estado GRAS (generalmente consideradas seguras) otorgado por la FDA, lo que permite su uso en diversas aplicaciones de alimentos. Finalmente, New England Biolabs ofrece un kit de reactivos fácil de usar para la expresión de proteínas en esta levadura.

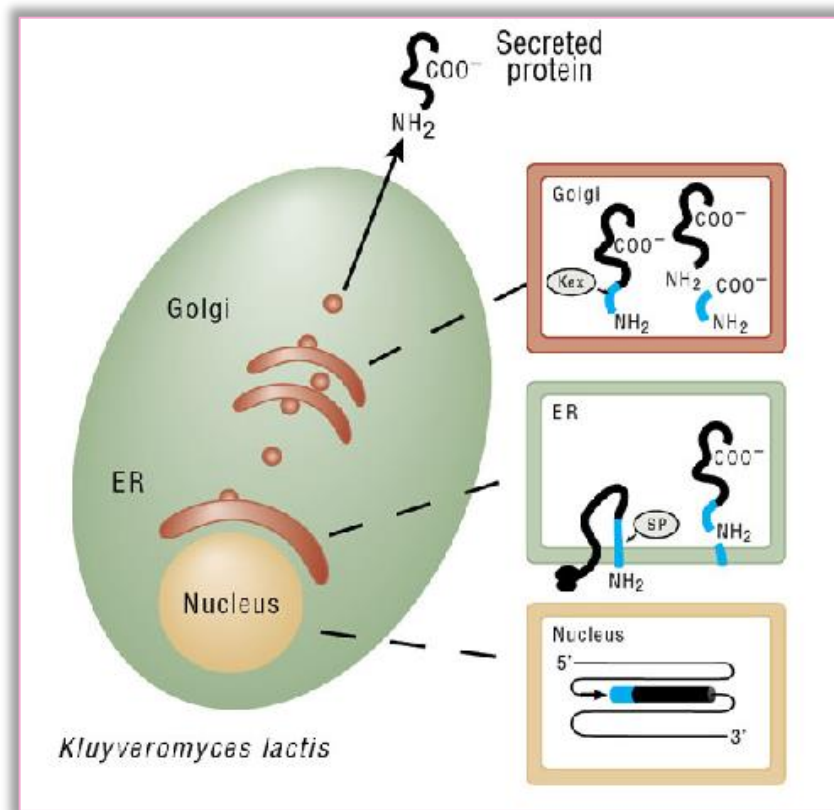


Figura 6: Proceso de secreción proteica. En el núcleo, se expresa un vector de expresión integrado que codifica la fusión entre el dominio α -MF (azul) y la proteína deseada (negro). Un péptido señal en el dominio α -MF dirige la entrada de la proteína de fusión en el retículo endoplásmico (ER) y es retirada por la peptidasa señal (SP). La proteína de fusión se transporta al Golgi, donde la proteasa Kex elimina el dominio α -MF. La proteína de interés es secretada luego de la célula. (Tomado de: Manual *K. lactis* Protein Expression Ki).

1.1.4.2 Metabolismo energético de levaduras

Las levaduras pueden metabolizar una gran variedad de fuentes de carbono, sin embargo, prefieren la glucosa y la fructosa. Cuando uno de estos azúcares está presente, las enzimas requeridas para la utilización de fuentes alternativas de carbono se sintetizan a tasas bajas o, por el contrario, no se sintetizan. Este fenómeno es conocido como represión catabólica. Una alta concentración de glucosa en el medio de cultivo conlleva a la expresión de los genes específicos implicados en el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. El ciclo del glicoxilato, la gluconeogénesis y el metabolismo de los otros azúcares se reprimen.

Simultáneamente, se induce la expresión de genes involucrados en la fermentación alcohólica y se obtiene el consumo preferencial de glucosa sobre las otras fuentes de carbono (Rodrigues y col., 2015). *K. lactis* pertenece al grupo aeróbico facultativo y metaboliza la glucosa por vías oxidativas y oxidorreductoras; siendo una levadura respiratoria (Díaz-Bustamante y col., 2023).

Capítulo II

ENDOXILANASAS



2 CAPÍTULO II: ENDOXILANASAS INTRODUCCIÓN

2.1 Enzimas xilanolíticas

Las enzimas xilanolíticas son producidas en la naturaleza principalmente por bacterias y hongos con el fin de degradar los polisacáridos de la pared celular vegetal. Se clasifican en dos grupos: las que actúan sobre el esqueleto de xilano, y las que se encargan de remover las cadenas laterales. Dentro del primer grupo se encuentran las endo- β -1,4- xilanasas (E.C. 3.2.1.8) y las β -xilosidasa (E.C. 3.2.1.37) y dentro del segundo grupo, están las otras enzimas que son necesarias para la hidrólisis de los sustituyentes como α -L- arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), α -glucuronidasa (EC 3.2.1.139), α -galactosidasa (EC 3.2.1.22), acetil-xilano esterasa (EC 3.1.1.72) y ácido ferúlico esterasa (EC 3.1.1.73) (Juturu y Wu, 2012).

2.1.1 Endoxilanasas (EX)

Las xilanasas o endo- β -(1,4) - D-xilanasas (EC 3.2.1.8) (Fig. 7), son enzimas encargadas de degradar el componente principal de la hemicelulosa: el xilano (Dhiman y Mukherjee, 2018). Se trata de glicosil hidrolasas que catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico interno β -(1,4) de la cadena de xilosa del xilano, generando así xilooligosacáridos (XOS) de bajo peso molecular con o sin ramificaciones (Bhardwaj y col., 2019). Si bien la hidrólisis del xilano fue descrita por primera vez a principios del siglo XIX, la primera purificación parcial de una xilanasas, data de la década del 50, se realizó a partir de un cultivo de *Aspergillus foetidus* y desde entonces, un gran número de xilanasas diferentes han sido identificadas y caracterizadas (Heinen y col., 2019).

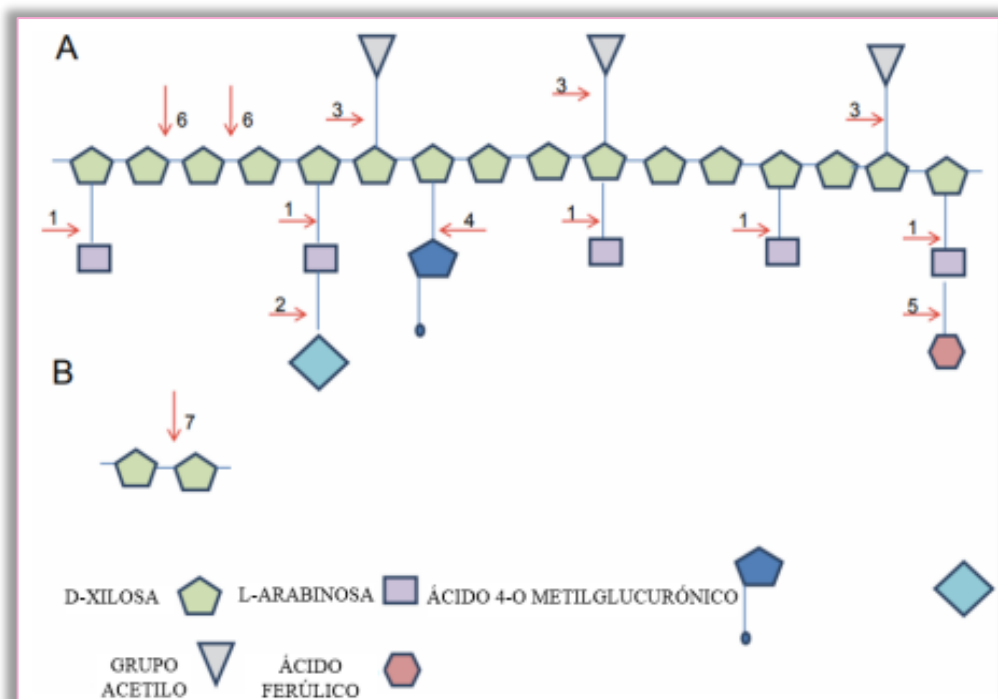


Figura 7: Estructura del xilano y sitios de acción de las enzimas xilanolíticas. A) el xilano se compone de un esqueleto central de residuos de xilosa unidos por enlaces 1,4-B; B) su hidrólisis completa se da por la acción de B-D-xilosidasa. Las enzimas que catalizan las reacciones se señalan con flechas enumeradas: (1) α -L-arabinofuranosidasa, (2) α -galactosidasa, (3) acetil-xilano esterasa, (4) α -glucuronidasa, (5) feruloil esterasa, (6) endo- β -1,4-xilanasas, (7) β -xilosidasa. Tomado de Malhotra y Chapadgaonkar (2018).

2.1.2 Estructura de la enzima xilanasas

La mayoría de las xilanasas, presentan una estructura molecular compleja, que comprende módulos discretos funcionalmente independientes, unidos entre sí por secuencias aminoacídicas no estructuradas llamadas secuencias *linker* (Heinen y col., 2019, Fig. 8). La estructura típica está compuesta por un módulo catalítico unido a módulos accesorios adicionales tales como los dominios de unión a fibronectina tipo III (Fn3), los módulos homólogos de la capa superficial (SLH del inglés *surface-layer homologous*) y los módulos de unión a carbohidratos (CBMs, del inglés *carbohydrate binding modules*). El dominio catalítico de las xilanasas, presenta una hendidura abierta en la que se aloja el sitio catalítico o centro activo de la enzima, donde se une el sustrato para ser hidrolizado. Los aminoácidos, en su

mayoría residuos aromáticos, recubren la pared interna de la hendidura y forman los subsitios de unión al sustrato (un subsitio es una región capaz de acomodar una unidad monomérica del sustrato tal como la xilosa o la arabinosa). Los aminoácidos que componen el subsitio, interactúan con el sustrato mediante puentes de hidrógeno o uniones hidrofóbicas y son fundamentales en el reconocimiento del mismo. Los subsitios se denominan desde $-n$ a $+n$, con número negativo para los subsitios situados hacia la región glicón (extremo no reductor) del sustrato y con número positivo para los subsitios situados hacia la región aglicón del sustrato (extremo reductor). El corte del enlace glicosídico ocurre entre los subsitios -1 y $+1$ del sitio catalítico (Joshi y col., 2022). Las xilanasas difieren en su especificidad por los diferentes tipos de xilano que degradan. Pueden mostrar preferencias por el grado de polimerización, el grado de sustitución o el patrón de sustitución del xilano. Asimismo, estas enzimas presentan estructura tridimensional, mecanismo catalítico y propiedades fisicoquímicas diferentes (Bhardwaj y col., 2019).



Figura 8: Modelo teórico de la proteína xilanasas. Se puede observar una α -hélice y hojas β . Modelado teórico realizado con la herramienta Swiss- Model disponible online.

2.1.3 Características de las enzimas

Las endo-1,4- β -D-xilanasas, son proteínas monoméricas con masas moleculares y puntos isoeléctricos que oscilan en un amplio rango de acuerdo a la familia a la que pertenecen. Existen endoxilanasas con masas moleculares entre 8 y 145 kDa y con puntos isoeléctricos que varían entre 3 y 10. Por su parte, el pH óptimo para la actividad catalítica de la endoxilanasas se encuentra entre 4 y 7, mientras que la temperatura óptima está dentro del rango de 40 a 60°C (Barchuk 2017).

Dado que el xilano es un polímero de elevado grado de polimerización, no puede penetrar dentro de los microorganismos para ser degradado, por este motivo, la mayoría de las veces, las xilanasas deben ser secretadas al medio extracelular mediante el sistema de secreción de tipo II, son “sec dependientes”, (requieren del sistema de secreción Sec, el Sec pathway) (Tjalsma y col., 2004). Se han descrito xilanasas localizadas en el interior de las células cuya función fisiológica hipotética consiste en degradar las pequeñas moléculas de xilooligosacáridos (XOS), procedentes de la hidrólisis extracelular del xilano, que son transportadas al interior de la célula para su metabolización (Yegin 2023).

2.1.4 Clasificación de xilanasas

Las endo-1,4- β -xilanasas han sido clasificadas teniendo en cuenta al menos tres criterios: peso molecular y punto isoeléctrico, estructura cristalina o propiedades catalíticas y cinéticas (Bhardwaj y col., 2019). No obstante, esta clasificación presenta inconvenientes ya que no siempre es fácil agrupar a las xilanasas producidas por una variedad de organismos en una u otra categoría. De esta manera, la complejidad que surge del descubrimiento de muchas secuencias génicas y proteicas, ha conducido a un cambio en su clasificación.

Un avance importante en la clasificación de estas enzimas se produjo cuando Herrissat y Coutinho (2001) propusieron tener en cuenta la estructura primaria, el dominio catalítico, las propiedades catalíticas, la especificidad del sustrato y la descripción del producto. La información disponible sobre xilanasas, se encuentra en la plataforma bioinformática *Carbohydrate-Active EnZymes* (CAZY), que significa enzimas activas sobre carbohidratos. Se trata de una base de datos en constante actualización que incluye información genómica, estructural y funcional de estas enzimas como por ejemplo a miembros de la familia de las glucohidrolasas (GH). Es una herramienta valiosa ya que proporciona información sobre familias de enzimas, sus funciones y estructuras, facilitando el estudio de las actividades relacionadas con los carbohidratos en los diferentes organismos.

Existen 96 familias de glicohidrolasas, de ellas los grupos GH5, GH8, GH10, GH11, GH30, GH43, GH51 y GH98, son las que presentan actividad endoxilanasas. Las enzimas más estudiadas pertenecen a las familias GH10 y GH11, que tienen preferencia por el xilano como sustrato (Bhardwaj y col., 2019).

2.1.5 Xilanasas GH10

Las xilanasas de familia GH10, son en su mayoría endo- β -(1,4) -xilanasas (EC 3.2.1.8), muy pocas veces se encuentran endo- β -(1,3) -xilanasas (EC 3.2.1.32).

Las endo- β -(1,4) -xilanasas de esta familia, se caracterizan por presentar un amplio rango de sustrato, ya que no sólo son activas sobre el xilano lineal, sino que son capaces de acomodar diferentes tipos de ramificaciones laterales presentes en los heteroxilanos (Wang y col., 2019). Las enzimas de la familia GH10 son miembros del clan GH-A. Este clan, es también llamado superfamilia, y corresponde a un nivel jerárquico de clasificación superior, agrupando a familias de enzimas que comparten una estructura terciaria similar que presentan los

mismos aminoácidos catalíticos y el mismo mecanismo enzimático. Su módulo catalítico posee un plegamiento en barril (β/α)₈, también llamado *TIM-barrel*, por el parecido en su forma a un barril, altamente conservado entre las diferentes enzimas (Fig. 9). La primera estructura publicada de un dominio catalítico de xilanasa GH10 fue en el año 1994, correspondiente a la xilanasa A de *Streptomyces lividans* (Paës y col., 2012). En la actualidad existe un centenar de estructuras que han ayudado a comprender el mecanismo de acción de este tipo de enzimas.

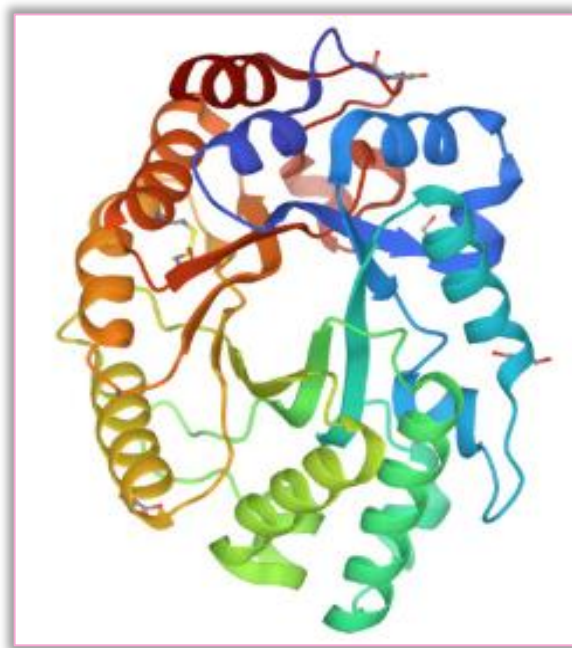


Figura 9: Estructura tridimensional del dominio catalítico de xilanasas pertenecientes a la familia GH10. Tomado de PDB Crystalstructure of an endo-beta-1,4-xylanase (glycosidehydrolasefamily 10/GH10) enzyme from *Aspergillus niger*.

2.1.5.1 . Xilanasas GH11

La familia GH11 contiene exclusivamente endo- β -(1,4)- xilanasas. Se caracterizan por su elevada selectividad de sustrato, alta eficiencia catalítica, bajo peso molecular (aproximadamente 20 kDa) (Mendonça y col., 2023) y amplia variedad de pHs y temperaturas óptimas. Estas características hacen que las xilanasas de esta familia sean frecuentemente

utilizadas en diversos procesos industriales. Al igual que las xilanasas GH10, las xilanasas GH11 son activas sobre xilanos con y sin ramificaciones, pero más eficientes en regiones no ramificadas. No son activas sobre la celulosa ni sobre sus derivados. Los análisis de los productos de hidrólisis, han revelado que la xilobiosa y la xilotriosa son los oligosacáridos no sustituidos más pequeños liberados por estas enzimas. La xilopentosa es el oligosacárido más pequeño que puede ser digerido por las mismas, aunque se ha observado actividad sobre la xilotetraosa en pequeña magnitud (Biely y col., 1993). Las xilanasas GH11 han sido clasificadas dentro del clan GH-C, apreciándose un alto grado de conservación dentro de la misma familia.



Figura 10: Estructura tridimensional del dominio catalítico de xilanasas pertenecientes a la familia GH11. Tomado de PDB. X-raystructureanalysis of xylanase

En su mayoría suelen ser mono dominio, donde el dominio catalítico presenta una arquitectura típica de lámina β curvada sobre sí misma, denominada β *jelly roll* (Fig. 10). Esta estructura típica se compone de dos hojas β antiparalelas llamadas A y B que esculpen una hendidura larga y profunda. La topología de esta familia de proteínas parece una mano derecha parcialmente cerrada. Las hojas β A y B corresponderían a los dedos de una palma,

mientras que parte de las regiones no estructuradas de los *loops* B8 y B7 serían el pulgar (Andaleeb y col., 2020). Las primeras estructuras cristalográficas de xilanasas GH11 se obtuvieron en el año 1994 y desde ese momento, se publicaron más de cincuenta estructuras cristalinas que permitieron dilucidar el funcionamiento de este tipo de enzimas.

2.1.6 Mecanismos de acción

Los miembros que pertenecen a la misma familia de glicosil hidrolasas comparten un mecanismo catalítico común. En la mayoría de los casos, las glicosil hidrolasas realizan la hidrólisis del enlace glicosídico mediante la interacción de dos aminoácidos carboxílicos, habitualmente dos residuos de ácido glutámico (Glu) del sitio activo. Uno de ellos actúa como catalizador ácido/base y el otro como residuo nucleófilo. Dependiendo de la posición espacial de los residuos catalíticos, la hidrólisis ocurre a través de la retención o inversión de la configuración del centro anomérico sometido a la catálisis (Wang y col., 2017). Las xilanasas de las familias GH10 y GH11, son enzimas de retención, que operan mediante el mecanismo de doble desplazamiento. En una primera fase (glicosilación), el residuo catalítico ácido/base funciona como un catalizador ácido general, que protona el oxígeno del enlace glicosídico; mientras que el segundo residuo catalítico, realiza un ataque nucleófilo sobre el carbono anomérico del enlace, provocando la liberación de uno de los productos de reacción y la formación de un intermediario α -glicosilo-enzima. En el segundo paso (desglicosilación), el residuo ácido/base actúa como base general disociando un protón de una molécula de agua entrante. La molécula de agua activada ataca el carbono anomérico del intermediario α -glicosilo-enzima, produciendo su hidrólisis (Fig. 11). Como resultado se obtiene la liberación de la enzima y un producto de reacción en el que el carbono anomérico vuelve a la configuración β , al igual que la del sustrato (Henrissat y Davies 1997).

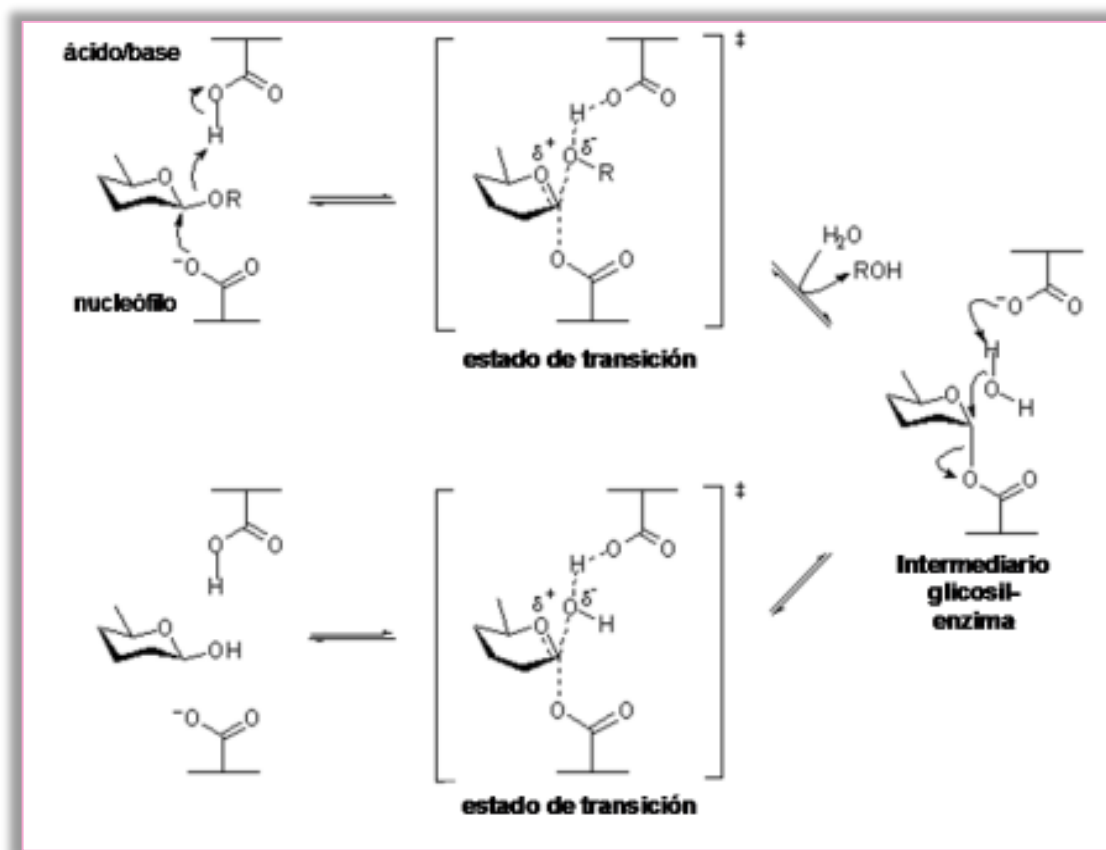


Figura 11: *Mecanismo de acción general de β -glicosidasas de retención.* Tomada de Valenzuela (2012)

2.1.7 Fuentes

Las xilanasas se encuentran en la naturaleza y son producidas por una amplia variedad de organismos tanto procariotas como eucariotas: bacterias, algas marinas, levaduras, protozoos, caracoles, crustáceos, insectos, semillas de plantas terrestres (Dey y col 2018). Sin embargo, la principal fuente comercial de xilanasas son los hongos filamentosos (Kumar y col. 2019). Entre éstos, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp., son considerados los mayores productores de sistemas xilanolíticos completos (Singh y col., 2019).

2.1.7.1 Trichoderma

Las especies del género *Trichoderma* representan un grupo de hongos filamentosos que de acuerdo con el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Base de datos de la Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU, NCBI por sus siglas en inglés), se clasifican como se muestra a continuación.

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Clado: Saccharomyceta

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

Se trata de hongos septados que producen conidióforos altamente ramificados con un contorno cónico o piramidal. En los extremos de los conidióforos se encuentran unas estructuras llamadas fiálides en cuyos extremos se producen conidios donde se acumulan para formar una cabeza conidial (Barchuk 2017). En la Fig. 12 se puede apreciar la estructura en forma de árbol típica de este género.

Las especies de *Trichoderma* se consideran cosmopolita del suelo, predominando en los ecosistemas terrestres (Sandoval-Denis y col., 2014). Pese a que su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en un rango de 25 a 30°C, pueden adaptarse y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Rangel y col., 2015).



Figura 12: Observación al MO del Género *Trichoderma*. Magnificación de 100X. Tomada de Barchuk (2017).

En especies del género *Trichoderma* tales como *T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. reesei*, se han reportado altos niveles de producción de endoxilasas (Barchuk 2016, Dhaver y col., 2022, Meng y col., 2020, Zhang y col., 2021).

2.1.7.1.1 *Trichoderma atroviride* LBM117

T. atroviride es un hongo cosmopolita filamentoso, que se encuentra comúnmente en el suelo y es propio de climas tropicales y templados. Es mejor conocido por sus capacidades de control biológico contra una variedad de hongos fitopatógenos, que son plagas de cientos de cultivos de plantas (Kunamneni y col., 2014). Asimismo, este género es productor de una amplia gama de enzimas, entre las que se encuentra la xilanasa.

Tanto la capacidad de producir diversos metabolitos y enzimas como la capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos, confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en la industria biotecnológica (Asis y col., 2021).

Barchuk (2017) ha seleccionado cepas nativas de la provincia de Misiones con el fin de optimizar la producción de enzimas xilanolíticas y ahondar en las características bioquímicas y genéticas de éstas. Para tal fin, evaluó la actividad de la enzima xilanasa en once cepas de

Trichoderma que mostraron actividad xilanolítica en medio de cultivo suplementado con bagazo de caña de azúcar. La cepa identificada como *T. atroviride* LBM 117 (Fig. 13), resultó ser la más promisoría por mostrar el nivel más alto de actividad endoxilanolítica y mayor termoestabilidad enzimática a 30 °C. Sin embargo, la producción de este hongo requiere de muchos días de cultivo, dificultando su estudio a gran escala. Es por esto que, el alto costo y la baja producción de enzimas en las cepas nativas, además de la secreción de otros productos no deseados, limitan las aplicaciones industriales.

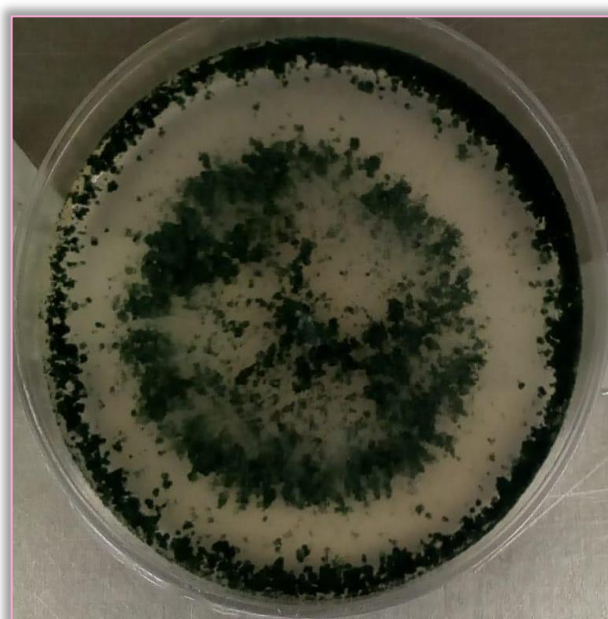


Figura 13: Fotografía de *T. atroviride* LBM 117 cultivado durante 8 días en medio MEA.

2.1.8 Regulación transcripcional de xilanasas

Por lo general, la biosíntesis de xilanasas está sujeta a regulación transcripcional debido a la fuente de carbono disponible. Los genes son altamente inducidos en presencia de xilano y de sus productos hidrolizados (Bao y col., 2020). Sin embargo, el xilano es un polisacárido complejo de peso molecular alto y no puede penetrar la membrana celular (Dhiman y Mukherjee, 2018). En este sentido, el mecanismo propuesto de regulación para la

biosíntesis de xilanasas involucra la degradación del xilano por xilanasas constitutivas lo que produce moléculas de xilooligosacáridos y xilobiosas y el pasaje de estas hacia el interior de la célula. Estas moléculas en el interior celular inducen a otros genes de xilanasas, y como consecuencia, las xilanasas inducidas degradan nuevamente el xilano a xilooligosacáridos y xilobiosas. Por su parte, las β -xilosidasas constitutivas y/o inducidas convierten las xilobiosas a monómeros de xilasas, que es tomada por la célula. La xilosa actúa como un inductor adicional de genes que codifican para xilanasas (Chakdar y col., 2016).

La inducción de xilanasas es un fenómeno complejo y el nivel de respuesta a un inductor particular varía según el organismo, un inductor que provoca una actividad xilanasas máxima en una especie, puede actuar como inhibidor de la actividad enzimática en otra. Se trata de un proceso especie-específico y concentración dependiente (Kumar y Naraian, 2019). Por lo general cuando los inductores se encuentran en concentraciones bajas, la inducción es efectiva; contrariamente, cuando sus niveles son altos, el efecto inductor es menor debido a la represión catabólica mediada por los productos degradados (Díaz y col., 2016).

Otro fenómeno que también se observa en la biosíntesis de xilanasas, es la represión catabólica por glucosa, la cual puede deberse a dos mecanismos de control: un control directo y uno indirecto. El control directo sucede a través de la represión de la transcripción génica y el indirecto mediante la represión del factor de transcripción (Díaz 2019).

2.1.9 Xilanasas recombinantes

Las xilanasas recombinantes desempeñan un papel crucial para suplir la escasez en la producción de dicha enzima por parte de fuentes nativas. La baja disponibilidad de xilanasas en la naturaleza ha sido un desafío para aplicaciones que dependen de la degradación eficiente de xilanos, como la producción de biocombustibles y la industria alimentaria.

Mediante técnicas de ingeniería genética, es posible expresar y producir estas enzimas en grandes cantidades, lo que permite satisfacer las demandas en distintos campos (Basit y col., 2018). La obtención de xilanasas recombinantes no solo garantiza un suministro adecuado de esta enzima, sino que también abre oportunidades para mejorar su rendimiento y adaptar sus propiedades para requisitos específicos. En este contexto, la producción de xilanasas recombinantes se posiciona como una estrategia prometedora para superar las limitaciones asociadas con las fuentes nativas y potenciar el desarrollo de procesos más eficientes y sostenibles (Bhardwaj y col., 2019).

2.1.10 Optimización del medio de cultivo para la producción de xilanasas

Hay diversos factores que tienen influencia directa en la producción xilanasas tanto recombinantes como nativas, como por ejemplo los diferentes componentes del medio de cultivo, la temperatura de incubación, la ausencia o presencia de luz (Barchuk, 2017).

En la bibliografía, existe una gran controversia acerca de cuáles son los compuestos y sus respectivas concentraciones, que, agregados al medio, son beneficiosos para optimizar la producción de xilanasas (Díaz y col., 2015). Por este motivo, en las investigaciones de optimización de procesos de producción de estas enzimas, se estudian diferentes parámetros para mejorar la productividad y la eficiencia (Díaz y col., 2019; Barchuk y col., 2016).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Obtener la región estructural del gen que codifique para una enzima xilanasa a partir de *Trichoderma atroviride* LBM 117.
- II. Optimizar la expresión heteróloga de una xilanasa en la levadura GRAS *Kluyveromyces lactis* GG799.
- III. Purificar y caracterizar la enzima xilanasa recombinante.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Sección I: OBTENCIÓN DE LA REGIÓN ESTRUCTURAL DEL GEN QUE CODIFICA PARA UNA ENZIMA XILANASA PROVENIENTE DE *Trichoderma atroviride* LBM 117

A fin de obtener la región estructural o la codificante de un gen de xilanasas del hongo *T. atroviride* LBM 117 se trabajó con el ADN genómico total y con el ARN respectivamente. El ARN se obtuvo a partir del hongo crecido en las condiciones reportadas por Barchuck (2019) a fin de lograr la mayor actividad xilanolítica.

2.3.1 *Trichoderma atroviride* LBM 117 y su mantenimiento

El hongo *T. atroviride* LBM 117 se encuentra depositado en la colección del cepario del Laboratorio de Biotecnología Molecular perteneciente al Instituto de Biotecnología de Misiones, “María Ebe Reca”, de la Universidad Nacional de Misiones, Argentina. La cepa se activó y se mantuvo en medio Agar 20 g/L y Extracto de malta 12,7 g/L (MEA por su sigla en inglés).

En la preparación de los medios de cultivo, los componentes se mezclaron con agua destilada y esterilizaron en autoclave a 105 °C durante 20 minutos. Seguidamente se distribuyeron en placas de Petri de 90 mm para su posterior utilización. Por su parte, ampicilina y acetamida se esterilizaron por filtración.

2.3.2 Inoculación de *T. atroviride* LBM 117

Para el crecimiento y posterior determinación de la habilidad xilanolítica de *T. atroviride* LBM 117, así como la obtención del ARN, se trabajó en condiciones que permitan la máxima producción de xilanasas en medios sólido y líquido, descritas por Barchuk (2017).

2.3.2.1 Crecimiento en medio sólido

T. atroviride LBM 117 creció en placa de Petri de 90 mm de diámetro en medio MEA. Para inducir la expresión de xilanasas se suplementó con xilano de Beechwood (Sigma-Aldrich, USA), durante 7 días a 28 ± 1 °C en oscuridad (Barchuk y col., 2016).

2.3.2.2 Crecimiento en medio líquido

En primer lugar, se realizó una suspensión con las esporas de la superficie de la placa (obtenida como se indica en la sección 2.3.2.1) en Tween 80 0,1% (v/v), luego se realizó un recuento en cámara de Neubauer hasta alcanzar una concentración de $2-3 \times 10^7$ esporas por ml. De esta suspensión se tomó 1 mL y se inoculó en un Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de medio de cultivo líquido Mandels (Mandels y Reese, 1957), (1,4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/L de KH_2PO_4 , 0,4 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0016 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,0014 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/L de urea y 0,25 g/L de extracto de levadura) y xilano de Beechwood (Sigma- Aldrich) 1 % (p/v) como única fuente de carbono, a pH 4,5 ajustado con ácido acético puro. Se dejó crecer durante 24 días a 28 ± 1 °C en presencia de luz, y cada 72 h se quitó el tapón de algodón en condiciones de esterilidad para oxigenar y favorecer la producción de xilanasas (Barchuk, 2017).

2.3.3 Extracción de Ácidos Nucleicos

2.3.3.1 Extracción y cuantificación de ADN

Para realizar la extracción de ADN, se siguió el protocolo de Fonseca y col. (2015). En primer lugar, se hizo crecer el hongo en medio MEA por 5 días. Partiendo de éste, se obtuvo un inóculo con sacabocados de 0,5 mm de diámetro que luego se inoculó en medio de cultivo líquido conteniendo extracto de malta 12,7 g/L. Se lo dejó crecer por 7 días a 28°C en oscuridad. Para la extracción de ADN se filtró el micelio y se lavó con solución de Tris-HCl 0,1M, EDTA 0,02 M pH 8 a 8°C. El contenido celular se digirió a 60 °C \pm 1 con proteinasa K 0,1 mg/mL, β -mercaptoetanol 10mM y SDS 2 % (p/v) en solución tampón Tris-HCl 100mM (pH 8), NaCl 1,5 M y EDTA 50mM. El ADN se purificó con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y acetato de potasio 3 M, luego se precipitó con alcohol isopropílico, se lavó con etanol 70 %, se secó y se resuspendió en agua MiliQ.

La calidad e integridad del ADN extraído se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v y revelado con Bromuro de Etidio (10 mg/mL), bajo luz ultravioleta. La corrida electroforética se realizó a 120 V durante 30 min en tampón TBE (Tris-borato-EDTA) 0,5 X.

La cuantificación se realizó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia corresponde a 50 μ g/ μ L de ADN. La calidad y la pureza se comparó mediante la relación A260/A280, una proporción de 1,6-1,8 indica pureza aceptable para el ADN.

2.3.3.2 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN el hongo creció en la condición que permite obtener la máxima actividad xilanolítica en medio sólido y líquido según Barchuk (2019) (sección 2.3.2.).

La extracción de ARN se realizó a partir del micelio obtenido el día 24 de cultivo líquido, como se detalló en la sección 2.3.2.1. Por otro lado, se obtuvo micelio mediante el raspado de la placa al día 7 de cultivo en medio sólido adicionado con xilano como se detalló en la sección 2.3.2.2. El micelio se filtró y se lavó con solución de Tris-HCl 0,1 M, EDTA 0,02 M pH8 a 8°C. Luego se agregó tampón de lisis (GuSCN 4 M, Tris 0,1 M, EDTA 0,02 M, Tritón 1 %) y se maceró. Para la purificación se utilizó fenol: cloroformo (1:1, v/v) y acetato de potasio 3 M. Finalmente, los ácidos nucleicos se precipitaron con alcohol isopropílico, se lavó con etanol 70 %, se secó y resuspendió en agua estéril libre de ARNasas (Fonseca y col., 2018). Para degradar el ADN remanente, las muestras se trataron con DNasa libre de RNasa siguiendo las indicaciones del fabricante (Promega).

La calidad e integridad del ARN extraído se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 p/v y revelado con Bromuro de etidio (10 mg/mL), bajo luz ultravioleta. La corrida electroforética se realizó a 120 V por 30 min en tampón TBE 0,5 X. Seguidamente, la cuantificación del ARN se realizó en espectrofotómetro, mediante lecturas a una absorbancia de 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a una concentración de 40 µg/µl. La calidad y la pureza se comparó mediante la relación A260/A280, una proporción de 2 indica pureza aceptable para el ARN.

2.3.4 Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores específicos se trabajó con la secuencia codificante del gen de xilanas obtenida a partir del hongo *Trichoderma atroviride* LBM 117 por Barchuk y col., (2017). Para permitir la posterior clonación, se tuvo en cuenta la incorporación de adaptadores para enzimas de restricción, verificando previamente las enzimas de restricción que permiten la linealización del plásmido y descartando aquellas que actúan sobre el

amplificón mediante el programa NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). El análisis de los parámetros se realizó mediante el programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). El diseño final de cebadores se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Cebadores utilizados para la amplificación de un gen que codifica para la enzima xilanasa. En los cebadores sentido y antisentido se encuentran subrayados los sitios de corte para las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI* respectivamente. En lila se muestra el sitio de corte para la proteasa Kex

Nombre	Secuencias
Xil- S	Xil-S 5'-CAAATTCTCGAGAAAAGGCTCCTACTGAAGACGTG-3'
Xil- AS	Xil-AS 5'-AATTTGGCGGCCGCCTAGCTGACGTTAATGTT-3'

2.3.5 Obtención de la región estructural

Para clonar la región conteniendo exones e intrones se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction) a partir del ADN genómico extraído. En dicha amplificación, se utilizaron los cebadores EX-S (ATGGTCGCCTTCACATCTCTCCT) y EX-AS (CTAGCTGACGTTAATGTTGGCGCT) (Barchuk, 2017) y seguidamente, se realizó una re- amplificación utilizando los cebadores específicos diseñados en el presente trabajo (Tabla 2.1). Las condiciones de PCR y el ciclado utilizados, se reportaron previamente por el grupo de trabajo (Barchuk, 2017).

Asimismo, a fin de obtener el ADNc, se trabajó con el ARN extraído a partir de los medios sólido y líquido según se explicó anteriormente en las secciones 2.3.2.1 y 2.3.2.2.

La primera cadena de ADNc se obtuvo a partir del ARN extraído por acción de la transcriptasa reversa (RT) *EasyScript Trans*, siguiendo las indicaciones del fabricante (*Thermo Scientific*). El ADNc se utilizó como plantilla para la amplificación por PCR. Para un volumen final de 20 µl se utilizó 1X de Taq buffer (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % v v-1 Tween 20), 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 10 pmol de cada uno de los cebadores y 1

U de enzima Taq polimerasa (*Thermo Scientific*, Fermentas). En la PCR se usaron los cebadores específicos descritos en la sección 2.3.4 así como los descritos por Barchuck (2017). La RT-PCR se verificó con un control positivo, para ello se incorporaron cebadores para la amplificación del gen de Actina (150 pb), ACT-1 (5-GHCACCAGGGTGTNATGGTCG-3) ACT-2 (5-GCCAGATCTTCTCCATGTCRTCCR-3), (Luis y col., 2005).

2.3.6 Electroforesis en geles de agarosa

Seguidamente, los productos de PCR se separaron en electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5% p/v durante 30 minutos a 120 V y se revelaron con Bromuro de etidio bajo luz UV. Posteriormente se cortaron las bandas de interés y se purificaron por medio del kit comercial WizardR SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

SECCIÓN II: OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ENZIMA XILANASA EN LA LEVADURA GRAS *K. lactis* GG799

2.3.7 Microorganismos utilizados y su mantenimiento

Para clonar la región que codifica para una xilanasa, se utilizaron bacterias *E. coli* DH5 α (Promega). Para su crecimiento, se incubaron a 37 ° \pm 1 C empleando como medio sólido Luria Bertani (LB) con agar (2 % p/v) y como medio líquido LB, con y sin el agregado de ampicilina 100 μ g/mL (Sambrook y col., 1989) según fueran recombinantes o no respectivamente.

Para la expresión recombinante de xilanasa se utilizó como huésped la levadura GRAS *K. lactis* GG799 (E100S, *K. lactis*, Protein Expression Kit, NE Biolabs). Ésta se incubó a 28 °C en medio YPGal (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, galactosa 40 %), y se mantuvo con siembras periódicas en placas de Petri en medio YPGal añadiendo agar bacteriológico al 2% p/v el tiempo necesario para su crecimiento. Posteriormente se conservaron a 4°C.

2.3.8 Digestión del amplicón y el vector con enzimas de restricción

Para lograr la expresión en bacterias y la levadura, tanto las PCR (inserto) como el vector pKLAC₂ (*New England Biolabs*), se cortaron con las enzimas de restricción que generan extremos compatibles con el inserto. Para ello se utilizaron las enzimas de restricción Not I (*New England Biolabs*®, R0189S) y XhoI (*New England Biolabs*®, R0146S), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.8.1 Ligación del vector con el inserto

Los productos de *PCR* digeridos se ligaron dentro del vector pKLAC₂ utilizando ligasa T4 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). El producto resultante fue utilizado para realizar la transformación de las células *K. lactis* G799 competentes.

2.3.9 Clonación del gen que codifica para la enzima endoxilanasas en *E. coli* DH5 α

2.3.9.1 Obtención de células competentes

Para obtener células *E. coli* DH5 α competentes, se empleó el siguiente procedimiento: 10 mL de LB se inocularon con 0,1 mL de un cultivo en fase estacionaria de bacterias *E. coli* a transformar. Se incubó con agitación vigorosa hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,1 – 0,4. Este cultivo se transfirió en esterilidad a un tubo de centrifuga a 4 °C y se centrifugó a 8.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 5 mL de CaCl₂ 0,1 M frío, y se dejó a 4 °C durante 20 minutos. Seguidamente, las células se recuperaron por centrifugación a 8.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron nuevamente en 0,05 mL de CaCl₂ 0,1 M frío, mediante una suave inversión. Las células competentes se mantuvieron en baño hielo hasta su utilización.

2.3.9.2 Transformación de bacterias con plásmido recombinante

Para la transformación, a 50 μ L de las células competentes mantenidas en hielo, se añadió el plásmido a transformar, y se dejó la mezcla a 4 °C durante 20 minutos. La entrada del plásmido en la célula se indujo mediante un choque térmico a 42 °C durante exactamente 50 segundos, con un posterior enfriamiento en hielo durante 2 minutos. Las células ya transformadas se incubaron durante 90 minutos a 37 °C en *shaker* en medio SOC (2,0 g/L triptona, 0,5 g/L extracto de levadura, 1 mL de NaCl 1 M, 0,25 mL/L de KCl 1 M, 1 mL de Mg⁺⁺

2M) (Sambrook y col., 1989), para permitir su recuperación y multiplicación. Finalmente, se sembraron en placas con agar LB suplementado con ampicilina 100 µg/mL (Sambrook y col., 1989). También se incluyeron vectores cerrados como control.

2.3.9.3 Extracción y cuantificación de ADN plasmídico de *E. coli* DH5α

Para la extracción de plásmidos, se llevó a cabo el procedimiento de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989). Las células concentradas se resuspendieron en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM). La lisis celular y la desnaturalización del plásmido se llevó a cabo con SDS 1% (p/v) y NaOH 0,2 N, seguido de la neutralización de la solución mediante el agregado de acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial 5 M. El ADN plasmídico se separó por centrifugación y se precipitó en etanol absoluto.

La calidad de los plásmidos aislados se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% (p/v) que se tiñeron con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó a 120 V por 50 min.

La cuantificación se realizó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a una concentración de 50 µg/µl de ADN.

2.3.9.4 Secuenciación automática del ADN

La secuenciación automática de los productos de PCR y los fragmentos clonados se realizó mediante el Servicio de Secuenciación Automática MACROGEN Corea.

2.3.9.5 Análisis bioinformático de las secuencias de ADN obtenidas

Las secuencias obtenidas se analizaron *in silico* mediante herramientas bioinformáticas disponibles *online*. Para el análisis de identidad se utilizaron las herramientas Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Clustal W (<http://www.clustal.org/>).

2.3.9.6 Linealización de los plásmidos recombinantes y clonación en *K. lactis*

Los plásmidos que resultaron recombinantes se linealizaron con la enzima SacII, siguiendo las instrucciones del fabricante para su incorporación dentro del genoma de *K. lactis* GG799. Para ello se hicieron competentes *K. lactis* utilizando el kit comercial *Pichia EasyComp*[®] (K173001, Invitrogen), y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar *Yeast Carbon Base* (YCB: 15 mL de tampón Tris-HCl pH 7.5, 5.85 g·L⁻¹ medio YCB y 12 g/ L⁻¹, agar 12 g/ L⁻¹ y acetamida 5 mM). La presencia de acetamida como única fuente de nitrógeno permite seleccionar los clones que incorporaron el plásmido. Esto se debe a que el gen de la acetamida fúngica en pKLAC₂ hace posible la selección de levaduras que contienen un casete de expresión integrado al permitir su crecimiento en ese medio. Luego de 4 días de incubación a 28 °C, los transformantes que mostraron desarrollo se utilizaron para continuar con los ensayos preliminares de producción de xilanasa en medio líquido a fin de seleccionar los clones con mayor actividad. Para ello se los cultivó en medio sólido YPGal durante 2 días a 28 °C y se raspó un área de colonias de 6 mm³, que fue transferido a 2 mL de YPGal líquido. Luego de 2 días de incubación a 28° C, dicho cultivo se transfirió a un erlenmeyer conteniendo 20 mL de medio YPGal. Se tomaron muestras durante 10 días para determinar primeramente de manera cualitativa en medio sólido MEA conteniendo xilano de Beechwood al 1% como sustrato, lo que permitió visibilizar la actividad xilanolítica por la formación de halos. Con el clon que mostró el mejor halo de degradación se

continuó con la medición de la actividad enzimática xilanasa tal como se describe posteriormente en la sección 2.3.11.

A fin de verificar la secuencia clonada en *K. lactis* GG799, las levaduras seleccionadas crecieron en 10 mL de medio líquido YPGal durante 48h a 28 °C, para obtener el ADN genómico (Fonseca y col., 2015) y realizar las *PCR*. Luego se analizaron como se describe a continuación en la sección 2.3.9.7.

2.3.9.7 Análisis electroforético

La calidad de los plásmidos aislados y los productos de *PCR* se analizaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa, a concentraciones adecuadas al tamaño del ADN a separar, lo cual abarcó un rango del 1 % (p/v) al 2 % (p/v) de agarosa disuelta en tampón TBE 0,5X. Las muestras se prepararon mezclando 3 µL de ADN plasmídico y 5 µL de productos de *PCR*, con 1 µL de tampón de siembra. La corrida electroforética se realizó a 120 voltios durante 30 min utilizándose una cuba SubSystem 70 modelo E-0310 (*Labnet Internacional, Inc*) y una fuente de poder Power Station 300 Plus (*Labnet Internacional, Inc*). Para visualizar el ADN los geles de agarosa se prepararon con bromuro de etidio (10 µg/mL). Luego se observaron bajo luz ultravioleta.

2.3.10 Optimización de la producción de la enzima xilanasa en *K. lactis*

2.3.10.1 Optimización del inóculo inicial

Con el fin de identificar mejoras en la producción xilanolítica, se varió la densidad óptica inicial del cultivo en un rango que abarcó de $DO_{1.6}$ a DO_3 . Para esto, el clon seleccionado creció en medio sólido YPGal durante 2 días a 28 °C y se obtuvo un área de 6 mm² mediante el raspado de la colonia. Seguidamente, se cultivaron en tubos de vidrio con 2 mL de YPGal y

crecieron a 28 °C en agitación. A este cultivo, se le denominó pre- inóculo. Luego de 2 días, se transfirió con las DO correspondientes a un erlenmeyer de 100 mL conteniendo un volumen final de 20 mL de medio líquido YPGal (sección 2.3.2.2). Las muestras se tomaron durante 7 días. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

2.3.10.2 Optimización de la temperatura de crecimiento

El efecto de la temperatura de crecimiento se analizó con la DO que mostró mejoras de la actividad xilanólica. Para ello el cultivo creció en medio YPGal a 24, 28 y 34 °C en agitación. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

2.3.10.3 Optimización del medio mediante el agregado de compuestos

El efecto de cloruro de hierro, carbonato de calcio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de zinc, dextrosa y glicina se estudió a concentraciones de 0,5mM a 3mM a 28°C. El medio control no tenía compuestos agregados.

2.3.11 Determinación de actividad xilanasa

Para determinar la actividad xilanólica del sobrenadante, las células se separaron por centrifugación (8000 g durante 5 min). Luego la actividad xilanasa se midió en tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 4,8) y se determinó usando xilano al 1% como sustrato. Para esto, se incubó la enzima diluida en tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 4,8 con xilano de Beechwood al 1% (p/v) a 50°C durante 10 min.

El azúcar reductor liberado se determinó mediante el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) usando d-xilosa como estándar (Miller 1959) a una absorbancia de 540 nm. Una unidad

de actividad de xilanasa se definió como la cantidad de enzima que producía 1 μmol de xilosa equivalente por minuto a partir de xilano en las condiciones del ensayo.

2.3.12 Caracterización de la actividad xilanasa recombinante presente en el sobrenadante

Para la caracterización de la actividad xilanasa, se seleccionó el medio de cultivo que presentó mayor actividad.

2.3.12.1 pH óptimo

Para definir el pH óptimo, se realizó una modificación en el protocolo de determinación de actividad enzimática. Para ello las diluciones de los extractos se realizaron con tampones a diferentes pH en el rango de 3 a 10 y se incubaron con xilano de beechwood 1% (p/v) preparado en el mismo tampón que la dilución del sobrenadante. La actividad enzimática se determinó como se describe en la sección 4.4. Los valores se expresaron en porcentajes, donde el 100% representó el mayor nivel de actividad enzimática detectada.

Para pH 3 se utilizó el tampón citrato (0,1 M), para pH 3.6, 4.8 y 5.6, el tampón acetato de sodio (0,05 M), para pH 7 el tampón fosfato de sodio (0,1 M), y, por último, para pH 8 el tampón tris-glicina (0,1 M).

2.3.12.2 Temperatura óptima

El efecto de la temperatura sobre la actividad EX se evaluó incubando la mezcla de reacción a pH 4,8 a diferentes temperaturas: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 y 90 °C. Las demás condiciones se mantuvieron constantes. Luego se continuó con la determinación de la actividad enzimática y la misma se expresó en U mL^{-1} . Los valores se expresaron en porcentajes, donde el 100% representó el máximo nivel de actividad enzimática detectado.

2.3.12.3 Termoestabilidad

Para evaluar la termoestabilidad enzimática en el tiempo, se incubó el sobrenadante a 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C a pH 4,8. Los sobrenadantes se retiraron a intervalos de una hora y se midió la actividad EX residual de ellos. La actividad residual se expresó en porcentaje tomando la actividad enzimática al tiempo cero como el 100 %.

2.3.12.4 Estabilidad en función del pH

Para la evaluación de la estabilidad enzimática, el sobrenadante fue sometido a una pre- incubación con diferentes tampones a una temperatura constante de 50 °C durante diferentes intervalos de tiempo. Luego se determinó la actividad enzimática a 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 h. Los valores se expresaron en porcentaje, estableciendo como 100% al mayor nivel de actividad xilanolítica detectado. Los pH evaluados en la estabilidad fueron para pH 3 tampón citrato (0,1 M), pH 3,6; 4,8 y 5,6; tampón acetato de sodio (0,05 M), pH 7 tampón fosfato de sodio (0,1M) y pH 8 tampón tris-glicina (0,1 M).

SECCIÓN III: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE XILANASA RECOMBINANTE

2.3.13 Purificación de la enzima xilanasa

El cultivo con mayor actividad xilanolítica se utilizó para purificar la enzima. De esta manera, el medio líquido conteniendo *K. lactis* GG799 secretoras de xilanasas, se centrifugó a $6000 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante se filtró utilizando una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de $0,2 \mu\text{M}$ (Thermo Fisher, LC2000). Finalmente, la enzima se purificó mediante ultrafiltración utilizando columnas Pierce Concentrator (MWCO, 30 kDa, Thermo Fisher Scientific).

La determinación de la cantidad de proteínas presente en una muestra se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando el reactivo *Protein Assay Dye Reagent* de Bio-Rad. La determinación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, usando como estándar albúmina de suero bovino a una concentración entre 2 y $20 \mu\text{g/mL}$.

2.3.14 Análisis electroforético y detección de la enzima xilanasa

Con el fin de verificar la homogeneidad de la fracción enzimática obtenida y determinar el peso molecular de la enzima, la fracción purificada se analizó en geles de poliacrilamida desnaturizante al 8% p/v (SDS- PAGE) y se reveló por tinción con $0,2 \text{ g/L}$ plata (Laemmli, 1970). Se sembraron $20 \mu\text{g}$ de proteínas totales. La corrida electroforética se realizó a 100 V por 120 min en tampón tris-glicina 1,5 M (pH 8,3). Para la determinación del peso molecular se utilizó un patrón de masa molecular preteñido (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards, #1610395; BioRad).

La presencia de xilanasa en la fracción obtenida se determinó mediante electroforesis no desnaturizante en geles de poliacrilamida al 8% p/v (ND-PAGE) (Laemmli, 1979). Para ello, al gel concentrador se le agregó xilano al 1% (Barchuk 2019). La corrida electroforética se realizó a 100 V por 120 min en tampón tris-glicina 1,5 M, pH 8,3. Una vez finalizada, los geles se fijaron en una solución metanol: ácido acético: agua (4:1:5) durante 5 min. Para revelar la actividad enzimática el gel fue incubado en tampón acetato de sodio 50 mM pH 4,8 a 50 °C durante 60 min y luego teñido con rojo Congo 0,1% (p/v) durante 30 min. Finalmente se decoloró con NaCl 1M hasta la aparición de la banda.

2.3.15 Caracterización de la actividad xilanasa purificada

2.3.15.1 pH óptimo

El efecto del pH sobre la actividad enzimática de la xilanasa purificada se determinó según se describió en la sección 2.3.12.1.

2.3.15.2 Temperatura óptima

La determinación de la temperatura óptima para la xilanasa purificada se determinó siguiendo lo descrito en la sección 2.3.12.2.

2.3.15.3 Estabilidad en función de la temperatura

Para la determinación de la estabilidad enzimática de la enzima xilanasa purificada se determinó según la sección 2.3.12.3.

2.3.15.4 Estabilidad en función del pH

La estabilidad enzimática a diferentes pH de la enzima xilanasa purificada, se determinó siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.3.12.4.

2.3.16 Especificidad del sustrato y cinética enzimática

Los parámetros cinéticos K_M y V_{MAX} de la xilanasa purificada se determinaron midiendo la actividad enzimática a varias concentraciones en un rango de 0,05 a 2,5 mM de xilano de Beechwood. Las lecturas se hicieron a una longitud de onda de 540 y pH óptimo de la enzima. Luego, las constantes cinéticas se calcularon mediante el método de Michaelis-Menten utilizando el Programa GraphPad Prism versión 4.0 para Windows. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

2.3.17 Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia del 95%. Para realizar estos análisis se utilizó el software Statgraphics Centurion XVII.

2.4 RESULTADOS

SECCIÓN I: OBTENCIÓN DEL FRAGMENTO GÉNICO QUE CODIFICA PARA UNA ENZIMA XILANASA PROVENIENTE DE *Trichoderma* *atroviride* LBM 117

2.4.1 Extracción de ácidos nucleicos

2.4.1.1 Extracción de ADN

El material genético de *T. atroviride* LBM 117 se obtuvo a una concentración de 110 ± 10 ng/ μ l y con una pureza de $1,73 \pm 0,02$ con bandas nítidas y de buena intensidad para cada una de las muestras (Fig. 14).



Figura 14: ADN genómico extraído de *Trichoderma atroviride* LBM 117 en gel de agarosa al 0,8 %. Se muestran tres extracciones realizadas de manera independiente.

2.4.1.2 Extracción de ARN

Se logró obtener ARN total del hongo crecido tanto a partir de placa como en medio líquido suplementados con xilano a una concentración de $224 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 15 \text{ mg/mL}$ y con una

pureza de $2 \pm 0,09$. A modo de ejemplo, en la Fig. 15 se pueden observar bandas nítidas y de buena intensidad obtenidas para cada una de las muestras.

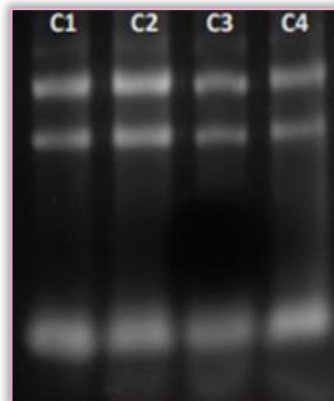


Figura 15: *ARN total en gel de agarosa al 0,8 %. Se muestran cuatro extracciones realizadas de manera independiente. Las primeras (C1 y C2) son de cultivo en placa y las últimas (C3 y C4) corresponden al cultivo en medio líquido.*

2.4.1.3 Obtención de la región estructural

No fue posible obtener amplicones de xilanasas a partir de la RT-PCR bajo las condiciones realizadas en la presente tesis. Para verificar el procedimiento correcto de la técnica de RT-PCR se realizó una amplificación utilizando cebadores de actina, con los cuales se obtuvieron bandas de 150 pb aproximadamente (Fig. 16). Asimismo, se obtuvo una banda de 200 pb para la aplicación de esta región a partir del ADN genómico.

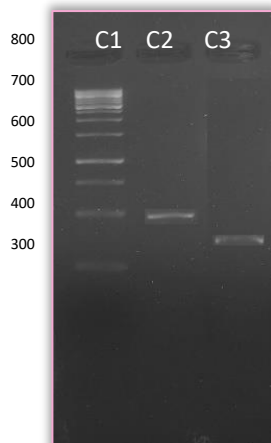


Figura 16: *Electroforesis en gel de agarosa al 1%. C1= MP, C2= Amplificación del gen de actina a partir de RT-PCR DE de ADN genómico de 200 pb, C3= Amplificación del gen de actina a partir de RT-PCR DE 150 pb.*

También se realizó la amplificación de la xilanas a partir del ADN genómico y se obtuvo una banda de pb 720 pb aproximadamente (Fig. 17).

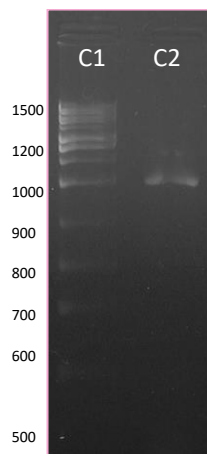


Figura 17: *Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Amplificación del gen de una endoxilanas. El primer carril es el marcador de peso molecular de 1500 pb (C1), el segundo, la amplificación del gen de interés (C2).*

Los productos de la secuenciación mostraron 100% de identidad con la secuencia de xilanas obtenida previamente por el grupo de trabajo. Finalmente, la secuencia se depositó

en la base de datos GenBank bajo el número de acceso OP382460.1. En la figura 18 se muestra la secuencia obtenida de 720 pb.

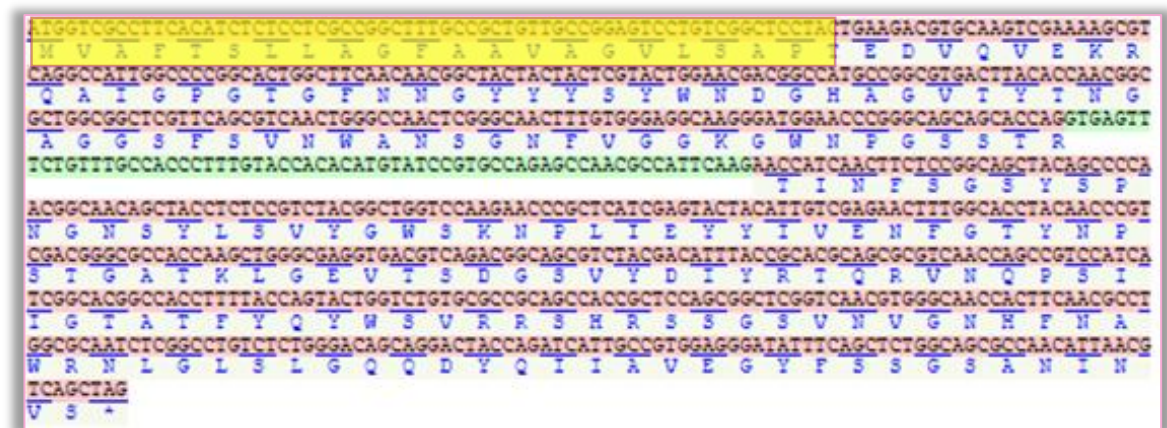


Figura 18: Secuencias nucleotídica y aminoácídica que codifica para el gen endo- β -1,4-xilanasas en *T. atroviride* LBM 117. La secuencia nucleotídica está representada por letras de color negro, la secuencia aminoácídica por letras de color azul. El péptido señal está representado en amarillo. En el presente trabajo se clonó el gen que codifica para la enzima xilanasas sin el péptido señal. Imagen tomada de GenBank OP382460.1.

SECCIÓN II: OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ENZIMA XILANASA RECOMBINANTE EN LA LEVADURA GRAS *K. lactis* GG799

2.4.2 Obtención de xilanasa recombinante

Los insertos obtenidos se clonaron de manera exitosa en *E. coli* DH5α manteniendo el 100% de identidad, y se usaron para transformar *K. lactis* GG799. Se obtuvieron quince levaduras transformantes. Mediante la detección en placa, se observaron halos de degradación que implicaron que las xilanasas bioactivas se expresaban y secretaban (Fig. 19).

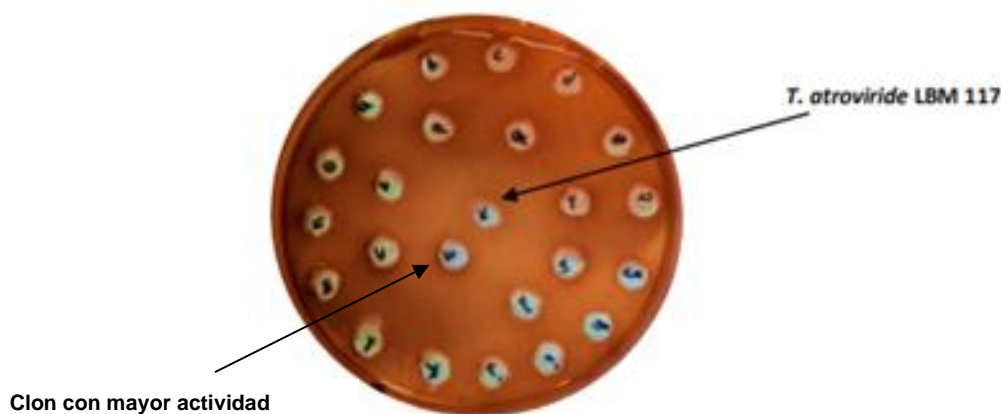


Figura 19: Ejemplo de una prueba cualitativa de actividad xilanolítica del sobrenadante de *K. lactis* recombinantes para xilanasa y de *T. atroviride* LBM 117 (control positivo señalado con X), la letra w indica el clon con mayor actividad. En los pocillos realizados a la placa suplementada con xilano 0,1%, se agregó 20 µl de sobrenadante y se dejó actuar por 1 h a temperatura ambiente, luego se tiñó con rojo Congo 0,1% (p/v) y se enjuagó con agua hasta la aparición de halos.

El clon con mayor actividad xilanasa (8900 U L^{-1}) se llamó *K.lactis*GG799/xil, y se seleccionó para continuar con la optimización de la actividad enzimática (Fig. 20).

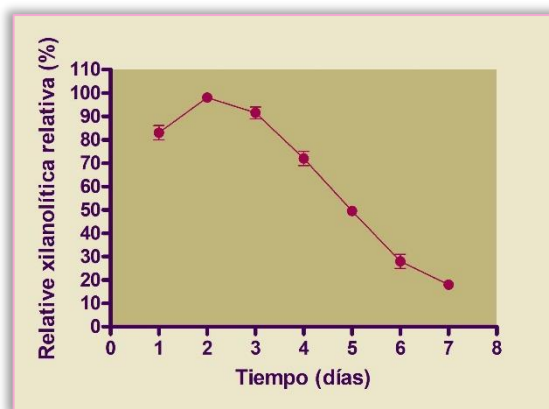


Figura 20: Representación de la actividad xilanasa en medio YPGal líquido de *K. lactis*GG799/xil durante 7 días de cultivo.

2.4.3 Optimización de la producción de la enzima xilanasa en *K. lactis* GG799

2.4.3.1 Optimización del inóculo inicial

La mayor actividad de la enzima xilanasa se obtuvo partiendo de un inóculo de DO600= 1,8 (9500 UL-1). Cuando los inóculos fueron DO600=1,5 y DO600= 3, la actividad xilanasa disminuyó, obteniéndose 7900 UL-1 y 7010 UL-1 respectivamente (Fig. 21).

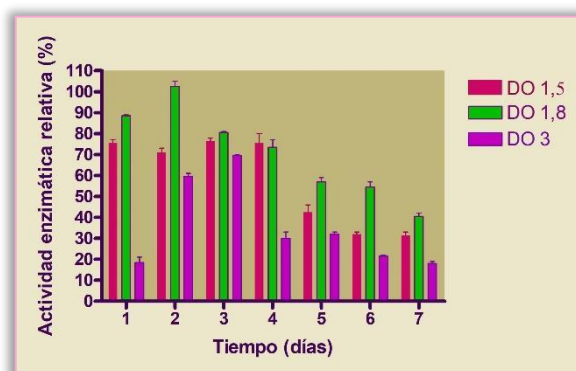


Figura 21: Actividad enzimática de los cultivos de *K.lactis*GG799/xil cuyas DO iniciales fueron 1,5, 1,8 y 3. El 100 % de actividad corresponde a 9500 UL⁻¹

2.4.3.2 Optimización de la temperatura de crecimiento

La temperatura óptima de crecimiento fue de 28 °C; a esta temperatura, *K.lactisGG799/xil* secretó 9900 UL-1 de la enzima xilanasa. Por su parte, el cultivo a temperaturas inferiores y superiores (26° y 30 °C respectivamente) condujeron a una disminución en la actividad de la enzima. El cultivo a 26 °C dio como resultado una actividad de 7900 UL-1 mientras que a 30 °C se alcanzó una actividad de 7100 UL-1 (Fig. 22).

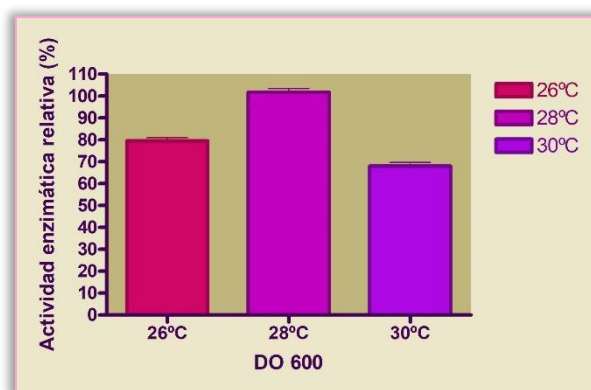


Figura 22: Gráfico de barras correspondiente a la optimización de la temperatura de crecimiento de *K.lactisGG799/xil*. La máxima actividad xilanólítica corresponde a 9900 UL⁻¹

2.4.3.3 Optimización del medio mediante el agregado de compuestos

Para evaluar la actividad xilanólítica, se agregaron al medio de cultivo cloruro de hierro, carbonato de calcio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, glicina, cloruro de zinc y dextrosa en concentraciones crecientes de 0,5 a 1,5 mM.

Los resultados obtenidos indican que, en presencia de cloruro de hierro 0.5 mM y carbonato de calcio 1mM, se observó un aumento en la actividad xilanólítica a las 6 y 12 h de incubación, sin embargo, luego de 24 h, no se observaron diferencias significativas respecto al control (Fig. 23 A y B). Con la adición de cloruro de potasio 0,5 mM, la actividad de xilanasa fue de 11234 U L⁻¹ después de 12 h de incubación. A concentraciones más altas, la actividad de la xilanasa disminuyó (Fig. 23 C).

El caso del cloruro de magnesio fue particular porque, con concentraciones de 0,5 y 1 mM L^{-1} , se observó similar actividad de xilanasa después de 36 h de incubación (21456 U L^{-1} y 20181 U L^{-1} respectivamente). Con una concentración de 1,5 mM de este compuesto, se observó una disminución en la actividad de la enzima (Fig. 23 D).

Durante las primeras 24 h de incubación con glicina, las tres produjeron mayor actividad enzimática relativa que el control. Sin embargo, transcurrido este tiempo, el control presentó mayor actividad enzimática relativa. Como se puede observar en la Fig. 23 E, el efecto máximo este compuesto se notó a las 12 h de incubación a una concentración de 1 mM L^{-1} cuando la producción fue de xilanasa fue de 19872 U L^{-1} .

Utilizando 1,5 mM L^{-1} de cloruro de zinc, la actividad de xilanasa fue de 25498 U L^{-1} después de 24 h de incubación. Concentraciones menores de este compuesto afectaron negativamente la producción de xilanasa (Fig. 23 F).

La producción óptima de la enzima xilanasa recombinante se observó en medios líquidos suplementados con dextrosa 1 mM L^{-1} (36292 U L^{-1}) después de 12 h de incubación (Fig. 23 G). La adición de 0,5 L^{-1} o 1,5 L^{-1} de este azúcar al medio resultó en una disminución de la actividad de xilanasa. Como la mayor actividad xilanolítica se obtuvo con 1 mM de dextrosa, se probaron concentraciones de hasta 3 mM, pero la mayor producción se logró previamente.

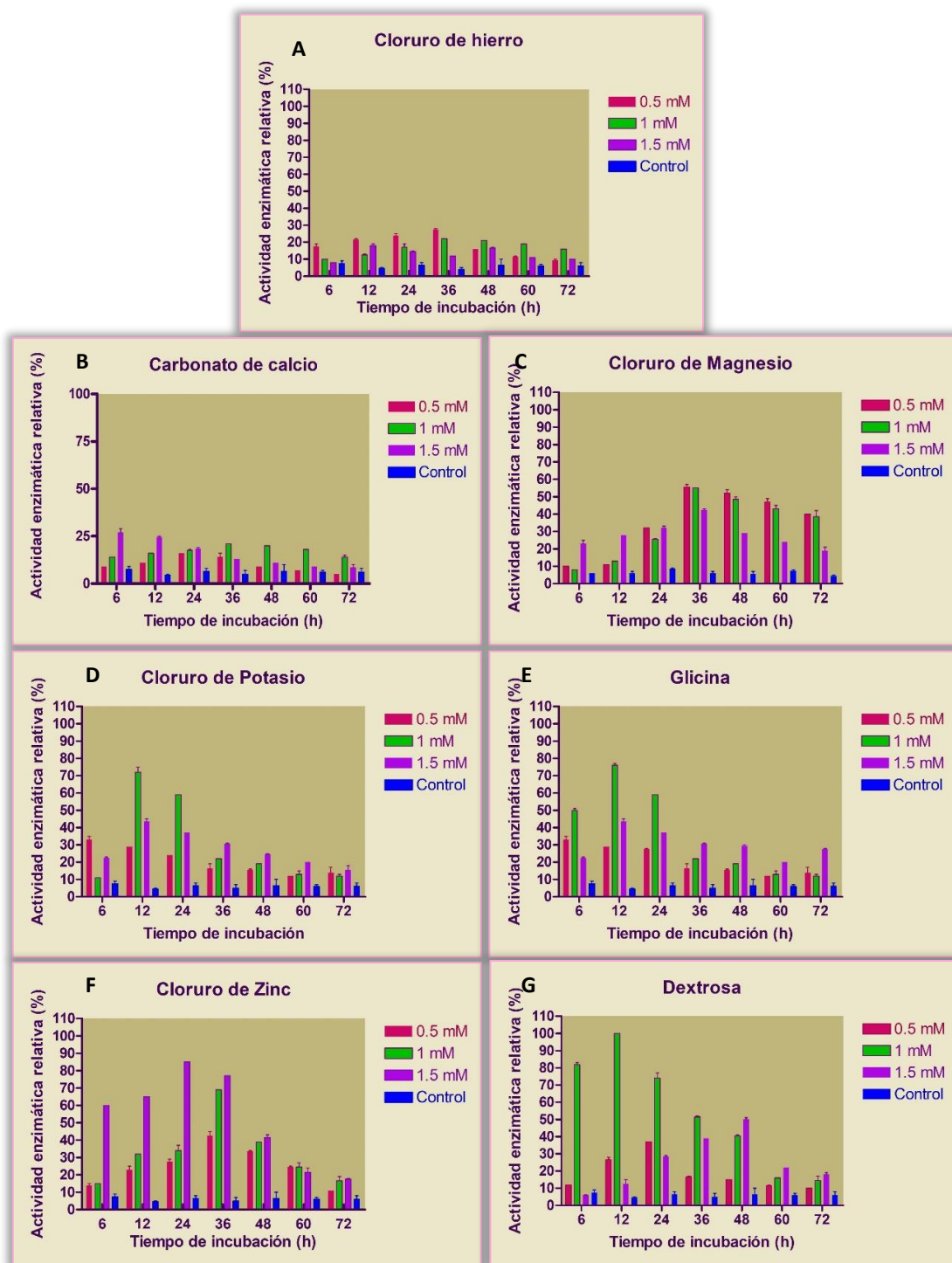


Figura 23: Influencia de diferentes concentraciones de compuestos sobre la actividad xilanolítica durante 72 h de incubación. A) Cloruro de hierro, B) Carbonato de calcio, C) Cloruro de magnesio, D) Cloruro de potasio, E) Cloruro de zinc, F) Dextrosa y G) Glicina. Los ensayos se realizaron a 28°C en agitación.

2.4.3.4 Caracterización de la actividad xilanasa recombinante presente en el sobrenadante

En el análisis del zimograma con las muestras de cultivo suplementado con dextrosa 1 mM L⁻¹ a las 6, 12 y 24 h de incubación, se detectó la enzima xilanasa, la cual se identificó por la visualización de una zona más clara en el gel, como resultado de actividad xilanolítica (Fig. 24).



Figura 24: Detección de la enzima xilanasa. ND- PAGE en condiciones nativas utilizando tinción con Rojo Congo. Los carriles 1,2 y 3 corresponden a los sobrenadantes de cultivo suplementado con dextrosa 1 mM a las 6, 12 y 24 h de incubación. Se sembraron 20 µg de proteínas por pocillo.

El pH óptimo del extracto enzimático fue 5,6 mientras que la temperatura óptima fue 60 °C (Fig. 25 A y B). El extracto retuvo el 100 % de su actividad después de 2 h de incubación a 60 °C y el 97 % de actividad luego de 2 h (Fig. 25 C). Asimismo, conservó el 100 y 95 % de actividad luego de 1 h, cuando se incubó a pH 5,6. (Fig. 25 D).

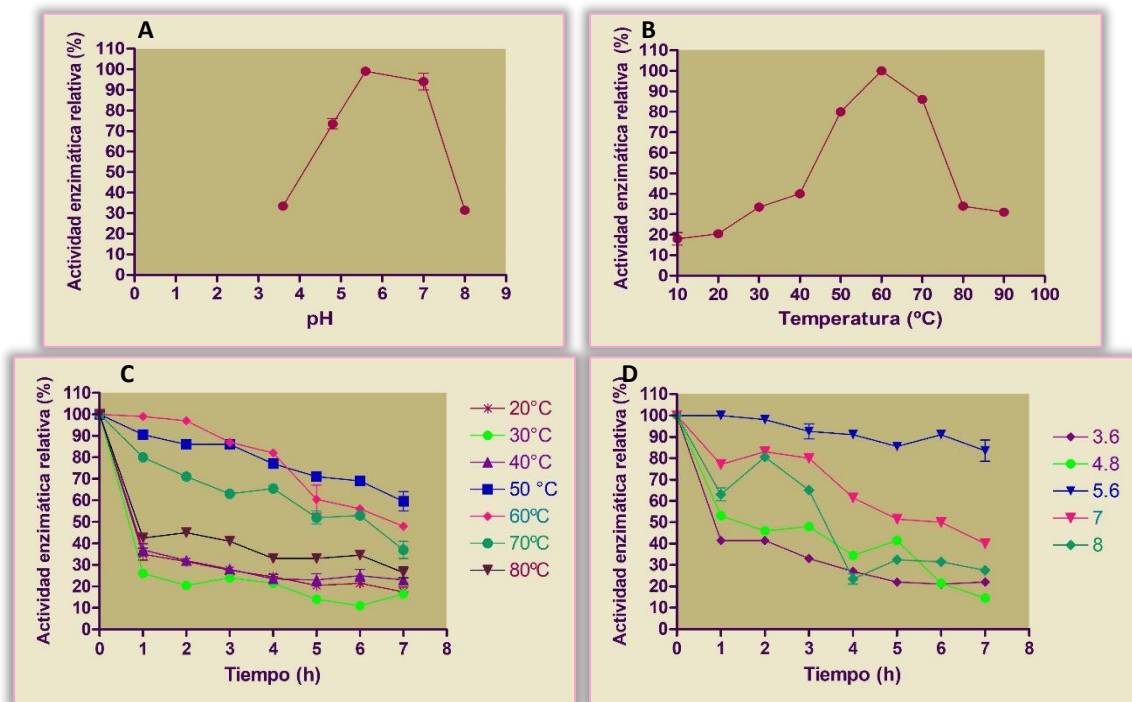


Figura 25: Efectos del pH y la temperatura sobre la actividad xilanolítica de la enzima xilanasa purificada (Fig. A y B). Efectos de temperatura y pH sobre la estabilidad xilanolítica de la enzima xilanasa purificada (Fig. C y D). Estos ensayos fueron realizados a 60°C (Fig. 25 A y D) y a pH 4,8 (Fig. 25 B y C).

SECCIÓN III: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE XILANASA RECOMBINANTE

2.4.4 Purificación de la enzima xilanasa

Se utilizó el cultivo de *K.lactis*GG799/xil crecido en medio YPGal partiendo de un inóculo inicial con $DO_{600} = 1.8$, cultivado a 28 °C y suplementado con dextrosa 1 mM L⁻¹, obtenido luego de 12 h de crecimiento, dado que fueron las condiciones que mostraron resultados prometedores para obtener un perfil proteico máximo, luego de 12 h de crecimiento. Las subsiguientes determinaciones, se realizaron con esta fracción proteica purificada.

2.4.5 Análisis electroforético y detección de la enzima xilanasa

El SDS-PAGE con tinción con AgNO₃ reveló una única banda, lo que indicó purificación a homogeneidad, siendo la masa molecular de la proteína de aproximadamente 20 kDa (Fig. 26).

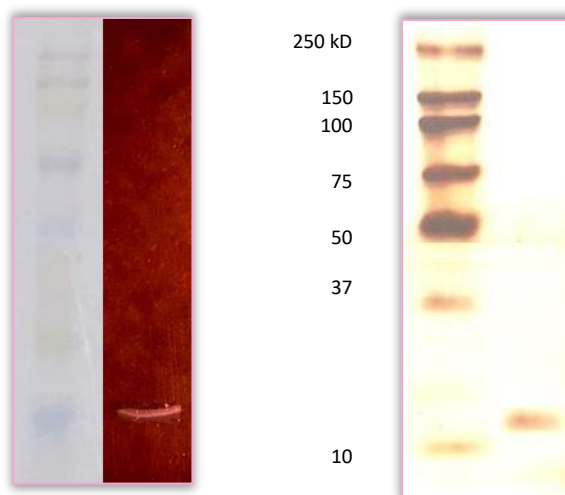


Figura 26: Estimación del peso molecular de la enzima xilanasa purificada. A) SDS/Page Plata. B) Zimograma con xilano 1% el gel se incubó en tampón acetato de sodio pH 4,8 a 50 °C 60 min min y luego se tiñó con rojo Congo 0,1% (p/v) durante 30 min. Finalmente se decoloró con NaCl 1M hasta la aparición de la banda. Carril 1: MP. Carril 2: xilanasa recombinante. Se sembraron 20 µg de proteínas/pocillo.

2.4.6 pH y temperatura óptimos, estabilidad enzimática

La enzima xilanolítica purificada exhibió un pH óptimo de 5,6 (Fig. 27 A). La temperatura óptima para la actividad xilanolítica de la enzima purificada fue de 60 °C (Fig. 27 B). Por su parte, al evaluar la estabilidad de la enzima xilanolítica purificada, se observó que ésta retuvo el 100 % de actividad a 60 °C luego de una hora de incubación y el 97% al cabo de dos horas (Fig. 27 C). En lo que respecta a la estabilidad en función del pH, la enzima purificada retuvo el 100% de su actividad después de 1 h de incubación a pH 5,6 y el 89 % luego de transcurridas las 2 h ($p \geq 0,05$). Por otro lado, a pH 4,8, la enzima retuvo el 91% de actividad luego de 1 h de incubación, reduciéndose a 80% luego de las 2 h (Fig. 27 D).

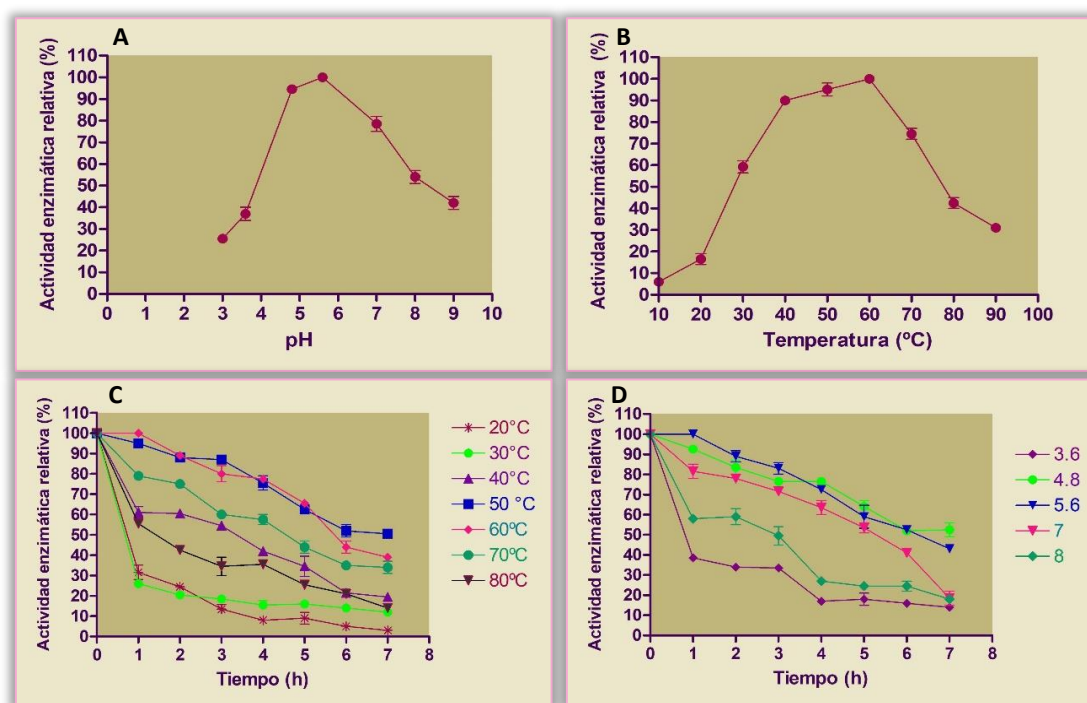


Figura 27: Efectos del pH y la temperatura sobre la actividad xilanolítica de la enzima xilanasa purificada (Fig. A y B). Efectos de temperatura y pH sobre la estabilidad xilanolítica de la enzima xilanasa purificada (Fig. C y D). Estos ensayos fueron realizados a 60°C (Fig. 27 A y D) y a pH 4,8 (Fig. 27 B y C).

2.4.7 Especificidad del sustrato y cinética enzimática

Cuando se determinaron los parámetros cinéticos, se obtuvieron los resultados que se presentan en la tabla 2.

Tabla 2: *Parámetros cinéticos calculados para la enzima xilanasa purificada. Determinación de K_M y V_{MAX} en función de la tasa de hidrólisis del xilano de beechwood a concentraciones que variaron de 0,05– 5 mM*

	K_M (mg/mL)	V_{MAX} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
xilano de Beechwood	5359	0,1785

2.5 DISCUSIÓN

En los últimos años se ha visto un incremento en la demanda de productos naturales de todo tipo. Principalmente se busca que sean menos dañinos (tanto como para la salud en general como para el medio ambiente), rentables y que exhiban alta calidad. Estas características se encuentran en las enzimas producidas por microorganismos como bacterias y hongos, más precisamente en los géneros *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. y *Penicillium* sp. del reino fungi (Basu y col., 2018; Singh y col., 2019).

SECCIÓN I: OBTENCIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE UNA

XILANASA de *T. atroviride* LBM 117

2.5.1 Obtención de la región estructural

La gran mayoría de los protocolos de clonación y expresión heteróloga parte de ARNm (Ahmed y col., 2009), sin embargo, en el presente trabajo no fue posible lograr la amplificación de la enzima xilanasa por RT – PCR. Estos resultados pueden deberse a que la enzima de interés no fue expresada a nivel transcripcional en las condiciones analizadas, indicando que tal vez sean otras las isoenzimas xilanolíticas presentes o, que la enzima xilanasa que se pretendía clonar no se estuviese expresado a nivel transcripcional en el medio de cultivo en el momento de la toma de muestra. Cabe aclarar que fue posible obtener un fragmento de actina a partir de RT-PCT por lo cual inferimos que la técnica se realizó correctamente.

Otra estrategia que se utiliza para la clonación, es la eliminación posterior de la secuencia intrónica a partir del uso de cebadores que los incluya durante la amplificación, partiendo de ADN genómico (Deng y col., 2006; Ghaffar y col., 2011). En este sentido, resulta interesante resaltar que, en el presente trabajo, fue posible clonar y expresar la enzima xilanolítica a partir de ADN genómico, lo que resulta novedoso teniendo en cuenta que la expresión heteróloga se realiza generalmente partiendo de ADNc.

Chavez y col., (2002) fueron los primeros en expresar un gen de endoxilanasa fúngica en una levadura con el empalme correcto de intrones, en dicho caso utilizaron *S. cerevisiae*. En este sentido, la secreción de la proteína funcional es un indicador de que la levadura transformada es capaz de procesar correctamente el ARNm. Por otra parte, Ahmed y col.,

(2009), demostraron que la expresión del gen de xilanasa recombinante se encuentra bajo control transcripcional con el xilano como inductor y la glucosa como represora.

2.5.2 Expresión de una xilanasa de *T. atroviride* LBM 117 en la levadura GRAS *K. lactis* GG799

Diversas técnicas moleculares se han desarrollado para la obtención de enzimas con mejoras en sus propiedades bioquímicas con el fin de permitir su aplicación industrial. Una de las más utilizadas, es la expresión heteróloga de proteínas recombinantes (Basu y col., 2018).

En lo respecta a sistemas hospedadores, las levaduras constituyen un organismo interesante debido a sus características (Juturu y Wu, 2012). En este trabajo, se eligió *K. lactis* GG799 para la expresión del gen de xilanasa de *T. atroviride* LBM 117. Particularmente en la industria alimentaria, *K. lactis* GG799 es ampliamente utilizada para la expresión de proteínas recombinantes, ya que cumple con el requisito indispensable para la FDA al catalogarse como GRAS. Thomas (2015) reportó la expresión de xilanasa recombinante en *K. lactis* GG799 con la que se obtuvieron mejores resultados comparados con los obtenidos con la enzima nativa.

En los reportes disponibles, se aprecia la utilización de péptidos señal nativos (factor α de *S. cerevisiae* o invertasa; toxina killer de *K. lactis*; *Y. lipolytica* XPR2) con el fin de clonar diferentes enzimas. En el presente estudio, para expresar la enzima xilanasa en *K. lactis*, se construyó un plásmido de expresión bajo el control del promotor PLAC4-PBI estrictamente regulado, con la secuencia señal del péptido señal del factor α -MF de *S. cerevisiae* para dirigir la secreción de la proteína recombinante. Park y col. (2021) clonaron en el vector pKLAC₂ con el promotor LAC4 y el factor de apareamiento α obteniendo con éxito la proteína recombinante brazeína. Al igual que los resultados obtenidos en el presente trabajo, muchos genes de xilanasa han sido expresados con éxito en *K. lactis* GG799, algunos de los cuales

demostraron el potencial uso de esta enzima en panificados. Se la utilizó la elaboración de pan chino al vapor, en la producción de productos químicos de valor agregado y en el biopulpado (Alnoch y col., 2022; Bae y col., 2007; Jiang y col., 2010, Zhan y col., 2014).

SECCIÓN II: OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ENZIMA XILANASA RECOMBINANTE EN LA LEVADURA

GRAS *K. lactis* GG799

2.5.3 Optimización del medio para la producción de la enzima xilanasas en *K. lactis* GG799

La composición del medio de cultivo es crucial para el desarrollo exitoso de cepas para la producción industrial y a gran escala de proteínas heterólogas (Fuzi y col., 2014). En este sentido, tanto la composición del medio nutritivo como las condiciones de cultivo, tienen una fuerte influencia en la producción de xilanasas (Wang y col., 2019). Existen también factores fisicoquímicos que influyen en la producción de xilanasas como ser la temperatura, el período de incubación, la velocidad de agitación, y el pH (Dhaver y col., 2022). Es por esto que, detectar los factores más importantes y optimizar las condiciones de crecimiento, son esenciales para garantizar la producción máxima de estas enzimas, lo que podría reducir significativamente los costos (Uhoraningoga y col., 2018).

2.5.3.1 Optimización del inóculo inicial

En el presente trabajo, la optimización del inóculo inicial de *K.lactis*GG799/xil, condujo a un aumento de la actividad xilanasas. Similares resultados obtuvieron Fuzi y col. (2014) quienes confirmaron que un aumento en inóculo es equivalente a un incremento en la actividad xilanolítica.

2.5.3.2 Optimización de la temperatura de crecimiento de la levadura *K. lactis*

Park y col. (2021), investigaron tres temperaturas de incubación (23, 30 y 37 °C) en un cultivo de *K. lactis* GG799 recombinante, y demostraron que el crecimiento celular de la levadura se vio significativamente obstaculizado a 23 y a 37 °C, en comparación con el cultivo a 30 °C, que consideraron óptimo, determinando que la temperatura influyó en el crecimiento celular y en la expresión de la proteína secretada. En concordancia con los resultados presentados por dichos autores, en esta tesis se comprobó que a 24 y 34 °C, la actividad xilanolítica se vio disminuida, estableciendo 28 °C como la temperatura óptima de crecimiento para estas levaduras.

2.5.3.3 Optimización del medio mediante el agregado de compuestos

Otro factor que juega un rol importante en la actividad enzimática son los componentes del medio de cultivo (Bajaj y col., 2011). Varios estudios han abordado la optimización de las condiciones del medio con el fin de lograr mayores rendimientos de proteínas heterólogas utilizando *K. lactis* GG799 como huésped heterólogo (Thomas y col., 2015; Zhan y col., 2014). En este trabajo, además de suplementar el medio con diferentes tipos de compuestos, se evaluó el efecto dosis/respuesta de cada uno de ellos utilizando tres concentraciones diferentes (0,5 mM, 1 mM y 1,5 mM).

En este sentido, con el agregado de cloruro de hierro y carbonato de calcio, no se observaron efectos significativos sobre la actividad xilanolítica como con los demás compuestos testeados. Sin embargo, Mahilrajan y col. (2014), indicaron que una xilanas recombinante era capaz de retener el 88% de su actividad cuando el medio en el que se encontraba era suplementado con calcio y Kiribayeva y col. (2022), determinaron que con iones calcio era posible obtener mayor actividad xilanolítica, estos hallazgos son opuestos a

los aquí obtenidos. La incorporación de hierro al medio de cultivo disminuyó la actividad xilanasa, exactamente al igual que lo ocurrido a Kiribayeva y col. (2022), quienes vieron inhibida la actividad xilanolítica en presencia de este metal.

Bajaj y Manhas (2012), observaron que, al agregar iones de potasio, la actividad de la enzima xilanasa aumentaba. Por su parte, Fuzi y col. (2012), comprobaron que el agregado de K_2SO_4 junto con otros compuestos, también aumentaba la actividad de una endo- β -1,4-xilanasa expresada en *K. lactis* GG799. En este trabajo, el agregado de cloruro de potasio 1 mM aumentó la actividad de la enzima recombinante, no sucediendo lo mismo al aumentar y disminuir la concentración de dicho compuesto.

Los iones metálicos actúan como cofactor de la enzima involucrada en el metabolismo, mejoran el crecimiento de los organismos y además participan en la producción de diferentes enzimas (Shylesha y col., 2021). Al igual que en la presente investigación, los resultados de Mahilrajan y col. (2014), revelan que la producción de xilanasa aumenta casi un 22% con el uso de iones metálicos Mg^{++} en comparación con el control. Del mismo modo, Kiribayeva y col. (2022) demostraron que una xilanasa recombinante, aumentaba en presencia de Mg^{++} . En nuestro caso, el suplemento con 0,5 y 1 mM de cloruro de magnesio, aumentó la actividad xilanolítica, sin embargo, concentraciones superiores a éstas (1,5 mM) no tuvieron el mismo efecto.

Algunos de los compuestos seleccionados para suplementar el medio de cultivo, presentan valor nutricional para la dieta humana, fue por esto que se decidió elaborar productos panificados partiendo de cultivos enriquecidos con ellos. En este sentido, la dextrosa, se añade a las bebidas energéticas deportivas, y se encuentra en alimentos ricos en hidratos de carbono como los cereales o las papas. La actividad xilanolítica fue máxima en el medio suplementado con dextrosa 1 mM. Sin embargo, mayores y menores concentraciones

de este azúcar, no tuvieron una influencia positiva en la actividad de la enzima. Al igual que estos resultados, Murugan y col. (2011) observaron un aumento en la actividad xilanolítica en un medio de cultivo con dextrosa.

El zinc tiene funciones catalíticas en el cuerpo humano, aumentando la velocidad de las reacciones químicas. En nuestro trabajo, la suplementación del medio con zinc 1,5 mM condujo a un aumento en la actividad xilanasa. Sin embargo, cuando se testearon menores concentraciones, la actividad xilanolítica disminuyó. Del mismo modo Bajaj y Manhas (2012) reportaron que iones zinc tenían un efecto positivo en la actividad de una enzima xilanasa.

Por su parte, está comprobado que la glicina es un aminoácido esencial para muchas funciones musculares, cognitivas y metabólicas, y al tomarlo como suplemento de fuentes alimentarias se obtienen más beneficios. Fuzi y col. (2014), comprobaron que la actividad de xilanasa recombinante fue la más alta en el cultivo temprano en un medio que contenía glicina, lo que está en concordancia con nuestros hallazgos, ya que el suplemento con Glicina 1 mM aumentó la actividad xilanolítica, no así las concentraciones de 0,5 y 1,5 mM.

En la bibliografía existen reportes que contradicen a los resultados obtenidos en el presente trabajo, estos incluyen los suplementos con calcio y zinc, ya que se ha comprobado que iones de calcio tienen efectos positivos sobre la actividad de una endo-1,4- β -xilanasa recombinante (Balderas Hernandez y col., 2021; Yazawa y col., 2011). Shi y col., (2013), afirman que el incremento de la actividad de esta enzima se debe a que los iones de calcio son estructuralmente necesarios para el mantenimiento de la geometría del sitio activo de XynB, mientras que, la ausencia de este ion, causa un efecto negativo en el reconocimiento y la unión al sustrato. Por otra parte, se encontró que iones de zinc tienen un efecto inhibitor en xilanasas de *Penicillium glabrum*, y *P. sclerotiorum* (Knob y col.; 2010, Knob y col., 2013) y Bajaj

y Manhas (2012), reportaron que iones de hierro afectan negativamente la actividad xilanolítica. Lo expuesto anteriormente es contrario a los resultados obtenidos en esta tesis.

Es sabido que más de una cuarta parte de todas las enzimas conocidas requieren la presencia de átomos metálicos para una actividad catalítica completa (Palmer, 2001). Los iones metálicos pueden influir en la actividad de las enzimas de múltiples maneras: pueden aceptar o donar electrones para activar electrófilos o nucleófilos, ellos mismos actúan como electrófilos; pueden enmascarar el efecto de los nucleófilos para evitar reacciones secundarias no deseadas, pueden unir la enzima y el sustrato por medio de enlaces coordinados y pueden mantener los grupos reaccionantes en la orientación tridimensional requerida, o bien pueden estabilizar la conformación catalíticamente activa de la enzima (Palmer, 2001).

Por otro lado, en esta tesis se comprueba que, la productividad óptima de la enzima xilanasa se obtuvo en tiempos de incubación más cortos (12 h), lo que, según Fuzi y col. (2010), hace que el medio sea adecuado para usar cuando se busca una producción eficiente y en menor tiempo.

2.5.4 Caracterización bioquímica del extracto conteniendo xilanasa recombinante

La caracterización bioquímica de enzimas es crucial para comprender sus propiedades y aplicaciones potenciales. En este sentido, el pH óptimo de una enzima es un factor determinante de su actividad catalítica. En el presente estudio, tanto el extracto enzimático de xilanasa recombinante como la enzima xilanasa purificada, mostraron un pH óptimo de 5,6. Este resultado sugiere que la actividad máxima de la xilanasa se produce en un entorno ligeramente ácido. La xilanasa, al ser una enzima que hidroliza enlaces glucosídicos en la xilosa,

puede estar adaptada para actuar en un ambiente ácido, posiblemente imitando las condiciones presentes en su sustrato natural.

La temperatura óptima es otro factor esencial que afecta la actividad enzimática. En este trabajo, tanto el extracto enzimático de xilanasa recombinante como la enzima xilanasa purificada, exhibieron una temperatura óptima de $60 \pm 1^\circ \text{C}$, lo que sugiere que el extracto y la xilanasa purificada funcionan de manera eficiente a temperaturas elevadas. De esta manera, la actividad óptima a $60 \pm 1^\circ \text{C}$ puede ser útil en aplicaciones industriales que involucren la degradación de la xilosa en condiciones de alta temperatura.

La estabilidad térmica es crucial para la aplicabilidad de las enzimas en procesos industriales. En este sentido el extracto enzimático de xilanasa recombinante mostró una retención significativa de su actividad después de 2 h de incubación a 60°C , lo que indica una buena estabilidad a esta temperatura. Sin embargo, la enzima purificada disminuyó dicha estabilidad a la hora, lo que sugiere, que la purificación disminuye la estabilidad térmica de la enzima. Lo mismo ocurrió con la estabilidad en función de pH, dado que el extracto enzimático fue estable durante más tiempo que la enzima purificada.

SECCIÓN III: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA XILANASA RECOMBINANTE

2.5.5 Peso molecular

En el presente trabajo se ha reportado que el PM de la enzima recombinante corresponde a 20 kDa aproximadamente. En este sentido, Polizeli y col. (2005) afirmaron que las endoxilanasas de bacterias y hongos muestran exclusivamente estructuras proteicas de una sola subunidad con un peso molecular que oscila entre 8,5 y 85 kDa y la mayoría muestra glicosilación. Para Boonrung y col. (2016) las xilanasas de bajo peso molecular son de importancia industrial debido a que pueden difundirse mejor e hidrolizar eficientemente el xilano.

Según Liu y col. (2011) la mayor parte de las xilanasas bacterianas pertenecen a la familia GH10, mientras que las xilanasas fúngicas pertenecen principalmente a la familia GH11. La comparación estructural in-silico de xilanasas bacterianas y fúngicas muestra diferencias en su estructura secundaria, especialmente en las áreas del asa. De este modo, xilanasas bacterianas tienen principalmente una estructura de hoja β , mientras que xilanasas fúngicas, tienen además hélices α .

De esta manera, podemos inferir que, por el PM y el modelado tridimensional, esta enzima endoxilanasas pertenece a la familia 11 de las glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.8) las cuales se encuentran dentro del grupo de las xilanasas con masa molecular relativamente baja (< 30 kDa) (Paës y col., 2012).

2.5.6 Caracterización bioquímica de la xilanasa recombinante

Conocer las características bioquímicas de la actividad enzimática es de suma importancia para maximizar la acción hidrolítica de las xilanasas al momento de su aplicación a escala industrial (Barchuk, 2016).

Numerosos reportes en la bibliografía establecen la catálisis óptima de las xilanasas en el rango de pH entre 4 y 7 (Barchuk 2017; Cayetano-Cruz y col. 2016; Zhan y col., 2015). De igual modo, los resultados obtenidos de la evaluación del pH óptimo en el presente trabajo concuerdan con los rangos de pH definidos como óptimos para xilanasas en la bibliografía, ya que el pH óptimo para la enzima fue de 5,6. En este sentido, nuestros resultados son aproximados a los reportados por Kiribayeva y col. (2022) y Zhan y col. (2014), quienes informaron un pH óptimo de 6 para una xilanasa expresada en *E. coli* y *K. lactis* respectivamente.

Para determinar la temperatura a la cual la actividad xilanolítica era máxima, se evaluó la enzima en un rango 10 a 90 °C y los resultados obtenidos mostraron mayor actividad xilanolítica desde 40 a 60 °C. Este rango concuerda con los obtenidos por numerosos autores quienes demostraron que las xilanasas fúngicas típicamente tienen temperaturas óptimas alrededor de 50 °C (Murthy y Naidu 2010). La xilanasa recombinante presentó una temperatura óptima de 60 °C. Resultados similares obtuvieron Balderas Hernández y col. (2021), quienes reportaron temperaturas óptimas de 55° C para una endo-1,4-β-xylanase de *Clostridium cellulovorans*; por Zhang y col. (2012) quienes informaron que la temperatura óptima para una xilanasa termofílica expresada en *E. coli* era de 60° C.

Según Shah y Madamwar (2005), la estabilidad enzimática se ve influenciada en gran medida por la acción del pH y la temperatura. De este modo, según el pH y la temperatura del

medio, la enzima podrá ser inactivada, desnaturalizada o bien puede ocurrir una distribución desfavorable de carga entre el sustrato y las moléculas de las enzimas que aumentan al transcurrir el tiempo. Por este motivo, evaluar termoestabilidad y estabilidad en función del pH, es importante para diferentes aplicaciones industriales.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que, a una temperatura de 60 °C, la estabilidad enzimática fue mayor con respecto a las demás temperaturas evaluadas y que a pH 5,6 la actividad de la enzima fue más estable. Al igual que nuestros resultados, en la bibliografía existen numerosos reportes en los que estos valores son similares (Kiribayeva y col., 2022; Wang y col., 2022).

La presente caracterización reveló una destacada estabilidad y eficacia en condiciones de pH y temperatura, sugiriendo la robustez y versatilidad de la enzima recombinante obtenida mediante ingeniería genética para su utilización en entornos industriales. Estos resultados iniciales allanan el camino para futuras investigaciones y aplicaciones que podrían tener un impacto significativo en la fabricación y procesamiento de productos horneados, resaltando el potencial de la enzima xilanasa como un componente crucial en la formulación de productos de panadería de alta calidad y valor agregado.

2.5.7 Estudios de cinética, especificidad de sustrato e inhibición

Dado que el valor de K_M es mayor que cero, se puede inferir que la xilanasa muestra una cierta especificidad por el xilano de Beechwood. Una K_M baja mejora la afinidad de la enzima por el sustrato. El valor de K_M obtenido en este trabajo, está dentro del rango de xilanasa fúngicas reportadas en la literatura. Dhaver y col. (2022) y Wang y col. (2022), notaron valores similares a los aquí obtenidos. En cuanto a la V_{MAX} , ésta puede estar influenciada por diversos factores, como la concentración de la enzima y del sustrato, así como las condiciones

de reacción, por lo que estos resultados son específicos para las condiciones experimentales utilizadas. En este trabajo, la V_{MAX} obtenida fue alta, al igual que lo observado por Dhaver y col. (2022) y Wang y col. (2019). Debido a que la xilanasa tiene un valor alto de V_{MAX} y un valor bajo de K_M , tiene una alta afinidad por el sustrato, y puede catalizarlo de manera más eficiente y rápida que a otros (Kiribayeva y col., 2022).

2.6 CONCLUSIONES

En el desarrollo de esta tesis no fue posible lograr la clonación a partir de ADNc, sin embargo, se pudo obtener un gen de 720 pb.

La expresión heteróloga del gen de xilanasas se realizó con éxito en *K. lactis* GG799. Estos resultados confirman que el sistema de expresión recombinante en esta levadura fue apropiado para producir la enzima de manera heteróloga. La suplementación con dextrosa, condujo a una actividad xilanólítica óptima (36292 U L^{-1}) luego de 12 h de incubación.

La xilanasas purificada a homogeneidad presentó un peso molecular de 20 kDa. El pH óptimo para la enzima fue 5,6 y la temperatura óptima fue de 60°C . La xilanasas exhibió alta estabilidad a bajo pH y alta temperatura. Las características bioquímicas encontradas son apropiadas para que la enzima sea utilizada en las etapas subsiguientes del presente trabajo.



Capítulo III

LACASAS



3 CAPÍTULO III: LACASAS

INTRODUCCIÓN

3.1 Lacasa

La lacasa (EC 1.10.3.2) es una de las pocas enzimas que ha sido objeto de estudio desde finales del siglo pasado (Upadhyay y col., 2016). En 1883 se la descubrió por primera vez en la savia del árbol de la laca japonesa *Rhus vernicifera*, de donde tomó el nombre, pero su presencia no se demostró hasta el año 1986, cuando se la encontró en hongos (Janusz y col., 2020).

La lacasa es una oxidasa con múltiples sitios de unión al cobre que tiene la capacidad de oxidar compuestos fenólicos por lo que se la clasifica como bencenodiol: oxidoreductasa (*p*-difenol oxígeno oxidoreductasa). Si bien la acción catalítica de la enzima consiste en la oxidación de *p*-difenoles en presencia de oxígeno, la variedad de sustrato que puede ser oxidado es bastante amplia y varía con la fuente de la enzima. Esta falta de especificidad de la lacasa para la reducción de sustrato es su punto clave, ya que su acción puede extenderse a una variedad de sustratos, incluyendo polifenoles, fenoles sustituidos con grupos metoxilo, aminas aromáticas, ascorbato aromático, compuestos que contienen grupos hidroxilo y aminas mientras se produce la reducción de oxígeno molecular a agua (Tobechukwu y col., 2021).

3.1.1 Estructura de la enzima lacasa

Las lacasas típicas contienen tres centros de Cu (Tipo I, II y III) que consisten en cuatro iones de Cu (Fig. 28).

Cu tipo I (Cu T I): es responsable del color azul intenso y tiene electro absorción a 605 nm y espectro de resonancia electro paramagnética (EPR) detectable. Por el alto potencial redox de este cobre, es el sitio donde ocurre la oxidación del sustrato.

Cu tipo II (Cu T II): a diferencia del tipo I, es incoloro y detectable por EPR. Funciona como un aceptor de electrones y tiene una alta afinidad por aniones (F⁻, CN⁻) que actúan como inhibidores de actividad enzimática.

Cu tipo III (Cu T III): tiene un par de átomos de Cu que tienen una absorción débil en el espectro ultravioleta y carecen del espectro EPR. Los tipos II y III juntos forman el grupo trinuclear de lacasas donde se une el dioxígeno y tiene lugar la reducción de cuatro electrones a agua (Agrawal y col., 2020).

Los aminoácidos de estos centros de unión al cobre están distribuidos en cuatro regiones altamente conservadas (L1, L2, L3 y L4). Hay 12 residuos de aminoácidos en la enzima que actúan como ligandos de cobre y están alojados dentro de estas cuatro regiones conservadas (Cheng y col., 2023). Estos residuos son diez His, una Cys y una Leu, Phe o Met. Dentro de los cuales los aminoácidos de unión al cobre tipo 1 son dos His, una Cys y una Met. Los primeros tres residuos son esenciales para la unión del cobre, formando un triángulo fuerte con el ion cobre, mientras que el enlace con el cuarto residuo (una Met axial) es más distante y débil, pudiendo ser reemplazado por otros aminoácidos, tales como Leu o Phe (Thurston, 1994).

En la mayoría de lacasas donde la proteína adopta una conformación monomérica, el cobre tipo I se sitúa en el dominio 3, mientras que el cluster trinuclear de cobre tipo II y III se sitúa en el punto de contacto entre el dominio 1 y 3. Por su parte, el dominio 2 facilita el ensamblaje del *cluster* trinuclear al unir los dominios 1 y 3 (Fig. 29).

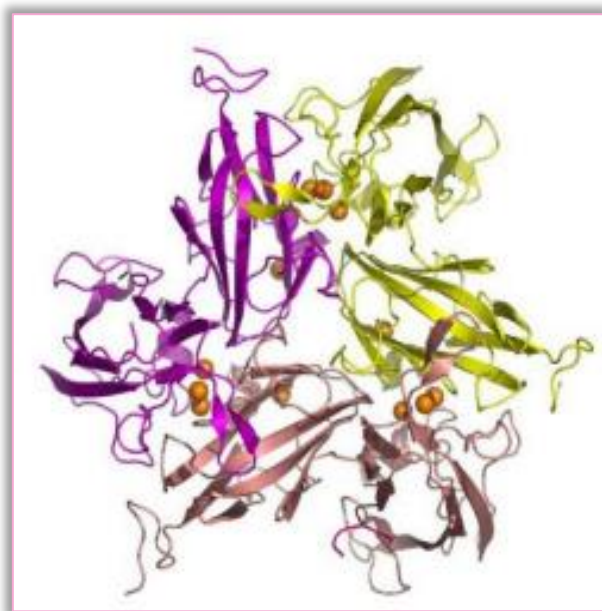


Figura 28: Representación de la estructura molecular de la enzima Lacasa de *Streptomyces coelicolor*. Tomada de Skálová y col., 2009.

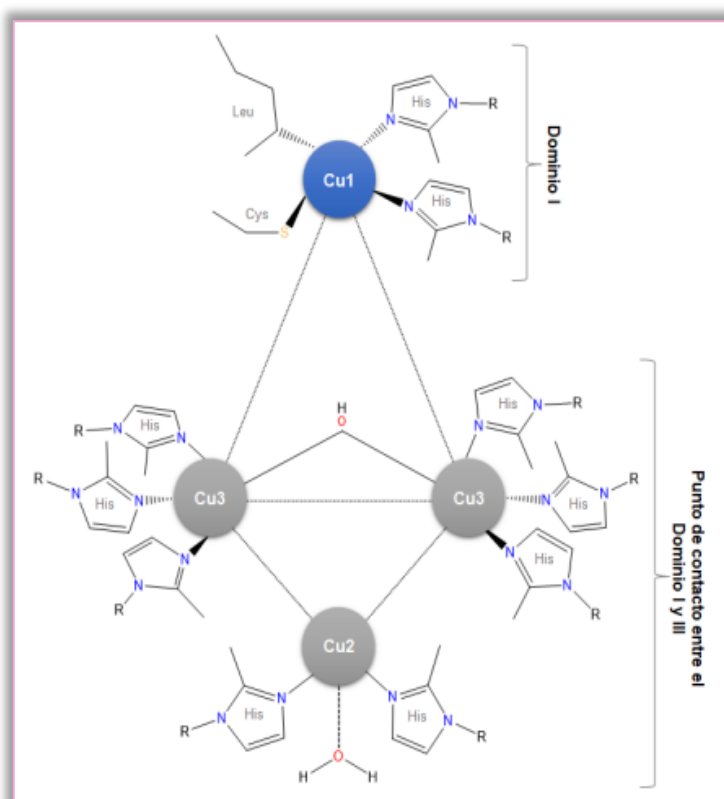


Figura 29: Centro activo de Lacasa de 3 dominios. Tomada de Manzano (2012)

3.1.2 Mecanismo de acción de las lacasas

La lacasa cataliza la oxidación de diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos, a través de la transferencia de un electrón, provocando la reducción lateral de oxígeno en agua (transferencia global de 4 electrones) y la formación de un radical libre procedente del sustrato de partida.

Lacasa



En las reacciones catalizadas por lacasas, distintos centros del cobre de la enzima conducen los electrones desde un sustrato reductor al oxígeno molecular, sin la producción de intermediarios tóxicos (Polyakov y col., 2017). Esto se consigue mediante cuatro oxidaciones mono- electrónicas del sustrato catalizado por el cobre TI (Fig. 30).

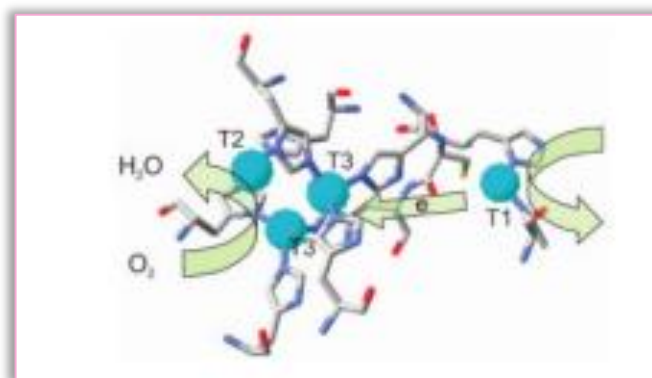


Figura 30: Representación esquemática de la reducción de oxígeno por acción catalítica de lacasa. Tomado de Sosna y col. (2013).

Los electrones son posteriormente transferidos al centro trinuclear mediante una ruta formada por los aminoácidos His-Cys-His a lo largo de 12 Å que separan el centro TI del cobre TIII (Arregui y col., 2019). Tras recibir cuatro electrones procedentes del sustrato, junto con dos protones del medio, la enzima queda completamente reducida. En este estado, reacciona

al oxígeno mediante dos pasos secuenciales de transferencia de electrones, teniendo lugar la reducción del oxígeno molecular y la liberación de agua. La oxidación de los sustratos tiene lugar cuando se produce su unión al cobre TI, siendo este el primer aceptor de electrones (Mate y col., 2017).

El proceso de inhibición de la lacasa puede llevarse a cabo a través de la interrupción de la transferencia del electrón por la unión del inhibidor sobre el cobre de tipo II y III, por quelación de átomos de cobre II o por el intercambio de residuos aminoácidos, entre otros (Cheng y col., 2023).

Los requisitos simples de la catálisis de lacasa (presencia de sustrato y O₂), así como su aparente estabilidad y falta de inhibición hacen que esta enzima sea adecuada y atractiva para aplicaciones industriales. Además, la lacasa puede oxidar una amplia gama de sustratos orgánicos e inorgánicos, incluidos mono, di, polifenoles, aminofenoles, metoxifenoles y complejos metálicos, que son la razón principal de su atractivo para docenas de aplicaciones biotecnológicas (Upadhyay y col., 2016).

3.1.3 Fuentes

Se ha reportado la presencia de lacasas en las paredes celulares de plantas como *Rhus succedanea*, *Lactarius piperatus* y *Prunus pérsica*, donde intervienen en la síntesis de lignina (Chaudhary y col., 2023). Asimismo, se puede encontrar lacasas en algunas especies de bacterias como *Azospirillum lipoferum*, *Marinomonas mediterranea*, *Streptomyces griseus*, *S. apomoea* y *Bacillus subtilis* donde juegan un papel importante en la morfogénesis, la biosíntesis de pigmentos marrones en las esporas que las protegen de los rayos UV y además en la homeostasis del cobre (Martins y col., 2020). La presencia de estas enzimas también se extiende en insectos perteneciente a los géneros *Bombyx*, *Calliphora*, *Diptera*, *Drosophila*,

Lucilia, *Manduca*, *Musca*, *Phormia* y *Schistocerca* donde se cree que juega un papel importante en la esclerotización de la cutícula, oxidando catecoles a las correspondientes quinonas (Shraddha y col., 2011).

Sumado a todos los organismos nombrados con anterioridad, la mayoría de las lacasas descritas en la bibliografía se aislaron de hongos superiores: ascomicetes, deuteromicetes y basidiomicetes (Mahuri y col., 2023) siendo los productores más habituales todos los hongos de pudrición blanca, y sus lacasas las más estudiadas.

Adaptando su metabolismo a diferentes fuentes de carbono, los hongos secretan varias enzimas extracelulares constituyendo lo que se denomina secretoma, que permite la degradación de lignocelulosas y otros biopolímeros.

Los secretomas fúngicos se han descrito como productos de la naturaleza. Especies de hongos como *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Phlebia*, secretan grandes cantidades de proteínas, metabolitos y ácidos orgánicos en los medios de cultivo (Forootanfar y Faramarzi, 2015). La degradación de la madera por podredumbre blanca es posible debido a la secreción de ácidos orgánicos, metabolitos secundarios, metaloenzimas oxidativas, peroxidasas y lacasas codificadas en familias de genes divergentes en los genomas de estos hongos (Marino y col., 2022).

3.1.3.1 *Phlebia brevispora*

Según el NCBI, *Phlebia brevispora* se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Orden: Polyporales

Familia: Meruliaceae

Género: *Phlebia*

Tienen una amplia distribución, considerándose cosmopolita del suelo, crecen sobre madera muerta de coníferas y caducifolios, y a menudo se encuentran en bosques y parques. Asimismo, las especies de *Phlebia* son conocidas por ser degradadores selectivos de la lignina (Del Cerro y col., 2021).

Fisiológicamente *P. brevispora* pertenece al gran grupo de los hongos de pudrición blanca (WRF) los cuales expresan enzimas extracelulares hidrolíticas y oxidativas. En general las especies de *Phlebia* son productoras de tales enzimas ligninolíticas. Hasta el momento se han detectado en cultivos de *P. brevispora* actividades lipasa (EC 3.1.1), manganeso peroxidasa 1.11.1 y lacasa (EC 1.10.3.2) (Fonseca y col., 2013). Nuestro grupo de trabajo ha clonado y expresado el gen que codifica para la enzima lacasa de *P. brevispora* BAFC 633 (Fonseca y col., 2018).



Figura 31: *Phlebia brevispora* BAFC 633 crecido en PDA durante 7 días.

3.1.4 Genes que codifican para lacasa

Al principio se creía que las diferencias entre las lacasas se debían a variaciones postraduccionales en un gen. Sin embargo, varias especies de hongos poseen más de un gen que codifica para esta enzima (Sakamoto y col., 2015).

Las reconstrucciones filogenéticas indican que la diversidad de secuencias entre las lacasas fúngicas es moderada y que las isoformas descritas hasta la fecha provienen del mismo ancestro común (Savinova y col., 2019). El análisis genético confirma el hecho de que a veces, las isoformas provienen de diferentes genes en el genoma (Huang y col., 2016). En *Agaricus bisporus* detectaron dos genes de lacasa (Sjaarda y col., 2015). Bertrand y col. (2015) informaron sobre tres isoformas de lacasa en *Trametes versicolor*. Se detectaron cuatro secuencias de ARNm diferentes mediante el análisis de ADNc en *Rhizoctonia solani* y cinco en *Trametes villosa*. Por otro lado, en el genoma de *Coprinopsis cinerea* se encontraron diecisiete genes de lacasa (Kilaru y col. 2006). En el caso de este hongo específico se definieron dos subfamilias basadas en las posiciones de los intrones y la similitud del genoma, una con 15 miembros (LCC1-LCC15) y la otra con dos miembros (LCC16, LCC17). La primera subfamilia de proteínas deducidas forma una rama del árbol filogenético con grupos más pequeños que probablemente reflejan eventos recientes de duplicación génica. La diversidad de genes de lacasa surgió a través de cambios frecuentes en los codones (sinónimos y no sinónimos). Los cambios de codones sinónimos se reflejan en alelos, con una diferencia total de hasta el 12% en los codones en un par de alelos dado.

Valderrama (2003) presentó la reconstrucción de la evolución de los loci de lacasa fúngica inferida a partir del análisis comparativo de 48 secuencias diferentes. La topología de los árboles filogenéticos indicó que existe una única rama monofilética de las lacasas fúngicas

y que los genes de isoenzimas de lacasa pueden haber evolucionado de forma independiente, posiblemente a través de eventos de duplicación y divergencia. Además, el genoma de *P. ostreatus* incluye 12 genes de lacasa, seis de estos genes parecen estar agrupados en la región subtelomérica del cromosoma IV, mientras que los otros se encuentran mapeados en los cromosomas IV, VI, VII, VIII y XI. Sin embargo, hasta la fecha solo se han caracterizado seis isoenzimas de *P. ostreatus*.

Los genes de lacasas, en muchos hongos filamentosos presentan secuencias que exhiben un patrón común y codifican polipéptidos de aproximadamente 520-550 residuos de aminoácidos, incluyendo un péptido señal que se encuentra en el extremo N-terminal. Las lacasas requieren al menos tres pasos de procesamiento (Pooalai y col., 2022). El péptido señal está involucrado en la maduración de la enzima, guiando la lacasa hacia la ruta de secreción, donde ocurren varios eventos: 1) plegamiento co- traduccional en el retículo endoplasmático donde se forman los puentes disulfuro (Freeman y col., 1993) 2) la incorporación de una secuencia precursora (glucosa 3 manosa 9-glucosa-N-acetilglucosamina 2) que se une a la asparagina de la mayoría de las secuencias NXT/S de la proteína y 3) la unión de iones de calcio que estabilizan la apo-lacasa resultante. Posteriormente, en el aparato de Golgi, se añaden iones de cobre (Taylor y col., Alabama. 2005) junto con carbohidratos adicionales antes de la secreción. Las lacasas también contienen una secuencia amino terminal de secreción abundante en arginina y lisina, lo que sugiere un procesamiento durante la biosíntesis. No todas las lacasas son extracelulares. Estas diferencias en la ubicación pueden contribuir a las diferencias en la especificidad del sustrato.

3.1.5 Regulación génica de lacasa

Las lacasas pueden expresarse de forma constitutiva o inducida, como así también, diferencialmente. La posición de los genes de lacasa y los elementos de control bajo los cuales se encuentran, pueden afectar directamente la regulación de sus genes (Yang y col., 2017). Los promotores de los genes de lacasa han sido bien estudiados y se han descubierto varios elementos de respuesta distribuidos diferencialmente. La región promotora de la isoenzima LAP 2 de la lacasa de *Trametes pubescens* se extiende hasta 1420 pb aguas arriba del codón de inicio ATG. Se encontró que la región promotora tiene elementos de respuesta a metales (MRE), secuencias de consenso CreA (relacionadas con el metabolismo del carbono) y también elementos de choque térmico (HSE) (Piscitelli y col., 2011).

En especies fúngicas como *Gaeumannomyces graminis*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pleurotus sajor caju* y *Trametes sp.*, elementos de activación de la proteína cup1 (ACE), NIT2 y elementos de respuesta xenobiótica (XRE) son responsables de la regulación de las lacasas por cobre, nitrógeno y compuestos aromáticos relacionados con la lignina o sus derivados, respectivamente (Durán-Sequeda y col., 2021). Castañera y col., (2012) examinaron los perfiles de expresión en varias cepas fúngicas bajo diferentes condiciones de cultivo (cultivos sumergidos y sólidos) y en presencia de extracto de paja de trigo. Sus resultados sugieren que ciertas isoformas (en este caso, Lacc2 y Lacc10) aumentan en cultivos sumergidos y disminuyen en fermentación sólida.

Además, el alto porcentaje de genes con respuestas transcripcionales alteradas en los cultivos inducidos con paja de trigo, revela un complejo mecanismo de regulación que podría estar relacionado con la sensibilidad de la familia de genes de las lacasas a los compuestos fenólicos y azúcares presentes en el extracto. Además de los inductores naturales y sintéticos, las condiciones de cultivo, el estrés oxidativo y la presencia de cepas virulentas también afectan la regulación de las lacasas fúngicas.

Aunque hay abundante información disponible sobre los elementos de respuesta en las regiones promotoras de los genes de lacasa, solo se han publicado algunos informes sobre los mecanismos moleculares de su regulación (Piscitelli y col., 2011; Yang y col., 2016). Los avances en la regulación de la expresión de los genes de lacasa puede ser muy útiles para comprender las funciones fisiológicas de las diferentes isoformas producidas por el mismo organismo. Los mecanismos fisiológicos que ocurren durante el desarrollo del micelio pueden modular la expresión relativa de niveles de isoformas de lacasa. Algunas isoformas han sido detectadas en las fases estacionaria y exponencial de la fermentación fúngica, y por lo tanto debe estar involucrada en la degradación del sustrato, mientras que otras isoformas han sido detectadas en la fase estacionaria, y pueden estar relacionadas con los procesos de morfogénesis y pigmentación (Bertrand y col., 2015).

La síntesis y secreción de lacasa también están influenciadas por niveles de nutrición, condiciones de cultivo y la adición de una amplia gama de inductores al medio, con variaciones en estos efectos observados entre especies de hongos y entre diferentes isoformas de la misma especie. Para la mayoría de los ejemplos reportados, la expresión de lacasa está regulada por varios factores que actúan de forma sinérgica y antagónica (Piscitelli y col., 2011).

Se han explorado compuestos que tienen la capacidad de funcionar como inductores de la síntesis de lacasa en una variedad de especies de hongos. Estos compuestos tienen estructuras que son muy similares o son análogas a lignina y sirven como señales celulares para producir lacasas (Bertrand y col., 2013). Se ha postulado que los genes que codifican para varias isoformas de lacasa son regulados diferencialmente, mientras que otros son constitutivos (Xu y col., 2019).

Ha habido varios informes sobre la expresión diferencial de isoformas de lacasa en basidiomicetes después de la adición de compuestos fenólicos y cobre a los medios de cultivo (Bertrand y col., 2015; Fonseca y col., 2013; Fonseca y col., 2014 b; Othman y col., 2018).

3.1.6 Lacasa recombinante

A pesar de que existen numerosos estudios y caracterizaciones bioquímicas de la enzima lacasa, la limitación principal radica en que en la mayoría de los microorganismos producen lacasas en niveles muy bajos para fines comerciales. De esta manera, su obtención en cantidades significativas es limitada debido a su baja producción y a dificultades en su extracción. Es aquí donde la clonación del gen de la enzima seguida por la expresión heteróloga puede proporcionar mayores rendimientos enzimáticos permitiendo la producción de lacasa para suplir la escasez de fuentes naturales y facilitar su aplicación en procesos industriales (Guan y col., 2018). Por esta razón, la investigación y desarrollo de lacasas recombinantes son cruciales para impulsar el desarrollo de nuevas tecnologías.

3.1.7 Optimización del medio de cultivo para la obtención de lacasas

Hay diversos factores que tienen influencia directa en la producción de lacasas, como por ejemplo la inducción con diferentes metales (Fonseca y col., 2018), la temperatura de incubación (Nieter y col., 2016), la cantidad de inóculo inicial (Chmelová y col., 2022). En la bibliografía, existe una gran controversia acerca de cuáles son los compuestos (y sus respectivas concentraciones), que, agregados al medio, son beneficiosos para optimizar la producción de estas enzimas tanto de manera nativa como recombinante (Molina y col., 2023). Es por esto que, en las investigaciones de optimización de procesos de producción de

lacasas, se analizan diversos parámetros con el fin de mejorar tanto la productividad como la eficiencia en su fabricación.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Obtener la región codificante de una lacasa proveniente de *Phlebia brevispora* BAFC 633.
- II. Optimizar la expresión heteróloga de la lacasa recombinante en la levadura GRAS *Kluyveromyces lactis* GG799.
- III. Purificar y caracterizar bioquímicamente la enzima lacasa recombinante.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

SECCIÓN I: OBTENCIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE UNA

LACASA DE *Phlebia brevispora* BAFC 633

A fin de obtener la región que codifica para una lacasa del hongo de pudrición blanca *P. brevispora* BAFC 633, se trabajó con la secuencia clonada en el vector pGEMT (Promega) por Fonseca (Fonseca y col., 2018).

3.3.1 Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores específicos se trabajó con la secuencia codificante de un gen de lacasa obtenido a partir de *P. brevispora* BAFC 633 (Genbank: JQ728448). En base a dicha secuencia, se diseñaron un cebador sentido y dos cebadores antisentido.

Para permitir la posterior clonación, se tuvo en cuenta la incorporación de adaptadores para enzimas de restricción, verificando previamente las enzimas de restricción que permiten la linealización del plásmido y descartando aquellas que actúan sobre el amplicón mediante el programa NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). También se incorporó la secuencia señal del péptido señal α -MF. El análisis de los parámetros se realizó mediante el programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)

Tabla 3: Secuencia de cebadores utilizados para amplificar el gen que codifica para la enzima lacasa. Los nucleótidos en *itálica* son complementarios a las secuencias de la región codificante de la enzima lacasa. En **negrita** se muestran los sitios reconocidos por las enzimas de restricción *NotI* y *XhoI* y en *cursiva y subrayado* el sitio de corte para la proteasa *Kex*.

Nombre del cebador	Secuencia nucleotídica 5' - 3'
Lak-S	ATGACACT CGAG <i><u>AAAAGA</u></i> ATCACAGGACCTATTGGG
NLacKL-AS1	GGTCTAG CGGCC CGCTTAGTTTTGTCCAGAACCTTCTG
NLacKL-AS2	GGTCTAG CGGCC CGCTTAATGATGATGATGATGATGATGATGATG ATGTTTTGTCCAGAACCTTCTG

3.3.1.1 Amplificación de la región codificante

La amplificación se realizó utilizando como templado la región codificante de la lacasa del hongo de pudrición blanca *P. brevispora* BAFC 633 que se clonó en el vector pGEMT easy vector (Promega) por Fonseca y col. (2018). En dicha amplificación se utilizaron los cebadores mostrados en la tabla 3. Las condiciones de PCR y el ciclado utilizados fueron los mismos que los reportados previamente por el grupo de trabajo (Fonseca y col., 2018).

3.3.1.2 Purificación de fragmentos de PCR

Todos los fragmentos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) en tampón TBE 0,5X. Posteriormente se cortaron las bandas de interés y se purificaron por medio del kit comercial *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean- Up System* (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Seguidamente, se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

SECCIÓN II: OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ENZIMA LACASA RECOMBINANTE EN LA LEVADURA GRAS *K. lactis* GG799

3.3.2 Microorganismos utilizados y su mantenimiento

Para clonar la región que codifica para una lacasa, se utilizaron bacterias *Escherichia coli* DH5 α (Promega). Para su crecimiento, se incubaron a 37 °C empleando como medio sólido Luria Bertani (LB) con agar (2 % p/v) y como medio líquido LB, con y sin el agregado de ampicilina 100 μ g/mL (Sambrook y col., 1989) según fueran recombinantes o no respectivamente.

Para la expresión recombinante de lacasa, se utilizó como hospedero la levadura GRAS *K. lactis* GG799 (E100S, *K. lactis*, Protein Expression Kit, NE Biolabs). Ésta se incubó a 28 °C en medio YPGal (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, galactosa 40 %), y se mantuvo con siembras periódicas en placas de Petri en medio YPGal añadiendo agar bacteriológico al 2% p/v el tiempo necesario para su crecimiento. Posteriormente se conservaron a 4 °C.

3.3.3 Digestión de los amplicones y el vector con enzimas de restricción

Para lograr la clonación y la expresión en bacterias y levaduras respectivamente, tanto las PCR (inserto) como el vector pKLAC₂ (New England Biolabs) se cortaron con las enzimas de restricción que generan extremos compatibles entre ellos. Para ello se utilizaron las enzimas de restricción NotI (New England Biolabs®, R0189S) y XhoI (New England Biolabs®, R0146S), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.3.1 Ligación de los vectores con el inserto

Los productos de *PCR* digeridos se ligaron con el vector pKLAC₂ utilizando ligasa T4 siguiendo las instrucciones del fabricante (*Life technologies*). Estos productos se utilizaron para realizar la transformación de las células *E. coli* DH5 α competentes.

3.3.4 Clonación del gen que codifica para la enzima lacasa en *E. coli* DH5 α

3.3.4.1 Obtención de células competentes

Para obtener células *E. coli* DH5 α competentes, se empleó el siguiente procedimiento: 10 mL de LB se inocularon con 0,1 mL de un cultivo en fase estacionaria de bacterias *E. coli* a transformar. Se incubó con agitación vigorosa hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,1 – 0,4. Este cultivo se transfirió en esterilidad a un tubo de 15 mL a 4 °C y se centrifugó a 8.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 5 mL de cloruro de calcio 0,1 M frío, y se dejó a 4 °C durante 20 minutos. Seguidamente, las células se recuperaron por centrifugación a 8.000 rpm. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 0,05 mL de cloruro de calcio 0,1 M frío, mediante una suave inversión. Las células competentes se mantuvieron en baño hielo hasta su utilización.

3.3.4.2 Transformación de bacterias con plásmido recombinante

Para la transformación a 50 μ l de las células competentes mantenidas en hielo, se añadió el plásmido, y se dejó la mezcla a 4 °C durante 20 minutos. La entrada del plásmido en la célula se indujo mediante un choque térmico a 42 °C durante exactamente 50 segundos, con un posterior enfriamiento en hielo durante 2 minutos. Las células ya transformadas se incubaron durante 90 minutos a 37 °C en *shaker* en medio SOC (2 g/L triptona, 0,5 g/L de

extracto de levadura; 1 mL de NaCl 1 M; 0,25 mL de KCl 1 M; 1 mL de Mg^{++} 2M; Sambrook y col., 1989), para permitir su recuperación y multiplicación. Finalmente, se sembraron en placas con agar LB suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ (Sambrook y col., 1989). También se incluyeron vectores cerrados como control.

3.3.4.3 Extracción y cuantificación de ADN plasmídico

Para la extracción del ADN plasmídico, se llevó a cabo el procedimiento de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989). Las células concentradas por centrifugación se resuspendieron en Buffer TE (tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM). La lisis celular y la desnaturalización del plásmido se llevó a cabo con SDS 1% (p/v) y NaOH 0,2 N, seguido de la neutralización de la solución mediante el agregado de una solución compuesta por acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial 5 M. El ADN plasmídico se separó por centrifugación y se precipitó en etanol absoluto.

La calidad de los plásmidos aislados se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% (p/v) que se tiñeron con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó a 120 V por 50 min.

La cuantificación se realizó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN.

3.3.4.4 Secuenciación automática del ADN

La secuenciación automática de los productos de PCR y los fragmentos clonados se realizó mediante el Servicio de Secuenciación Automática MACROGEN Corea.

3.3.4.5 Análisis bioinformático de las secuencias de ADN obtenidas

Las secuencias obtenidas se analizaron *in silico* mediante herramientas bioinformáticas disponibles *online*. Para el análisis de identidad se utilizaron las herramientas Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Clustal W (<http://www.clustal.org/>).

3.3.4.6 Linealización de los plásmidos recombinantes y clonación en *K. lactis* GG799

Los plásmidos que resultaron recombinantes se linealizaron con la enzima SacII, siguiendo las instrucciones del fabricante para su incorporación dentro del genoma de *K. lactis* GG799. Para ello se hicieron competentes *K. lactis* GG799 utilizando el kit comercial *Pichia EasyComp*[®] (K173001, Invitrogen), y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar *Yeast Carbon Base* (YCB: 15 mL de tampón tris-HCl 1 M pH 7,5, medio YCB 5,85 g·L⁻¹, agar 12 g/ L⁻¹ y acetamida 5 mM) conteniendo DMP 5 mM o ABTS 0,2 mM como sustrato que permitió visibilizar actividad lacasa por la formación de halos anaranjados y verdes respectivamente. La presencia de acetamida como única fuente de nitrógeno permite seleccionar los clones que incorporaron el plásmido. Esto se debe a que el gen de la acetamidasa fúngica en pKLAC₂ hace posible la selección de levaduras que contienen un *cassette* de expresión integrado al permitir su crecimiento en ese medio. Luego de 4 días de incubación a 28 °C, los transformantes que mostraron el desarrollo de un color naranja o verde intensos se utilizaron para continuar con los ensayos preliminares de producción de lacasa en medio líquido a fin de seleccionar los clones con mayor actividad. Para ello se los cultivó en medio sólido YPGal durante 2 días a 28 °C y se raspó un área de colonias de 6 mm³, que fue transferido a 2 mL de YPGal líquido. Luego de 2 días de incubación a 28 °C, dicho cultivo se transfirió a un erlenmeyer conteniendo 20 mL de medio YPGal. Se

tomaron muestras durante 10 días para determinar el pico de actividad lacasa (como se describe en la sección 3.3.6) y seleccionar el clon más promisorio.

A fin de verificar la secuencia clonada en *K. lactis* GG799, las levaduras seleccionadas crecieron en 10 mL de medio líquido YPGal durante 48h a 28 °C, para obtener el ADN genómico (Fonseca y col., 2015) y realizar las PCR. Luego se analizaron como se describe en la sección 3.3.4.7.

3.3.4.7 Análisis electroforético

La calidad de los plásmidos aislados y los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa, a concentraciones adecuadas al tamaño del ADN a separar, lo cual abarcó un rango del 1 % (p/v) al 2 % (p/v) de agarosa disuelta en tampón TBE 0,5X. Las muestras se prepararon mezclando 3 µL de ADN plasmídico o 5 µL de productos de PCR, con 1 µL de tampón de siembra 6X (compuesto por glicerol 60%, EDTA 0,01 M y azul de bromofenol 0,1%). La corrida electroforética se realizó a 120 voltios durante 30 min utilizando una cuba *SubSystem 70* modelo E-0310 (Labnet Internacional, Inc.) y una fuente de poder *Power Station 300 Plus* (Labnet Internacional, Inc.). Para visualizar el ADN los geles de agarosa se prepararon con bromuro de etidio (10 µg/mL). Luego se observaron bajo luz ultravioleta.

3.3.5 Optimización de la producción de la enzima lacasa en *K. lactis* GG799

3.3.5.1 Optimización del Inóculo inicial

Con el fin de identificar mejoras en la actividad lacasa, se varió la densidad óptica inicial del cultivo en un rango que abarcó de $DO_{1.6}$ a DO_3 . Para esto, el clon seleccionado, creció en

medio sólido YPGal durante 2 días a 28 °C y se obtuvo un área de 6 mm² mediante el raspado de la colonia. Seguidamente, se cultivaron en tubos de vidrio con 2 mL de YPGal y crecieron a 28 °C en agitación. A este cultivo, se le denominó pre- inóculo. Luego de 2 días, se transfirió con las DO correspondientes a un Erlenmeyer de 100 mL conteniendo un volumen final de 20 mL de medio líquido YPGal (sección 3.3.2). Las muestras se tomaron durante 9 días. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

3.3.5.2 Optimización de la temperatura de crecimiento

El efecto de la temperatura de crecimiento se analizó con la DO que mostró mejoras de la actividad lacasa. Para ello el cultivo creció en medio YPGal a 24, 28 y 34 °C en agitación. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

3.3.5.3 Optimización del medio mediante el agregado de compuestos

Se estudió el efecto de cloruro de hierro, sulfato de hierro, carbonato de calcio, cloruro de zinc, cloruro de potasio, sulfato de amonio y Tween 80 en concentraciones de 0,5 a 1,5 mM. El compuesto que mostró la mayor actividad lacasa se seleccionó para evaluar su efecto en concentraciones de 0,5 a 3 mM⁻¹. El medio control no tenía compuestos agregados.

3.3.6 Determinación de actividad lacasa

La determinación de actividad lacasa (EC 1.10.3.2) se realizó empleando la técnica descrita por Field y col. (1993), con 2,6- dimetoxifenol (DMP) 5 mM como sustrato en tampón acetato de sodio 0,1 mM (pH 3,6). El cambio de la absorbancia se monitoreó a 469 nm ($E_{469} = 27,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro Shimadzu UV-3600. La actividad enzimática se

expresó en unidades enzimáticas (U), donde 1 U es equivalente a 1 M /min de producto a 30 °C.

3.3.7 Caracterización de la actividad lacasa recombinante presente en el sobrenadante

Para la caracterización de la actividad lacasa, se seleccionó el medio de cultivo que presentó mayor actividad.

3.3.7.1 pH óptimo

El efecto del pH sobre la actividad enzimática de la lacasa presente en el sobrenadante se realizó utilizando el protocolo propuesto en la sección 3.3.6, pero se realizó utilizando tampón acetato de sodio 0,1 M a distintos pH, en un rango de 3 a 8.

3.3.7.2 Temperatura óptima

La determinación de la temperatura óptima para la lacasa presente en el sobrenadante se realizó utilizando el protocolo propuesto en la sección 3.3.6, utilizando temperaturas de trabajo en un rango entre 20 a 90 °C.

3.3.7.3 Estabilidad en función de la temperatura

Para la determinación de la estabilidad enzimática en función de la temperatura de la enzima lacasa presente en el sobrenadante, esta se incubó a diferentes temperaturas 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C y 90 °C, determinando la actividad a varios intervalos de tiempos durante 7 h. La actividad residual se expresó en porcentaje, tomando la actividad enzimática en el tiempo cero como 100%.

3.3.7.4 Estabilidad en función del pH

Para la determinación de la estabilidad enzimática en función del pH de la enzima lacasa presente en el sobrenadante, este se incubó en diferentes tampones a pH 3; 3,6; 4; 4,5, 5; 5,5, 6; 7;8 y 9 y se determinó la actividad a varios intervalos de tiempo durante 7 h. La actividad residual se expresó en porcentaje, tomando la actividad enzimática en el tiempo cero como 100%.

SECCIÓN III: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LACASA RECOMBINANTE

3.3.8 Purificación de la enzima lacasa

El cultivo con la mayor actividad lacasa, se utilizó para purificar la enzima. De esta manera, el medio líquido conteniendo *K. lactis* GG799 secretoras de lacasas, se centrifugó a $6000 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante se filtró utilizando una membrana de difluoruro de polivinilideno $0,2 \mu\text{M}$ (Thermo Fisher). Luego, la enzima lacasa se purificó por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 10 min con filtros centrífugos Nanosep R 100 K.

La determinación de la cantidad de proteínas presente en la muestra se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo Protein Assay Dye Reagent de Bio-Rad. La determinación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, usando como estándar albúmina de suero bovino a una concentración entre 2 y $20 \mu\text{g/mL}$.

3.3.9 Análisis electroforético y detección de la enzima lacasa

Con el fin de verificar la homogeneidad de la fracción enzimática obtenida y determinar el peso molecular de la enzima, la fracción purificada se analizó en geles de poliacrilamida desnaturalizante al 8% p/v (SDS- PAGE) y se reveló por tinción con 0,2 g/L plata (Laemmli, 1970; Eggert y col., 1996). Se sembraron $20 \mu\text{g}$ de proteínas totales. La corrida electroforética se realizó a 100 V por 120 min en tampón tris-glicina 1,5 M (pH 8,3). Para la determinación del peso molecular se utilizó un patrón de masa molecular preteñido (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards, #1610395; BioRad).

La presencia de lacasa en la fracción obtenida se determinó mediante electroforesis no desnaturizante en geles de poliacrilamida al 8% p/v (ND-PAGE) (Laemmli, 1979; Murugesan y col., 2007; Fonseca y col., 2010). La corrida electroforética se realizó a 100 V por 120 min en tampón tris-glicina 1,5 M, pH 8,3. Los geles se fijaron en una solución conteniendo 40% v/v de metanol, 10% v/v de ácido acético y se revelaron con una solución de 2,6- dimetoxifenol 5 mM en tampón acetato de sodio 0,1 M (pH 3,6) durante 10 min para detectar las bandas con actividad lacasa (Murugesan y col., 2007; Fonseca y col., 2010). Asimismo, se realizaron zimogramas mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) (Fonseca y col. 2018.) y para la detección de las bandas el gel se trató previamente con una solución de acetato de sodio 50 mM y Tritón X-100 0,2% (v/v) durante 30 min para eliminar el SDS y permitir el replegamiento del dominio catalítico. Luego se reveló con DMP 5 mM en tampón acetato (pH 3,6) durante 10 min (Murugesan y col., 2007).

3.3.10 Caracterización de la actividad lacasa purificada

3.3.10.1 pH óptimo

El efecto del pH sobre la actividad enzimática de la lacasa purificada se determinó de la misma manera que se describe en la sección 3.3.7.1.

3.3.10.2 Temperatura óptima

La determinación de la temperatura óptima para la lacasa purificada se determinó de la misma manera que se describe en la sección 3.3.7.2.

3.3.10.3 Estabilidad en función de la temperatura

Para la determinación de la estabilidad enzimática de la enzima lacasa purificada se determinó de la misma manera que se describe en la sección 3.3.7.3.

3.3.10.4 Estabilidad en función del pH

La estabilidad enzimática a diferentes pH de la enzima lacasa purificada, se determinó de la misma manera que se describe en la sección 3.3.7.4.

3.3.11 Especificidad de sustrato y cinética enzimática

Los parámetros cinéticos K_M y V_{MAX} se determinaron midiendo la actividad enzimática a varias concentraciones (0,01– 5 mM) de ABTS y 2,6-DMP como sustrato, en tampón acetato de sodio 0,1 M (pH 3,6) a 30°C, como se describe en la sección 3.3.6 para el DMP. Para el caso de la determinación con ABTS el cambio de la absorbancia se monitoreó a 436 nm ($E_{436} = 29,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro Shimadzu UV-3600. La actividad enzimática se expresó en unidades enzimáticas (U), donde 1 U es equivalente a 1 μM de producto formado. Las constantes cinéticas se calcularon mediante el método de Michaelis–Menten utilizando el Programa GraphPad Prism versión 4.0 para Windows. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

3.3.12 Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de $\alpha = 95\%$. Para realizar estos análisis se utilizó el software Statgraphics Centurion XVII.

3.4 RESULTADOS

SECCIÓN I: OBTENCIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE UNA LACASA DE *Phlebia brevispora* BAFC 633

3.4.1 Amplificación de la región codificante

La región codificante se amplificó utilizando los cebadores diseñados para tal fin y se obtuvo una banda de 1500 pb (Figura 32 A). El amplicón de 1500 pb se purificó obteniendo una banda única pura (Figura 32 B).

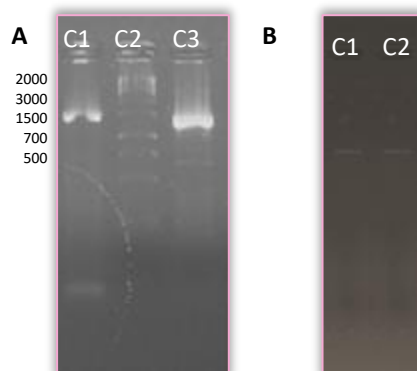


Figura 32: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Amplificaciones de la región codificante. La banda amplificada tiene 1000 pb aproximadamente. (C1): Amplificación obtenida con los cebadores LaK-S y LaKL-AS1, (C2): MP, (C3): Amplificación obtenida con los cebadores LaK-S y LaKL-AS2, En cada carril se sembraron 5 μ l de PCR más 1 μ l de tampón de siembra. B Purificaciones de amplificaciones. (C1): PCR realizada con los cebadores LaK-S y LaKL-AS1; (C2): PCR realizada con los cebadores LaK-S y LaKL-AS2. En cada carril se sembró 2 μ l de PCR más 1 μ l de tampón de siembra.

Los productos de la secuenciación mostraron 100% de identidad con la secuencia codificante de lacasa obtenida previamente (Genbank JQ728448). La secuencia posee un ORF de 1500 pb. En la figura 3.6 se muestra la secuencia nucleotídica que codifica para la enzima lacasa.

ACCACAGTCAAGCTACGAGAGTGTCTCTCTAGTTCTTGTCTGCAACCACTTGTCTCTTATCCCTCTGCAAGATATTGTATCAACAGG
 M L S L V L V A F L A L L S S A G V F A T F G
 ACCTATTGGGCGCTGTAAACGACTTGCACATCGCCAAACAGTCTGTCAGTCTGATGGATTCCCGGTGAGGCGATCAGACTGAAAGGCA
 P I G F V T D L M I A N T V V S F D G F P R E A I T T E G Q
 ACTTCTCTGGGCGCTCTCATCAGGCTACAGGCGAGTGAATGTTAGTGATACCGTGTCTTATGGCTTATCCATCTTTACTAGGCGGAC
 L F G F L I T G Y K G D
 AACTTCCAGATCAACGTGATCAACAATCTTACGACGAACTCTAAACACGTCAACGTCTATTGTTCTGCTGCACTCTCATACACGCGGTG
 N F Q I N V I H N I T D E T L N T S T S I
 GCTGTGACTACACTGACATTGTCACTTGTATACAGCACTGGCATGGGTTTTTTCAGCATGGAAACCACTGGGCTGACGGCGCTGGCTATGT
 H W H G F F Q H G T N W A D G A A Y V
 GACCCATGCGCTATCGTGACAGGCAATTTCTTCTGTACAACTTACCGTCCCGGATCAGGCTGGTGAGTTACTCATTTCACTCGTCCG
 T Q C F I V T G N S F L Y N F T V F D Q A
 GACTTCAAGTGGAGTTAAACATCGATGAATTCAGGTACGTTCTGGTATCATAGCCACCTCGCGTTGCACTACTGCGATGGGCTTCTGGT
 G T F W Y H S H L A L Q Y C D G L R G
 CCTTGGTCTGATATGATCCTCAGGATCCTATGCGGACATGTATGACGTGGATACGGTAATCGCATTTTGGGTATCTACTTTACTGT
 P L V V Y D P H D F Y A D M Y D V D N
 TCTGAAACCATCACACTTTTACCATCTACAGTCATCAGTTGGCAGACTGGTATCAACCAACCGGCGAGACACCAATTAAAGCTCCACAGT
 A S T V I T L A E W Y H Q P A D T I K P P H
 AAGTCAAAATTTGATGTTTCCGTATTCTATCTCATGTCTTCTGTTGTAAGTCTGGCGAGTGCACGCTCATCAATGGTTTGGGCGCTA
 L A S A T L I N G L G R Y
 TGTGGTGGGCGGCGCTCTCTTAACTGTTATCACTGTGGAGCAGGGGAGCGGTGAGTCAAGCTGTCTGCTTCTGCTATGCGAGCGCTT
 V G G F A S P I T V I T V E Q G K R
 CATCTCTTGTGTTCTAGATATCGGTTCCGACTGGTTAGCATGGCTTGTGATCCGAGCTACGACTTCAGTATTGACGGTCAAGCATGAC
 Y R F R L V S M A C D F S Y D F S I D G H D M T
 TATTATTGAAGTTGACGGCGTTAACTCCAGGCTCTTACTGTTGACGAGATACAATCTTCCGAGCGGAGATATTCATTATCTGTAAG
 I E V D G V N S K P L T V D E I Q I F A A Q R Y S F I
 TGTCCAGTTGTATTTGAAAGTCCATATGTTTAAACAATCAITTCAGCTCAACGCGACTCGACCGGTCGGAATTTATTGGATTCCGCGCTCA
 L N A T R P V G N Y W I R A Q
 CCTAATGCGCAGCGCTCTTGGTGGATATATTGGCGGAATCAATTCGCGCATTCCTCGCTATATCGGCGCGCCAGACATAGATCCTATA
 F N A Q Q L L V G Y I G G I N S A I L R Y I G A F D I D F I
 ACGGTGAAGAGCGCTAGCATTAAAGCCCTTCAAGAAGTCAATTTACATCCGCTAATCGATCCAGCTCGAGTACCGTATGTGTATTGAGG
 T V K T P S I K P L Q E V N L H P L I D F A A
 ACTTTTAATTCTGACCTACCTTATCATAGCGGGAAAGCGGACCCAGATGGTGCAAATGTTGTGATACCGTTGAATCTGTCTATGTAT
 F G K F T F D G A N V V I F L N L S I
 GTAATTGAATGCTACCTTGGGATTGCGATGCGGACTAAATTTGACTTTTCTAGGCTAACGGTCAATTCCTCATCAATGGCACCGCTTTGGG
 A N G Q F L I N G T T F A
 CCCCCACACACCAAGTGTCTCTTCAAGTTCGAAGCGGCGCTAAACCGGCTCAGAAACTCCTTCCGCGAGGCGAGCTCTACACTCTCCCA
 P P T T P V L L Q I P S G A K P A Q K L L P P G S V Y T L P
 AAGAACTCGACAATCGAGATCATCAATTCCTCCCGGTACTGCGCGTGGCGGCGCTCAGCCCTTCCATCTTCAATGGGTAAGTTGGATGGTT
 K N S T I E I I I F P G T A F G G F H F F H L H G
 TGCTGGTGTATCTGACACTGACTTTGAAGCGCGGAAACAATAGCACACTTTCAGCGTCTGCGCAGTGGCGGAAGTTCTGTATATAACTAC
 H T F S V V R S A G S S V Y N Y
 GCGAAACCTGTTCTGCGGACACAGTCAGCATCGGTACTGGCAAAATGACGCTGTACCATCCGTTTACAGGTAAGCGGCGTTATACAC
 A N F V R R D T V S I G T G K N D A V T I R F T
 GCGCAGCTCCAACTCAACACTTGGGAATTCATAGACCGATAATCCCGGCGGCTGGTTCATCCATTGTATATTGATTTTCATTGAAACG
 T D N P G P W F I H C H I D F H L N A
 AGGTTTGGCTGTGGTCACTGGCAGAGGACATTCCGAGCTGGCATCCGCAACCGGTGCTTAGTAAGCGTATCCATTGATAGCAACATT
 G L A V V M A E D I F D V A S A N F V F
 GCGTATTAACTCAGCGCACCTGCAAGCGCTTGGGACCACTCTGTCCATATACGATCAGAAGGTTCTGGGACAAAACCTGAACTCTGGT
 T A W D Q L C F I Y D Q K V L G Q N
 TTGCGCTTGGCACCCATCATACTCAGCTTGTAAACGCTCTTCTATGCC

Figura 33: Secuencias nucleotídica y aminoácídica correspondiente al gen que codifica para la enzima lacasa. La secuencia nucleotídica está representada por letras de color negro, la secuencia aminoácídica por letras de color azul. El péptido señal se encuentra resaltado de color amarillo. En el presente trabajo se clonó la región codificante de la enzima lacasa sin el péptido señal. Fotografía tomada de GenBank JQ728448.1.

SECCIÓN II: OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ENZIMA LACASA RECOMBINANTE EN LA LEVADURA GRAS *K. lactis* GG799

3.4.2 Obtención de lacasa recombinante

Los insertos obtenidos se clonaron de manera exitosa en *E. coli* DH5α manteniendo el 100% de identidad, y se usaron para transformar *K. lactis* GG799.

Se obtuvieron veinte levaduras transformantes con el cebador que no contenía la etiqueta HIS y ocho transformantes con el cebador que contenía dicha etiqueta. Mediante la detección en placa, se observaron zonas de color naranja o verde oscuro alrededor de *K. lactis* GG799, lo que implicaba que las lacasas bioactivas se expresaban y secretaban en el medio extracelular en ambos transformantes (Fig. 34 A), sin embargo, la mayor actividad de lacasa recombinante se obtuvo en clones obtenidos sin la sin etiqueta HIS (250 vs. 70 U·L⁻¹) en un medio suplementado con cobre como control. Es importante aclarar que en estos ensayos no se detectó actividad lacasa en el medio sin cobre en clones con o sin etiqueta HIS (Fig. 34 B).

El clon con mayor actividad lacasa se llamó *K.lactis*GG799/lacI, se seleccionó para continuar con la optimización de la actividad enzimática con otros compuestos en reemplazo del cobre y compatibles con la industria alimentaria como se detalla a continuación.



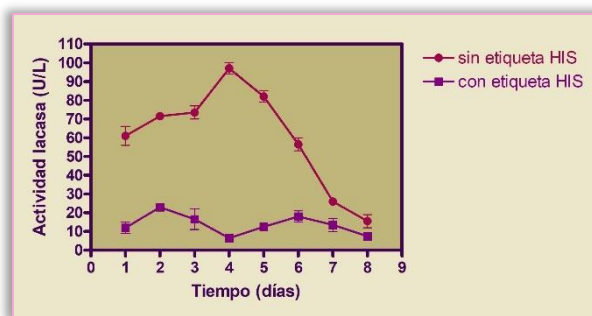


Figura 34: A) Ejemplo de detección de actividad lacasa en placa de YCB conteniendo ABTS y DMP como sustrato. Las zonas verdes y naranja indican la presencia de lacasa. B) Actividad lacasa en YPGal líquido con y sin etiqueta de HIS luego de 8 días de incubación.

3.4.3 Optimización de la producción de la enzima lacasa en *K. lactis* GG799

3.4.3.1 Optimización del inóculo inicial

La mayor actividad de la enzima lacasa se obtuvo partiendo de un inóculo de DO600= 1,8 (265 UL-1). Cuando los inóculos fueron DO600=1,5 y DO600= 3, la actividad lacasa disminuyó, obteniéndose 195 UL-1 y 147 UL-1 respectivamente (Fig. 35).

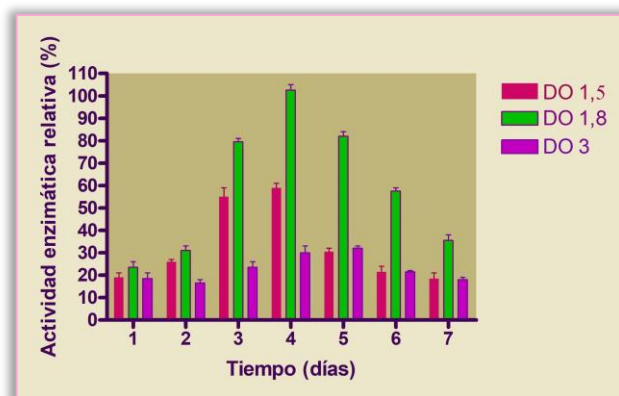


Figura 35: Actividad enzimática de los cultivos cuyas DO iniciales fueron 1,5, 1,8 y 3. El 100 % de actividad corresponde a 265 UL⁻¹

3.4.3.2 Optimización de la temperatura de crecimiento

La temperatura óptima de crecimiento fue de 28 °C; a esta temperatura, la levadura *K.lactis*GG799/lacI secretó 289 UL-1 de la enzima lacasa. Por su parte, el cultivo a temperaturas inferiores y superiores (26° y 30 °C respectivamente) condujeron a una disminución en la actividad de la enzima. El cultivo a 26°C dio como resultado una actividad de 222 UL-1 mientras que a 30 °C se alcanzó una actividad de 204 UL-1. Estos resultados pueden visualizarse en la Fig. 36.

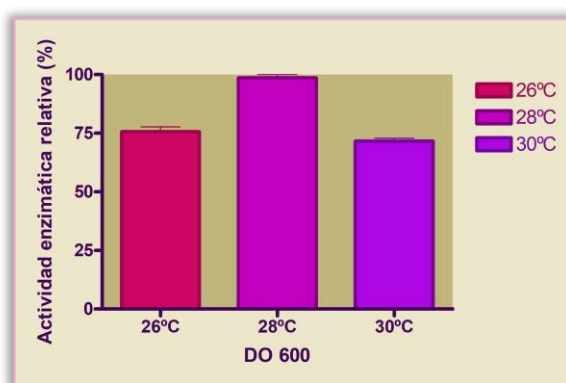


Figura 36: Gráfico de barras correspondiente a la optimización de la temperatura de crecimiento de *K.lactis*GG799/lacI. La máxima actividad lacasa corresponde a 289 UL⁻¹

3.4.3.3 Optimización del medio mediante el agregado de compuestos

Sulfato de amonio, cloruro de zinc, cloruro de potasio, surfactante tween, carbonato de calcio, cloruro de hierro y sulfato de hierro, en concentraciones de 0,5 a 1,5 mM se agregaron al medio para luego evaluar la actividad lacasa. Mediante el agregado de surfactante Tween, cloruro de potasio, cloruro de zinc y sulfato de amonio, se obtuvieron los niveles más bajos de actividad lacasa (190, 205, 219 y 228 UL-1, respectivamente, Fig. 37 A).

El carbonato de calcio 0,5 mM, aumentó la actividad de lacasa el sexto día de incubación, alcanzando un pico de 436 UL-1. La actividad enzimática disminuyó con concentraciones más altas de este compuesto (Figura 37 B).

La presencia de cloruro de hierro 1,5 mM aumentó la actividad lacasa, resultando en un máximo de 520 UL–1 en el quinto día de incubación. Concentraciones más bajas de cloruro de hierro disminuyeron la actividad lacasa (Figura 37 C).

El sulfato de hierro 1 mM aumentó la actividad de lacasa. La máxima actividad lacasa se observó al cuarto día de incubación. Concentraciones menores y mayores de 1 mM de sulfato de hierro disminuyeron la producción de la enzima (Figura 37 D). Como la mayor actividad se obtuvo con sulfato de hierro, se probaron concentraciones de hasta 3 mM, pero la mayor producción se logró previamente, a una concentración de 1 mM, cuando la actividad de lacasa alcanzó un pico de 890 UL–1. En los controles sin adición de compuestos no se encontró actividad lacasa.

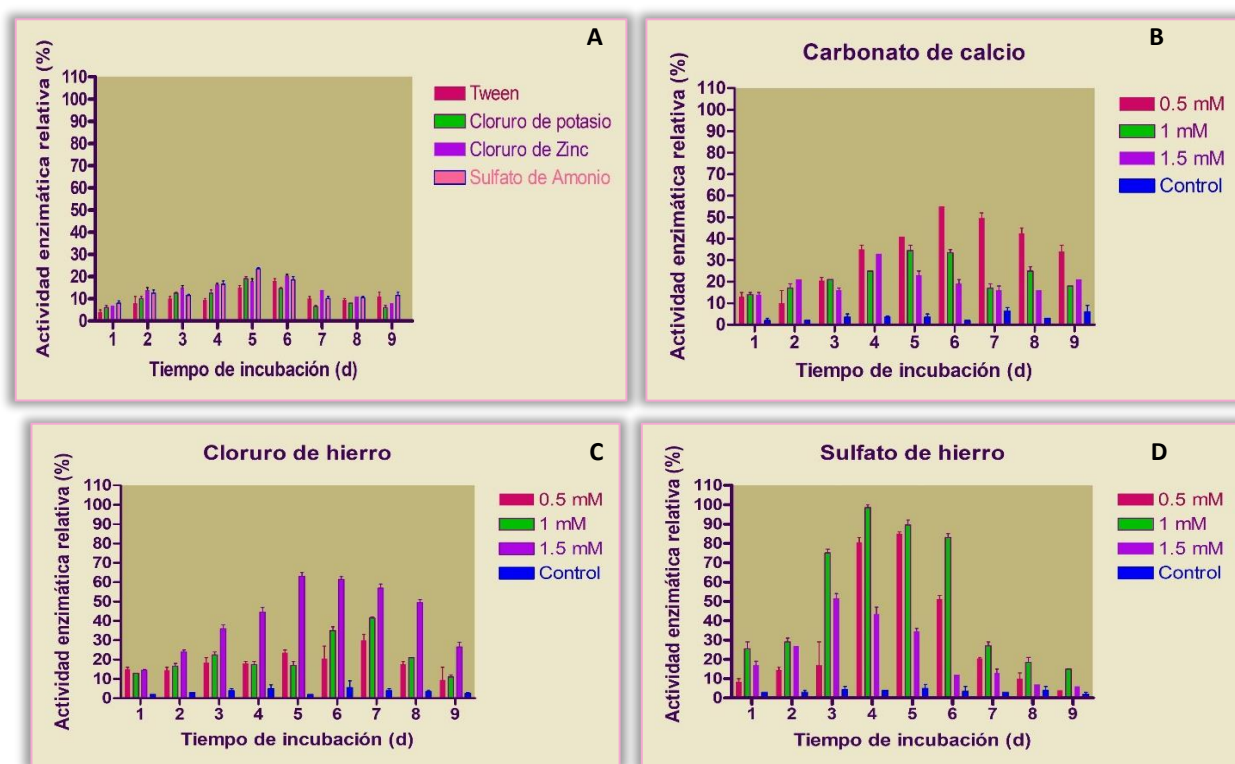


Figura 37: Influencia de diferentes concentraciones de compuestos sobre la actividad lacasa durante 9 días de incubación. A) Tween, cloruro de potasio, cloruro de zinc y sulfato de amonio. B) Carbonato de calcio, C) Cloruro de hierro D) Sulfato de hierro. El 100% de actividad lacasa corresponde a 890 U L⁻¹

3.4.4 Caracterización de la actividad lacasa recombinante presente en el sobrenadante

En el análisis del zimograma de la Fig. 38, con los días 2, 4, 6 y 8 de cultivo suplementados con 1M de sulfato de hierro, se pueden ver bandas con diferente intensidad, consistente con la actividad lacasa reportada para dichos días.



Figura 38: Zimograma revelado con DMP. Sobrenadante de cultivo en medio YPGal suplementado con Sulfato de hierro 1 mM correspondiente a los días 2, 4, 6 y 8 con mayor actividad lacasa.

El pH óptimo del extracto enzimático fue 3,6 (Fig. 39 A) mientras que la temperatura óptima fue 40 °C (Fig. 39 B). El extracto enzimático retuvo el 100 % de su actividad después de 1 h de incubación a 40 °C y el 95 % de actividad luego de 2 h (Fig. 39 C). Además, conservó el 100% de su actividad luego de 1 h de incubación a pH 3,6 (Fig. 39 D).

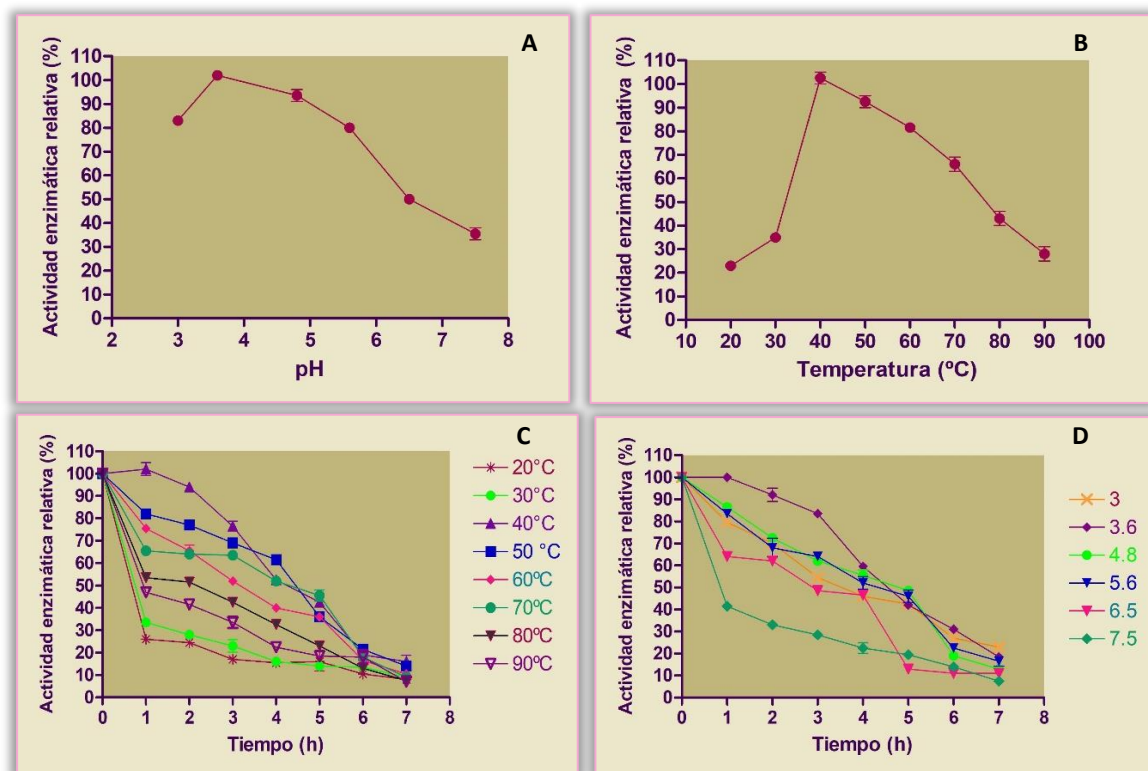


Figura 39: Efectos del pH y la temperatura sobre la actividad lacasa en el extracto enzimático (Fig. A y B). Efectos de temperatura y pH sobre la estabilidad lacasa en el extracto enzimático (Fig. C y D). El 100% de actividad enzimática corresponde a 890 U L^{-1} . Estos ensayos fueron realizados a 60°C (Fig. 39 A y D) y a pH 4,8 (Fig. 39 B y C).

SECCIÓN III: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LACASA

RECOMBINANTE

3.4.5 Purificación de la enzima lacasa

Se utilizó el cultivo de lacasa de *K. lactis* recombinante crecido en medio YPGal, partiendo de un inóculo inicial con DO600 = 1.8, cultivado a 28 °C y suplementado con 1 mM L-1 de sulfato de hierro (condiciones que mostraron resultados prometedores en cuanto a obtener un perfil proteico máximo, obtenido después de 4 días de crecimiento). Las siguientes determinaciones se realizaron utilizando la fracción de lacasa purificada.

3.4.6 Análisis electroforético y detección de la enzima lacasa

El SDS-PAGE con tinción con AgNO₃ reveló una única banda, indicando la purificación a homogeneidad, siendo la masa molecular de la proteína de aproximadamente 180 kDa (Fig. 40 A). La actividad de la enzima purificada también se evidenció por zimografía (Figura 40 B).

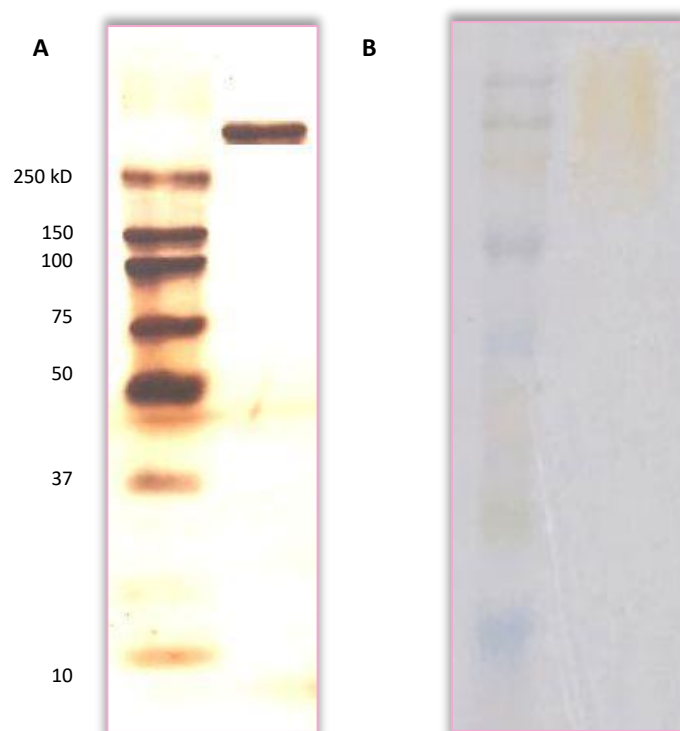
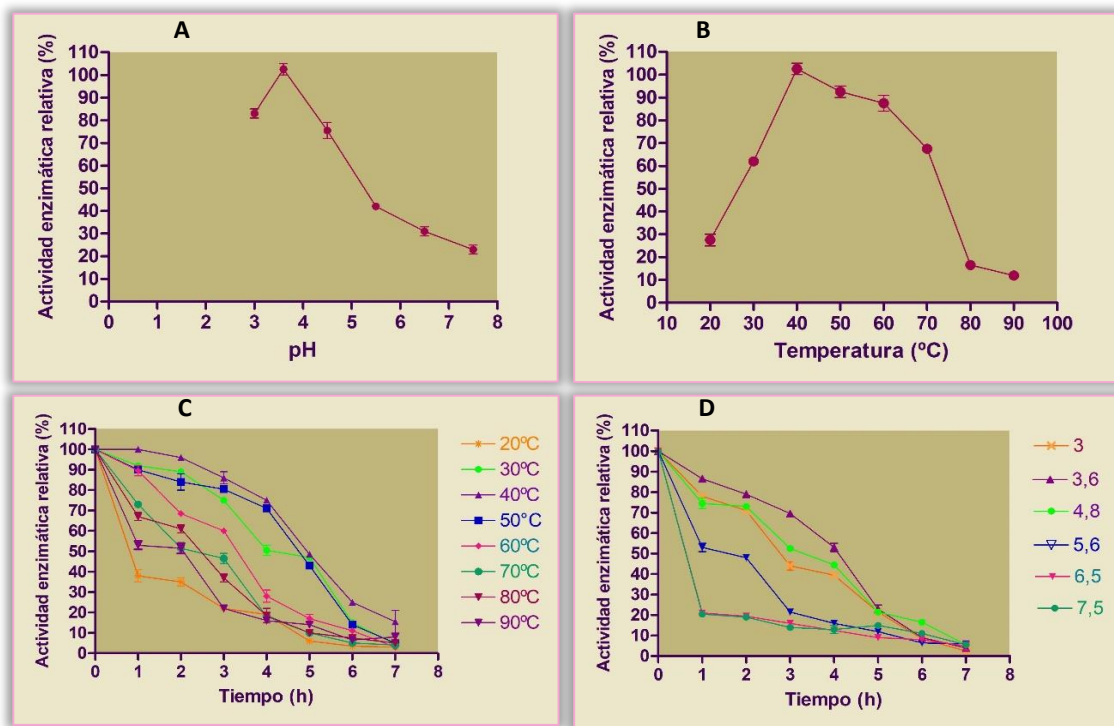


Figura 40: Estimación del peso molecular de la enzima lacasa purificada. A) SDS/Page Plata. B) Se sembraron 20 μg de proteínas/pocillo para cada condición evaluada, utilizando geles al 7,5% p/v ND-PAGE los que luego se incubaron con DMP Zimograma revelado con DMP. Carril 1: MP. Carril 2: lacasa recombinante. Se sembraron 5 mg mL^{-1} de proteína.

3.4.7 pH y temperatura óptimos, estabilidad enzimática

El pH óptimo de la enzima fue 3,6. La temperatura óptima fue 40 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 41 A). La enzima retuvo el 88 % de su actividad después de 1 h de incubación a un valor de pH de 3,6 (Fig. 41 B). La lacasa retuvo el 98 % de su actividad después de 60 min de incubación a 40 $^{\circ}\text{C}$ y el 90 % de su actividad después de 60 min de incubación a 30 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 41 C). Además, conservó el 88% de actividad luego de una hora de incubación a pH 3,6 (Fig. 41 D).



3.4.8 Análisis de datos cinéticos

3.4.8.1 Obtención de K_M y V_{MAX}

Los principales parámetros cinéticos de la lacasa se analizaron utilizando DMP y ABTS como sustratos. El poder oxidante de la enzima purificada para los sustratos en orden decreciente fue: ABTS > DMP. Como se muestra en la Tabla 4, la V_{MAX} más alta se encontró en ABTS, mientras que la K_M más baja ocurrió en DMP. La actividad de lacasa fue mayor con ABTS que con DMP.

Tabla 4: *Parámetros cinéticos calculados para la enzima lacasa purificada. Determinación de K_M y V_{MAX} en función de la tasa de hidrólisis de DMP y ABTS a concentraciones que variaron de 0,05 a 5 Mm. 100% de actividad lacasa corresponde a 1289 U L^{-1}*

Porcentaje de actividad Lac		KM (mg/mL)		V _{MAX} (μmol/min/mg)	
ABTS	DMP	ABTS	DMP	ABTS	DMP
100% ± 1%	89% ± 1%	0.247	0.212	51.48	43.97

3.5 DISCUSIÓN

3.5.1 SECCIÓN I: OBTENCIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE UNA LACASA DE *Phlebia brevispora* BAFC 633

En los últimos años, la lacasa ha sido identificada como una enzima empleada industrialmente con varios propósitos dentro de las industrias alimentaria, textil, papelera, en procesos de biorremediación y descontaminación de aguas residuales, para producción de compuestos aromáticos de alto valor, entre otras (Mayolo-Deloisa y col., 2020).

Muchas lacasas fúngicas son oxidasas de cobre azul (Desai y Nityanand, 2011) y, debido a que las secuencias de nucleótidos de las regiones de unión al cobre están muy conservadas, se han utilizado con frecuencia para diseñar cebadores de PCR para clonar fragmentos de genes de lacasa en varios basidiomicetos (D'Souza y col., 1996). Los resultados obtenidos por el grupo (Fonseca y col., 2018) y el presente trabajo, muestran la efectividad del diseño de cebadores específicos para amplificar correctamente el gen de lacasa de *P. brevispora* BAFC 633, ya que los cebadores diseñados permitieron la amplificación exitosa de los fragmentos de ADN codificante, obteniéndose fragmentos de ADN de alta calidad.

SECCIÓN II: OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ENZIMA LACASA RECOMBINANTE EN LA LEVADURA *GRAS K. lactis* GG799

Según Akpinar y Urek, (2017) los hongos de pudrición blanca son los microorganismos más eficientes en cuanto a la producción de lacasas. Sin embargo, la gran mayoría de las lacasas, son producidas en bajas cantidades por los hongos nativos. Asimismo, múltiples isoenzimas de lacasas han sido reportadas en varias especies fúngicas, haciendo difícil el estudio de las enzimas individuales (Fonseca y col., 2018). Todos estos problemas pueden ser superados expresando los genes correspondientes en un huésped heterólogo.

Hay sistemas diseñados para realizar la expresión heteróloga en procariotas y en eucariotas como levaduras, hongos y células animales. Como las lacasas son mayoritariamente producidas por organismos eucariotas, sería más factible expresarlas en sistemas eucariotas que tienen la capacidad de realizar modificaciones post- transcripcionales, como glicosilación y plegamiento, necesarias para la actividad de la enzima (Preethi y col., 2020). En las células animales el rendimiento de producción es demasiado bajo, por lo que la alternativa más prometedora es la expresión en levaduras o en hongos filamentosos.

El sistema recombinante que utiliza *K. lactis* GG799 como hospedero, presenta propiedades ventajosas en comparación con otras levaduras, que incluyen su gran capacidad secretora, sus excelentes características de la fermentación a gran escala, sumado a la disponibilidad de vectores eficientes de expresión e integración (Spohner y col., 2016).

La expresión de lacasa recombinante en levaduras ha sido estudiada variando diferentes parámetros obteniendo diversos resultados (Piscitelli y col., 2010). En este sentido,

para lograr una mayor expresión y actividad enzimática, es recomendable utilizar estrategias como el uso de promotores nativos y múltiples copias de genes, la optimización de los codones, la modificación de las secuencias de las señales de secreción y la optimización de las condiciones de cultivo (Erden y Karaoğlu, 2023). En el presente estudio, para expresar la enzima lacasa en *K. lactis* GG799, se utilizó un plásmido de expresión controlado por el promotor PLAC4-PBI, el cual está estrictamente regulado, y en conjunción con la secuencia señal del péptido señal del factor α -MF de *S. cerevisiae* para dirigir la secreción de la proteína recombinante. Fonseca y col., (2018) clonaron la lacasa (JQ728448.1) del WRF *P. brevispora* BAFC 633 en *Pichia pastoris*, en dicho trabajo el gen clonado usando el péptido señal del factor de apareamiento de *Saccharomyces cerevisiae* fue más eficiente para dirigir la secreción de la proteína recombinante que el péptido señal nativo. Asimismo, en el presente trabajo, en la levadura *K. lactis* este péptido señal condujo la secreción de la lacasa al medio extracelular. En otras investigaciones, para obtener proteínas recombinantes, se utilizaron péptidos señal de lacasa nativa y de levadura (factor α de *S. cerevisiae* o invertasa; toxina asesina de *K. lactis*; *Y. lipolytica* XPR2) obteniendo resultados variables según el tipo de enzima (Preethi y col., 2023). Según Piscitelli y col., (2010) no parece ser posible predecir de antemano que péptido señal producirá mejores resultados en la expresión de lacasas recombinantes en levaduras.

La inclusión de etiquetas de His se usan habitualmente para facilitar el proceso de purificación. Muchas proteínas se purificaron con éxito teniendo etiquetas His en sistemas de expresión de levadura (Pina y col., 2014), sin embargo, en este trabajo, se observó una menor producción de actividad lacasa en cultivos de medio extracelular conteniendo dicha etiqueta. Köppl y col. (2022) han informado que la posición de la etiqueta de polihistidina puede afectar algunas propiedades de las proteínas. En base a estos resultados, podemos decir que, más de seis etiquetas His en la región amino, interfirieron con la actividad lacasa. En concordancia con

nuestros resultados, Fonseca y col. (2018) obtuvieron niveles similares de actividad lacasa, al expresarla en *Pichia pastoris* utilizando cebadores que contenían la etiqueta His.

3.5.1.1 Optimización del medio para la producción de la enzima lacasa en *K. lactis* GG799

Debido a que las condiciones de cultivo son cruciales para la producción de ciertas enzimas, la optimización del medio se ha convertido en una de las principales formas de mejorar la producción enzimática (Bagewadi y col., 2017). Algunas proteínas sólo se expresan en presencia de sustancias inductoras o bajo situaciones de estrés. Por esta razón, la optimización del medio es una alternativa de gran interés en la generación de proteínas. Se evaluó el efecto del cobre porque es sabido que aumenta la actividad lacasa. Sin embargo, debido a que la presente tesis se centra en la elaboración de panificados con enzimas recombinantes, se analizaron compuestos compatibles con la industria alimentaria para reemplazar el cobre y obtener una enzima con actividad.

3.5.1.1.1 Optimización del inóculo inicial

Como el inóculo juega un papel importante en la producción de enzimas, se analizó su efecto sobre la actividad lacasa. La mayor producción de lacasas se obtuvo a partir de un inóculo de $DO_{600} = 1,8$. Disminuir y aumentar el inóculo inicial de DO_{600} condujo a una disminución en la actividad. Estos resultados indican que existe una relación entre el valor de densidad óptica del inóculo y la actividad de la enzima lacasa. Podemos pensar que esta disminución con valores de DO_{600} más bajos y más altos, podría deberse a una menor disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo o bien a que una alta densidad celular podría promover la producción de sustancias inhibitorias para la actividad de la enzima.

Chmelová y col. (2022) informaron que un nivel más bajo de inóculo puede no ser suficiente para iniciar el crecimiento, mientras que un nivel más alto puede causar una inhibición competitiva. En este sentido, una menor cantidad de células podría resultar en una producción reducida de lacasa, y, por lo tanto, en una menor actividad enzimática.

3.5.1.1.2 Optimización de la temperatura de crecimiento de la levadura *K. lactis*

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, el cultivo de *K.lactis* GG799/lacI a temperaturas más bajas y más altas de 28 °C, llevó a una disminución en la actividad de lacasa. Estos hallazgos son consistentes con un estudio previo realizado por Patel y col., (2009), quienes también reportaron una disminución en la actividad de lacasa a temperaturas más bajas. Sin embargo, es interesante destacar que Nieter y col. (2016) reportaron resultados opuestos, ya que observaron un aumento en la actividad de lacasa al disminuir la temperatura de cultivo en *P. pastoris*. Esto indica que la respuesta de la actividad de lacasa a las temperaturas de cultivo puede variar entre diferentes enzimas, sistemas y especies. Además, Raimondi y col. (2013) obtuvieron un alto rendimiento de una proteína recombinante a 30 °C en *Kluyveromyces marxianus*. Esto sugiere que, aunque la actividad de lacasa pueda disminuir a temperaturas más altas para *K.lactis* GG799/lacI, otros procesos metabólicos o la expresión de otras proteínas recombinantes, pueden verse favorecidos a estas temperaturas.

3.5.1.1.3 Optimización del medio mediante el agregado de compuestos

Una variedad de compuestos se ha utilizado como inductores para estimular la producción de lacasas (Akpınar y col., 2017, Molina y col., 2023). Como la actividad de la lacasa no fue evidente en medio YPGal, se testeó el efecto del cobre porque, al ser parte del sitio

activo de la enzima es el metal más reportado en su estudio (Callejón y col., 2017; Fonseca y col., 2018; Tülek y col., 2020). De esta manera, se evaluó el efecto de varios compuestos químicos en la actividad lacasa, con el objetivo de reemplazar el cobre y optimizar el medio de cultivo para mejorar su producción.

El sulfato de amonio, cloruro de zinc, cloruro de potasio y surfactante Tween 80 no tuvieron un efecto significativo sobre la actividad lacasa. Según los resultados obtenidos, estos compuestos no podrían ser utilizados para potenciar la producción de la enzima lacasa. En investigaciones realizadas con enzimas lacasas purificadas, zinc, potasio y amonio se comportaron como inhibidores de la actividad (Bao y col., 2013) mientras que, al igual que los hallazgos obtenidos en el presente trabajo, Li y col., (2013) encontraron que el amonio y el zinc no tenían un efecto significativo sobre la actividad de la lacasa recombinante.

El suplemento con una concentración de carbonato de calcio de 0,5 mM aumentó la actividad de la enzima. Este hallazgo sugiere que el carbonato de calcio podría tener un efecto estimulante sobre la actividad de lacasa. Del mismo modo, Crowe y Olsson (2001) informaron que el calcio es un segundo mensajero que puede activar diferentes vías de transducción de señales. Sin embargo, también se observó que, a concentraciones más altas de carbonato de calcio, la actividad de la enzima disminuyó. Este patrón no lineal en la respuesta de la actividad de lacasa al carbonato de calcio indica la existencia de un punto óptimo de concentración, más allá del cual el exceso de carbonato de calcio tiene un efecto inhibitorio sobre la enzima.

El sulfato de hierro 1 mM fue el compuesto que permitió obtener los mejores niveles de actividad lacasa en comparación con los otros evaluados. Sin embargo, concentraciones de 0,5 y 1,5 mM de sulfato de hierro, resultaron en una disminución en la producción de la enzima. Estos resultados sugieren que existe una concentración óptima de sulfato de hierro

que maximiza la actividad de lacasa. Esta concentración óptima puede estar relacionada con la capacidad de este compuesto para facilitar la síntesis y secreción de la enzima.

El cloruro de hierro aumentó la actividad de lacasa, pero en menor medida que el sulfato de hierro. Esto sugiere que el hierro en alguna forma es esencial para la actividad de la enzima, ya que ambos compuestos contienen este elemento. Para Murugesan y col. (2009), la efectividad del hierro en aumentar la actividad lacasa puede deberse a la interacción de este metal con el sistema de transporte de electrones de la lacasa. En este sentido podemos decir que la diferencia en la actividad lacasa entre los compuestos se debió a las diferentes estructuras químicas que tiene la enzima en presencia de sulfato y cloruro, afectando el plegamiento de la enzima y su desempeño para formar complejos. Al testear concentraciones más bajas de cloruro de hierro, también se observó una disminución en la actividad de lacasa, lo que indica del mismo modo la existencia de una concentración óptima para este compuesto.

Sin embargo, los efectos de diferentes compuestos sobre la actividad de lacasa no siempre son los mismos ya que Bao y col. (2013) también reportaron al hierro como inhibidor y al Tween como inductor de lacasa recombinante. Tülek y col. (2020) demostraron que altas concentraciones de hierro inhibieron significativamente la actividad de la lacasa, mientras que el zinc y el magnesio provocaron un aumento en la actividad de la lacasa, y Li y col. (2013) afirmaron que una enzima recombinante se inactiva completamente con hierro, lo que es opuesto a los resultados obtenidos en el presente trabajo.

En este sentido se puede decir que las diferencias en la actividad lacasa obtenidas con cada compuesto podrían deberse a la diferencia en las estructuras químicas, lo que afecta el plegamiento de la lacasa y aumenta o disminuye significativamente la actividad de la enzima.

Estas observaciones también pueden atribuirse a interacciones variables dentro de la compleja estructura espacial de la proteína, que pueden afectar las propiedades catalíticas de la lacasa de manera impredecible. Por lo tanto, un mayor estudio de las propiedades de las lacasas es esencial para una comprensión más profunda de la función de las lacasas fúngicas.

Por su parte, se encontró que la actividad de lacasa alcanzó su punto máximo diferentes días de incubación de acuerdo al compuesto testado. Esto sugiere que existe un período óptimo de tiempo en el cual la enzima tiene la mayor actividad. Por lo tanto, es importante optimizar el medio cultivo y el tiempo de producción para cada sistema de expresión ya que no se pueden predecir a priori que concentraciones óptimas de los compuestos y la duración del cultivo influye en la productividad y eficiencia.

En cuanto a la caracterización enzimática del extracto y la enzima purificada, se observó que el pH óptimo del extracto enzimático coincidió con el pH óptimo de la enzima pura, en un valor de 3,6. Esta correspondencia sugiere que el entorno de la enzima en el extracto es preservado en su entorno nativo, lo que es valioso para aplicaciones biotecnológicas que requieran un rango específico de pH para su funcionamiento eficiente. Esta observación refuerza la consistencia y estabilidad del extracto enzimático en condiciones de acidez.

Respectivo a la temperatura óptima, tanto el extracto enzimático como la enzima purificada mostraron similitud, indicando que el proceso de extracción y purificación no comprometió la estructura tridimensional y la actividad de la enzima. Además, la retención del 100 % de la actividad en el extracto enzimático después de una hora de incubación a 40 °C destaca su capacidad para soportar el estrés térmico inicial, lo que es de gran interés para aplicaciones industriales que requieran operaciones a temperaturas elevadas. El extracto

enzimático demostró una notable conservación de actividad, reteniendo el 95 % de su actividad después de dos horas de incubación a 40 °C. Esta retención significativa de actividad a temperaturas relativamente altas es promisoría para procesos prolongados que involucren la enzima en sistemas biotecnológicos.

En comparación, la enzima purificada mantuvo el 88 % de su actividad después de una hora de incubación a pH 3,6, lo que, aunque ligeramente inferior en comparación con el extracto enzimático, aún representa una retención significativa de actividad en un entorno ácido. Asimismo, la enzima purificada demostró una destacable estabilidad a 40 °C, reteniendo el 98 % de su actividad después de una hora de incubación, lo que sugiere que la purificación no comprometió su tolerancia térmica.

Los resultados obtenidos de la caracterización del extracto enzimático y la enzima purificada, proporcionan una comprensión detallada de sus propiedades bioquímicas y estabilidad en diferentes condiciones. Estos resultados respaldan la potencial aplicación de la enzima en diversas industrias biotecnológicas, donde las propiedades de pH y temperatura son cruciales para el diseño y la optimización de procesos enzimáticos eficientes y sostenibles.

3.5.2 SECCIÓN III: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LACASA RECOMBINANTE

3.5.2.1 Peso molecular

Fonseca y col., (2018) predijeron que esta lacasa tiene un peso molecular de 60 kDa cuando es secretada por el hongo *P. brevisopora* BAFC 633 (Fonseca y col., 2013, 2015). Sin embargo, esta lacasa expresada en *K. lactis* GG799 y purificada tuvo un peso molecular de 180 kDa aproximadamente. Según Bertrand y col., (2015) y Maestre-Reyna y col., (2015), este aumento en el peso molecular puede ser explicado por modificaciones post- traduccionales. En concordancia con estos resultados, Fonseca y col., (2018), obtuvieron esta lacasa recombinante en *Pichia pastoris* GS115 y mostró un alto peso molecular, que fue atribuido a la hiper- glicosilación de la enzima.

3.5.2.2 Caracterización bioquímica de lacasa

Muchas lacasas fúngicas exhiben pH óptimo en un rango ácido que depende del sustrato, valores de pH entre 2 y 5 para ABTS y entre 3 y 8 para DMP (Baldrian, 2006). En este trabajo se determinó que el pH óptimo para la enzima fue 4, y la temperatura óptima 40 °C. Por su parte, la enzima lacasa estudiada en este trabajo mostró alta estabilidad a pHs 4, 3,6; 3 y 4,5. En este sentido, se han reportado en la literatura lacasas que, aunque tengan valores de pHs óptimos muy ácidos, son muy estables en un rango de pH entre 3 y 10 (Muñoz y col., 1997). Estos resultados concuerdan con la literatura, ya que los parámetros bioquímicos de la lacasa recombinante purificada revelaron características similares a las de muchas otras lacasas recombinantes, con un rango de temperatura óptimo entre 30 y 50 °C y un rango de pH óptimo de 3,0– 4,5 (Huo y col., 2015; Fonseca y col., 2018; Li y col., 2013, Tülek y col., 2020).

En lo que respecta a la estabilidad enzimática, la lacasa fue más estable a partir de los 40 °C. En este sentido la estabilidad enzimática es una característica deseada a la hora de producir enzimas a escala comercial y de suma importancia para la aplicación industrial (Fonseca y col., 2014).

De esta manera, la enzima obtenida mediante ingeniería genética y expresada de manera recombinante muestra características promisorias según los resultados de la caracterización enzimática, lo que sugiere su robustez y versatilidad para diversas aplicaciones industriales. Estos resultados preliminares abren la puerta a futuras investigaciones y aplicaciones que podrían tener un impacto significativo en la producción y procesamiento de diversos productos.

3.5.2.3 Estudios de cinética, especificidad de sustrato e inhibición


La mayoría de las lacasas conocidas muestran alta afinidad e índice catalítico por el ABTS (Fonseca y col., 2018, Gutiérrez y col 2023, Hahn y col., 2023). Tal como ocurrió en el presente trabajo, la oxidación del DMP por la enzima lacasa purificada suele ser considerablemente menor que con el ABTS y las respectivas KM más altas (Baldrian, 2006). Asimismo, que la actividad lacasa sea mayor con ABTS que con DMP, es típico de las lacasas y refleja los diferentes mecanismos de oxidación que dependen del sustrato (Bao y col., 2013). En este sentido, es sabido que sustituyentes aceptores de electrones reducen la densidad de electrones en el grupo fenoxilo, el cual es necesario para transferir electrones entre el sustrato y el sitio T1-cobre de la lacasa, haciendo así más difícil su oxidación (Xu, 1996).

3.6 CONCLUSIONES

Partiendo de la secuencia génica que codifica para una lacasa en el hongo de pudrición blanca *P. brevispora* BAFC 633, fue posible diseñar cebadores y amplificar la región de interés con un ORF de 1500 pb.

La expresión heteróloga del gen de lacasa fúngica del hongo de pudrición blanca se realizó con éxito en *K. lactis* GG799. Estos resultados confirman que el sistema de expresión recombinante en *K. lactis* fue apropiado para producir la enzima lacasa de manera heteróloga. El uso de sulfato de hierro a una concentración de 1 mM condujo a una actividad lacasa óptima (890 U L^{-1}) en el cuarto día de incubación.

La lacasa purificada a homogeneidad presentó un peso molecular de 180 kDa. El pH óptimo para la enzima fue 4 y la temperatura óptima fue de 40°C . La lacasa exhibió alta estabilidad a bajo pH y alta temperatura. Las características bioquímicas exhibidas son convenientes para que la enzima sea utilizada en las etapas subsiguientes del presente trabajo.



Capítulo IV

ELABORACIÓN DE PANIFICADOS CON LAS ENZIMAS XILANASA Y LACASA RECOMBINANTES



4 CAPÍTULO IV: ELABORACIÓN DE PANIFICADOS CON LAS ENZIMAS XILANASA Y LACASA RECOMBINANTES

4.1 INTRODUCCIÓN

En el área de la industria alimentaria, el desarrollo de un nuevo producto comienza con la creación de varios prototipos, los cuales son ajustados de acuerdo a los requerimientos establecidos por las áreas de mercadeo y ejecutiva. Estos prototipos deben ser descritos en conjunción con características específicas que permitan su escalamiento, producción y control de calidad (Valentas y col., 2020).

Pese a los avances en la medición objetiva de algunas características de un producto, la determinación de la calidad de estos todavía depende en gran medida de evaluaciones subjetivas realizadas por expertos. Esto se debe a las dificultades asociadas a la medición instrumental de algunas características altamente personales (Cauvain y Young, 2007).

Con el fin de llevar a cabo una caracterización objetiva, existen varias pruebas cuantitativas (físicas, químicas y texturales) y semi cuantitativas (sensoriales). Estas pruebas buscan evaluar tanto las propiedades externas como internas del producto. Las propiedades externas, como el color y el volumen, están asociadas a la primera interacción con el consumidor (atracción), mientras que las propiedades internas, como el sabor y la textura, determinarán la repetibilidad en el consumo del producto (Valentas y col., 2020). La elección del tipo de prueba y la frecuencia de realización depende del criterio del elaborador. Se recomienda que éstas se realicen al menos una vez, especialmente en las etapas de desarrollo de un nuevo producto.

En lo que respecta a las características de los panificados, los consumidores buscan en su mayoría, una corteza crujiente, una miga esponjosa y bien desarrollada, un sabor rico y equilibrado, así como una buena durabilidad. Además, la frescura, el aroma agradable y una presentación visual apetitosa, son aspectos claves que los consumidores valoran en este tipo de productos.

El presente capítulo abordará las propiedades físicas, químicas, texturales y sensoriales de panificados elaborados utilizando las enzimas xilanasa y lacasa recombinantes obtenidas a partir de *T. atroviride* y *P. brevispora* respectivamente.

4.1.1 Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los panificados:

4.1.1.1 Peso, dimensiones y volumen

La calidad del pan depende de las propiedades de las materias primas y de los parámetros tecnológicos aplicados en el proceso de producción. La evaluación de la calidad del pan hace uso de determinaciones de sus propiedades físicas y entre las que se examinan con mayor frecuencia figuran el peso, el peso específico (densidad real) y el volumen del pan (Różyło y Laskowski 2011). La determinación del peso es importante tanto por cuestiones de producción y tamaño de porción. La medición de las dimensiones se puede hacer utilizando métodos fuera de la línea, con reglas o cintas métricas, o en línea por medio de análisis de imágenes.

Para la determinación del volumen, el método más empleado es el de desplazamiento de semillas. Usualmente se utiliza un contenedor de volumen conocido, previamente calibrado con un tipo de semilla adecuado, generalmente de sésamo o cebada (Jiamyangyuen y col., 2005), en el cual el producto es introducido. Las semillas son reintroducidas, se coloca el producto y se desplaza un volumen de semillas equivalente a su propio volumen. Es

importante mantener calibrado el aparato con un objeto de volumen conocido, debido a que la densidad aparente de las semillas puede cambiar por la fricción que ocurre durante su uso (Cauvain y Young 2007).

4.1.1.2 Color

El color es un atributo de la percepción visual que se compone de la combinación de elementos cromáticos y acromáticos. Es un fenómeno fisicoquímico que se produce debido a que los materiales iluminados absorben una parte de las ondas electromagnéticas y reflejan las restantes (Markovic y col., 2011).

El control del color de la corteza en productos panificados ha sido tradicionalmente relegado al juicio personal y experiencia. Sin embargo, este juicio es afectado por la subjetividad y efectos fisiológicos relativos a la visión del individuo ya ésta se deteriora con la edad. Existen, además, grados de ceguera al color, innatos y particulares para cada persona. También los factores externos como la fatiga o condiciones de iluminación, pueden afectar la percepción del color. Esto combinado con la influencia geo-étnica sobre el color de la corteza de varios productos, resulta en un problema altamente intangible para definir el color de la corteza.

Comprender los cambios que ocurren en el color de los alimentos es esencial para desarrollar estrategias efectivas de control de calidad y para garantizar la satisfacción de los consumidores (El-Sohaimy y col., 2019). En este sentido, el color de la corteza es comúnmente evaluado usando técnicas descriptivas. Se pueden usar métodos objetivos en base a la comparación con cartas de color estándar, tales como el sistema Munsell o bien, medidos con instrumentos basados en el sistema triestímulo (Mathias-Rettig, K., y Ah-Hen 2014).

4.1.1.2.1 Colorímetro

Uno de los principales instrumentos utilizados para caracterizar el color de un alimento es el colorímetro, un dispositivo que permite la medición del color de forma objetiva. Funciona enviando un haz de luz sobre el objeto, en donde parte del espectro es absorbido y el resto es reflejado hacia un detector para calcular un valor cuantitativo para las coordenadas de color, que dependerán del modelo o espacio de color utilizado (Chiluiza y col., 2011). El objetivo de un modelo de color es facilitar la especificación de los colores de una forma normalizada y aceptada genéricamente.

Los espacios de color son la especificación de un sistema de coordenadas tridimensional y de un subespacio de este sistema en el que cada color se encuentra representado por un único punto (Markovic y col., 2013).

Aunque existen muchos espacios de color diferentes, cuando se trata de alimentos, el más utilizado es el espacio de color CIE $L^*a^*b^*$ (Fig. 42), debido a su distribución uniforme del color y a que su percepción del color es la más cercana a la del ojo humano.

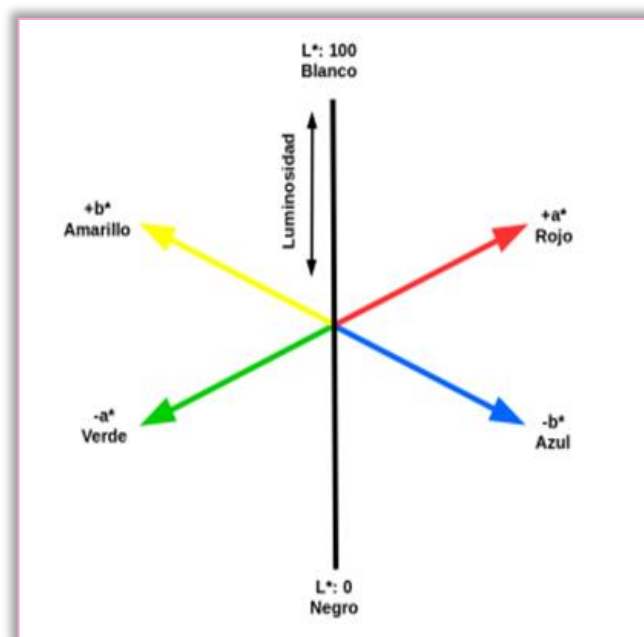


Figura 42: *Espacio de color CIE $L^*a^*b^*$. Tomada de Miranda (2018).*

Este sistema define un espacio cartesiano en que L^* es la claridad o luminosidad, en un rango que va desde 0 (negro) a 100 (blanco). El parámetro a^* define a los componentes rojo – verde, siendo rojo para valores positivos y verde para valores negativos. El parámetro b^* define el componente amarillo – azul, siendo amarillo para valores positivos y azul para valores negativos. A partir de los mencionados parámetros se calculan el tono (hue) y la saturación (chroma) que son parámetros que permiten caracterizar el producto por su coloración.

Uno de los principales cambios de color en el pan se debe a la reacción de Maillard, que consiste en una serie de reacciones químicas entre aminoácidos y azúcares reductores que se producen durante el procesamiento térmico de los alimentos. Estas reacciones pueden resultar no sólo en cambios en el color del producto final, sino también en la formación de compuestos con aroma y sabor agradables. El índice de pardeamiento (BI), es un parámetro ampliamente estudiado para evaluar la reacción de Maillard en los alimentos (Ali y col., 2016).

Otro parámetro importante a tener en cuenta en la colorimetría es la diferencia total de color, que permite cuantificar los cambios absolutos en el color de los alimentos luego de un tratamiento, a lo largo del tiempo, tomando un valor de referencia. Este parámetro se calcula comparando los valores de los componentes de color tomando un valor de referencia que pueden ser las mediciones efectuadas antes del tratamiento o al inicio de un período de almacenamiento. La diferencia total de color juega un papel crucial en la evaluación de la estabilidad del color de los alimentos y su capacidad para resistir los cambios de tonalidad no deseados.

4.1.1.3 Humedad

El contenido de humedad tiene un efecto ante la percepción de calidad, donde a mayor contenido de humedad en un alimento, el producto puede ser percibido como de mayor frescura (Cauvain, 2003). El contenido de humedad de la miga y la corteza para productos frescos es significativamente diferente. Se ha reportado que, para panes recién horneados, la humedad de la corteza es de 11% y la miga 34%, relacionándose cada uno de ellos con la percepción de crocancia y suavidad respectivamente. Luego de 48 horas de almacenamiento, estos valores cambian a 16% y 21% para corteza y miga, debido a la migración de agua por el gradiente de humedad que se produce (Lopez, 2013). Por ello, la determinación y control de la humedad es fundamental para prolongar la percepción del producto fresco tanto como sea posible. La medición de humedad se realiza principalmente determinando las pérdidas de peso por secado. Esta se puede realizar colocando la muestra en un horno o estufa de secado a 60 °C durante 2 o 3 h, o bien por calentamiento rápido con un radiador halógeno durante 5 a 15 minutos. Mientras que en el primer método se utiliza un instrumental básico de laboratorio, un horno de secado y una balanza analítica, el segundo requiere de un equipo de mayor complejidad (Mettler Toledo, 2015).

4.1.1.4 Caracterización de las propiedades texturales de los panificados

La textura y palatabilidad son propiedades importantes en los productos de panificación. La textura se entiende como la manifestación sensorial y funcional de las propiedades estructurales, mecánicas y superficiales de los alimentos, que se perciben a través de los sentidos del tacto, el oído y la vista. La textura es, entonces, uno de los atributos primarios que junto con el color, sabor y olor conforman la calidad sensorial de los alimentos (Hleap y Velasco, 2010; Mazumder, 2007).

Por su parte, la Norma Española de Análisis Sensorial sobre Vocabulario define la textura como “el conjunto de propiedades mecánicas, geométricas y de superficie de un producto, perceptibles por los mecano-receptores, los receptores táctiles y en ciertos casos los visuales y los auditivos”. De esta definición de textura se desprenden conceptos importantes.

Primeramente, la textura es una propiedad sensorial y, por lo tanto, sólo un ser humano (o un animal en el caso de la comida para animales) puede percibirla y describirla. Los instrumentos de prueba de textura pueden detectar y cuantificar algunos parámetros físicos, los cuales luego deben interpretarse en términos de percepción sensorial. Además, la textura es un atributo multiparamétrico, no solamente se refiere a ternura o masticabilidad, sino que engloba una gama de características. También la textura deriva de la estructura del alimento, ya sea a nivel molecular, microscópico o macroscópico y puede ser detectada por varios sentidos, siendo los más importantes el tacto y la presión.

De esta manera, la textura es un elemento fundamental en la evaluación de la calidad de los alimentos, ya que puede influir en la aceptación y preferencia del consumidor. Por tanto, su estudio y comprensión son de vital importancia en la industria alimentaria. Por otra parte, el análisis de la textura puede proporcionar información valiosa sobre las características físicas y estructurales de los alimentos, lo que permite optimizar los procesos de producción y mejorar la calidad de los productos. A pesar de los avances realizados en este campo, todavía existen desafíos en la medición y evaluación precisa de la textura, así como en la interpretación de los resultados obtenidos.

4.1.1.4.1 Clasificación de términos texturales

Dado que la textura representa un atributo con múltiples parámetros, se requiere la medición de cada uno de estos para describirla adecuadamente. En este sentido, existen clasificaciones que incluyen alimentos sólidos y semisólidos, tales como los que se muestran en la Tabla 5 que son de interés para un producto panario Surmacka Szczesniak 2002).

Tabla 5: Clasificación de las características texturales (Surmacka Szczesniak 2002)

Características mecánicas		
Parámetros primarios	Parámetros secundarios	Términos comunes
Dureza		Suave- Firme- Duro
Cohesión	Fragilidad	Se desmiga- Crujiente- Frágil
	Masticabilidad	Blando- Duro
	Pegajosidad	Harinoso- Gomoso
Viscosidad		Fino- Viscoso
Elasticidad		Plástico- Elástico
Adhesividad		Pegajoso
Características geométricas		
Clase		Ejemplos
Tamaño y forma de partícula		Arenoso- Granulado- Áspero
Forma y orientación de las partículas		Fibrosa- Celular- Cristalina
Otras características		
Parámetros primarios		Términos comunes
Contenido de humedad		Seco- Húmedo- Aguado
Contenido graso		Aceitoso
		Grasoso

4.1.1.4.2 Análisis de perfil de textura

El análisis de perfil de textura (TPA), se trata de un método objetivo de análisis aplicable a medidas sensoriales e instrumentales. En el ensayo TPA, un émbolo comprime de forma uniaxial y durante dos veces consecutivas una muestra para simular el movimiento de la mandíbula durante la masticación. La muestra se sitúa en la base y se comprime y descomprime dos veces mediante una platina adjunta al sistema de movimiento. Para imitar la acción de masticar se debe hacer una alta compresión, sin llegar en ningún momento a romper la muestra. Este análisis permite obtener siete parámetros texturales muy bien correlacionados con la evaluación sensorial, arrojando además una curva del perfil TPA.

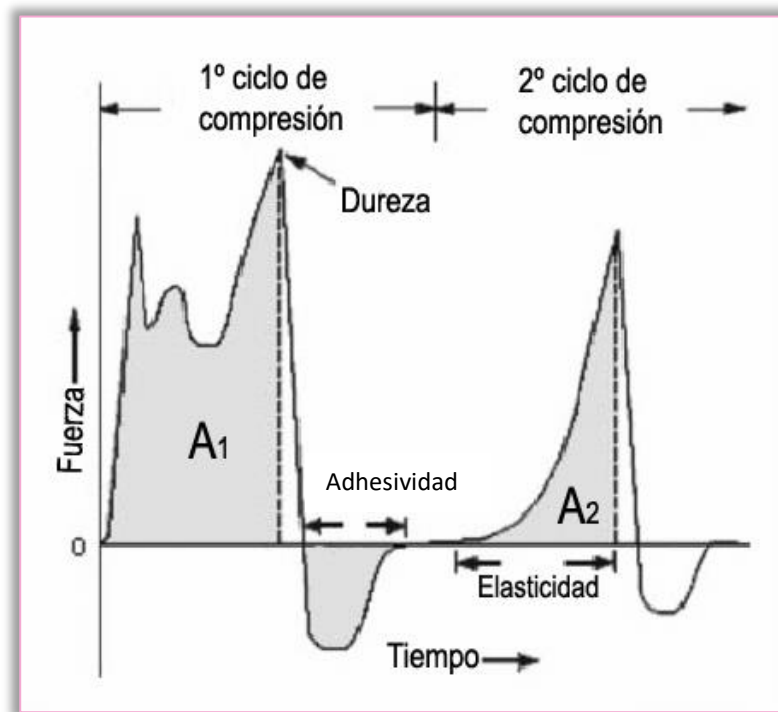


Figura 43: Gráfica general del análisis de perfil de textura TPA. (Tomado de Díaz Molins, 2009).

En la Fig. 43 se pueden observar los principales parámetros texturales que se obtienen con estas mediciones:

- Fragilidad: está relacionada con la cohesión y con la fuerza necesaria para romper un producto en trozos. En la curva, está representada por el primer pico significativo que se obtiene tras la primera compresión.
- Dureza: es relativa a la fuerza necesaria para deformar el alimento o hacer penetrar un objeto en él. Se trata de la fuerza máxima ejercida en el primer ciclo de compresión.
- Cohesividad: está relacionada al grado de deformación de un producto antes de romperse. Es la relación de áreas originadas en los dos ciclos de compresión, representa el trabajo necesario para comprimir la muestra por segunda vez respecto al que ha sido necesario para comprimirla la primera vez.
- Adhesividad: es el trabajo necesario para vencer las fuerzas de atracción entre la superficie del alimento y la superficie de otros materiales con los que el alimento entra en contacto. En el ensayo, es el área de fuerza negativa que se obtiene tras la primera compresión y que representa el trabajo necesario para separar el émbolo de compresión del alimento.
- Elasticidad: es relativa a la rapidez de recuperación de la deformación después de la aplicación de una fuerza y al grado de dicha recuperación. En el ensayo, representa la altura que el alimento recupera respecto a la que tenía inicialmente durante el tiempo que transcurre desde que acaba la primera compresión hasta que empieza la segunda.
- Gomosidad: es la energía requerida para desintegrar un alimento semisólido a un estado listo para tragar. Está definida como el producto de dureza por cohesividad.
- Masticabilidad: está relacionada con la cohesión y el tiempo necesario o el número de masticaciones requeridas para dejar un producto sólido en las condiciones necesarias para su deglución. Se define como el producto de dureza por cohesividad y por elasticidad.

4.1.2 Caracterización de las propiedades sensoriales de los panificados

El Instituto de Tecnólogos de Alimentos (IFT) de EEUU, define la evaluación sensorial como la disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto y oído.

El análisis sensorial es crucial para evaluar las propiedades organolépticas de un producto, que se realizan mediante los sentidos humanos. Se refiere a la evaluación de la apariencia, olor, aroma, textura y sabor de un alimento o materia prima. Esta técnica de medición es tan importante como los métodos químicos, físicos y microbiológicos (Pires y col., 2020). No sólo se utiliza como punto de control de calidad en la industria alimentaria, sino también es muy importante como técnica para el desarrollo de productos y la caracterización de nuevos productos en el mercado.

Es esencialmente relevante conocer la opinión de los consumidores, la cual afecta directamente a la comercialización del producto. Por eso, las pruebas sensoriales se utilizan en diversas industrias como la alimentaria, la perfumería, la farmacéutica y la de pinturas (Pourmohammadi y col., 2020).

En el pasado, el análisis sensorial se consideraba un método marginal para medir la calidad de los alimentos. Sin embargo, su desarrollo histórico ha demostrado que es una de las formas más importantes de asegurar la aceptación del producto por parte del consumidor. A pesar de la idea generalizada de que el análisis de alimentos debe llevarse a cabo en un laboratorio químico o microbiológico, las técnicas de análisis sensorial son igualmente científicas y están fundamentadas con estadística, fisiología, psicología entre otras ramas de la ciencia (Pires y col., 2020).

4.1.2.1 Percepción y atributos sensoriales

El proceso sensorial comienza cuando un estímulo actúa sobre los receptores sensoriales. El estímulo puede ser un agente químico o físico que produce una respuesta en los receptores sensoriales externos o internos. El impulso nervioso creado por el receptor sensorial se transmite por el sistema nervioso al cerebro, donde se interpreta como una sensación (Manfugás 2020). La percepción es la toma de conciencia sensorial.

Cada órgano receptor está especializado en recibir un tipo específico de estímulos, ya sea mecánico, térmico, luminoso, acústico, químico o eléctrico. A su vez, cada estímulo dará lugar a una sensación de agrado o rechazo.

El primer contacto humano con un producto alimenticio generalmente ocurre a través de la vista, el olfato (a través de la nariz por el aire), el oído o el tacto, o a través de una combinación de estas percepciones sensoriales. Las sensaciones subsiguientes generalmente son táctiles (a través de los labios y la cavidad bucal, donde se perciben sensaciones de frío, calor o dolor) y nuevamente auditivas (los sonidos de la masticación). Luego intervienen el gusto y nuevamente el olfato, esta vez en forma indirecta, a través de la cavidad faríngea. De esta manera, los atributos de un alimento se perciben en el siguiente orden: apariencia, aroma u olor, textura y sabor.

4.1.2.2 Aplicaciones del análisis sensorial

El análisis de la calidad sensorial de los alimentos es útil para:

- El control de calidad de materias primas y el establecimiento de normas y especificaciones.
- El desarrollo y lanzamiento de nuevos productos.

- La realización de pruebas de mercados para detectar las preferencias del consumidor en los productos nuevos.
- La investigación de los factores que influyen en el olor y el aroma de los alimentos.

4.1.2.3 Condiciones para el desarrollo de una evaluación sensorial

Para realizar un análisis sensorial, además de la persona que recluta, selecciona, entrena, conduce a los panelistas y dirige la evaluación, se necesitan evaluadores, denominados jueces. Estos pueden ser expertos, entrenados, semi entrenados o no entrenados.

Para realizar la evaluación, se requiere un lugar cómodo, agradable, con buena iluminación y sin interferencia de olores.

Los requisitos para quienes participen en un análisis sensorial, según la norma ISO 8589 (ISO, 1988) *Sensory Analysis – General Guidance for the Design of Test*, son:

- El lugar físico donde se realizan las pruebas debe diseñarse para minimizar los prejuicios del sujeto, maximizar su sensibilidad y eliminar las variables que no provengan del producto que se va a evaluar.
- El ambiente debe ser tranquilo y agradable.
- La hora del día en que se desarrollan las pruebas puede influir en los resultados; los mejores momentos serían al finalizar la mañana y la media tarde.
- El panelista no debe fumar ni ingerir alimentos al menos 30 minutos antes de la sesión.
- El panelista no puede utilizar perfumes ni cosméticos cuando asiste a una evaluación, ya que esto podría interferir con los resultados de la prueba.
- No puede haber comunicación entre panelistas: los resultados no se pueden discutir hasta que todo el panel termine de evaluar.

- Los panelistas deben ser puntuales y cooperativos.
- Se debe lograr que las muestras provenientes de distintos tratamientos sean idénticas en todas sus características, salvo en la que se está evaluando.
- Durante la sesión de trabajo los evaluadores reciben algún agente para el enjuague de la boca entre las muestras, generalmente se utiliza agua a temperatura ambiente.

4.1.2.4 Pruebas Sensoriales

La evaluación sensorial, es aquella que usa técnicas basadas en la fisiología y psicología de la percepción. Las pruebas sensoriales se seleccionan de acuerdo con la finalidad por la que se efectúan. Se las divide en tres grupos principales: descriptivas, discriminativas y afectivas. De este modo, se puede identificar la apreciación del catador sobre los alimentos, sustancias, o preparaciones que degusta (Cárdenas Mazón y col., 2018).

4.1.2.4.1 Pruebas afectivas

Son aquellas en las que el evaluador expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o le disgusta, si lo acepta o lo rechaza, o si prefiere otro. Por lo general se realizan con paneles inexpertos o con consumidores. Entre las pruebas afectivas están las de medición del grado de satisfacción y las de aceptación. Estas pruebas presentan mayor variabilidad en los resultados y estos son también más difíciles de interpretar ya que se trata de apreciaciones completamente personales. Se recomienda que esta prueba incluya al menos 50 evaluadores para garantizar resultados confiables y representativos.

4.1.2.4.2 Pruebas discriminativas

Son las que no requieren conocer la sensación subjetiva que provoca un alimento; más bien se busca establecer si hay diferencia o no entre dos o más muestras, y en algunos casos, la magnitud o importancia de esa diferencia. Las pruebas discriminativas más usadas son las pruebas de comparación apareada simple, triangular, duo– trío, comparaciones múltiples y de ordenamiento.

4.1.2.4.3 Pruebas descriptivas

Son aquellas pruebas en las que el juez establece los descriptores que definen las características sensoriales de un producto y además cuantifican las diferencias existentes entre varios productos. Consisten en descripciones del color y el sabor integral de un producto, así como de sus atributos individuales. Se realizan evaluaciones detalladas y los evaluadores se apropian de terminología consensuada con un lenguaje objetivo (Ares y col., 2013). A través de estas pruebas se define el grado de intensidad de cada atributo, sabor residual y amplitud o impresión general del sabor y el olor. Si bien son habitualmente utilizados en el análisis sensorial, son métodos más complejos que los anteriormente mencionados. Para realizar estas pruebas se debe contar con un panel entrenado y que debe mantenerse en el tiempo, lo cual no es fácil de lograr además de ser costoso. Entre las técnicas de análisis descriptivo se pueden mencionar el análisis descriptivo cuantitativo, métodos de perfil de sabor, textura, de libre elección, el análisis descriptivo genérico, etc. Una de las debilidades de estos métodos es asumir que el panel tiene la misma percepción que los consumidores.

4.1.2.4.4 Pruebas CATA (Check all that apply)

Una de las técnicas de evaluación sensorial más utilizadas para el desarrollo de un producto es la que utiliza el método descriptivo cuantitativo. Ésta ofrece numerosas ventajas frente a los demás métodos, como ser el uso de evaluadores entrenados capaces de realizar evaluaciones detalladas, la apropiación de terminología consensuada con lenguaje objetivo (Ares y Jaeger, 2013). Sin embargo, tienen la desventaja de requerir de un entrenamiento durante varias horas a meses según la complejidad de las muestras para retener a los integrantes del panel entrenado, lo cual representa una alta erogación aún para las grandes empresas, la capacitación y mantenimiento del panel para pruebas descriptivas requiere un alto costo incluso para las grandes empresas.

Debido a que en la actualidad las industrias exigen respuestas inmediatas, los métodos descriptivos rápidos se están volviendo tendencia (Murray 2001; Valentin y col., 2012). En la última década, los métodos que utilizan la respuesta del consumidor no entrenado han ganado popularidad por reducir el tiempo y disminuir los gastos que implica el entrenamiento y la mantención de un panel entrenado (Varela y Ares, 2012).

Los métodos descriptivos con consumidores son muy útiles cuando se desea una evaluación rápida del perfil sensorial y pueden proporcionar mapas sensoriales similares a los análisis descriptivos tradicionales. En este contexto, para el desarrollo de productos, el método CATA, del inglés, *Check All That Apply* (marque todo lo que corresponda), ha demostrado ser eficiente (Valentin y col., 2012; Varela y Ares, 2012).

CATA ha ganado popularidad en los últimos años y consiste en obtener información sobre la percepción sensorial de los consumidores con relación a un producto a través de la aplicación de un cuestionario de fácil comprensión. Es un método potente, rápido y versátil que provee información sobre características sensoriales y no sensoriales del producto. Para ello, se entrega a los consumidores una lista de descriptores o atributos (entre 10 y 30

términos) previamente elegidos de acuerdo con las características del producto. Luego, los consumidores deben elegir en esa lista armada aleatoriamente los atributos que consideran más apropiados para describirlo, sin límite en el número de palabras a elegir (Ares y Jeger, 2013). Se pueden seleccionar múltiples descriptores y el consumidor no se ve obligado a concentrarse en enumerar los atributos (Ares y col., 2015; Santos y col., 2015). Las listas CATA proporcionan datos binarios multivariados que indican la aplicabilidad de los descriptores proporcionados para las muestras, siendo herramientas importantes para el desarrollo de nuevos productos, ya que retratan la descripción del producto por la percepción de los consumidores, lo que puede ser positivo al tratarse de los destinatarios finales del producto (Ares y Varela, 2017a; Moussaoui y Varela, 2010).

Aunque no es factible medir la intensidad de un atributo, es posible que un evaluador no entrenado indique un atributo para más de una muestra, si bien se presente en diferentes intensidades (Meyners y col., 2016).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el efecto de la adición de las enzimas xilanasa y lacasa recombinantes sobre la calidad de panificados elaborados a partir de harina de trigo, evaluando sus propiedades fisicoquímicas y organolépticas.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología aplicada para cumplimentar los objetivos del presente capítulo es coincidente para ambas enzimas estudiadas, por lo que a continuación se describe por única vez los métodos utilizados para la evaluación de los efectos de las enzimas xilanasa y lacasa.

4.3.1 Selección de la formulación para la elaboración de panificados

4.3.1.1 Selección de la receta para la formulación de panificados

Se diseñaron diversas formulaciones de panificados con diferentes concentraciones de enzimas y materiales. Se consideraron como parámetros el tipo de harina (harina para elaborar panificados, harina 0000, harina leudante, de las marcas Blancaflor, Reinaharina y Pureza), el tipo de aceite (de soja, de girasol, de la marca Cocinero) y el nivel de hidratación (en un rango de 250 a 300 mL por Kg de harina).

4.3.1.2 Selección de la concentración enzimática

Se realizaron investigaciones previas para seleccionar la concentración enzimática adecuada según la bibliografía. De esta manera, para la enzima xilanasa se ensayaron concentraciones en un rango de 2 a 10 U de enzima por gramo de harina (Bala y col., 2017; Zhan y col., 2014) y para la enzima lacasa se ensayaron concentraciones en un rango de 1 a 7,5 U de enzima por gramo de harina (Ahmad y col 2014; Niño Medina y col., 2017).

4.3.1.3 Ensayos físicos y texturales

Se realizaron análisis físicos y texturales para evaluar diferentes atributos de los panificados. Se midieron características como el volumen del pan (sección 4.3.3.1) y la textura

(sección 4.3.6.1). Estos análisis permitieron evaluar la calidad de los panificados elaborados con diferentes concentraciones de enzimas y de la materia prima utilizada.

4.3.1.4 Ensayos sensoriales

Se formó un panel semientrenado reducido compuesto por 7 miembros del grupo de trabajo que consumen productos panificados, pertenecientes al Instituto de Biotecnología de Misiones “María Ebe Reca” de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Se realizaron sesiones en las que se evaluaron los panificados que arrojaron mejores resultados en los ensayos físicos y texturales y acordaron los descriptores y valores a asignar. Se utilizaron escalas hedónicas de evaluación para cuantificar atributos como sabor, aroma, textura y aceptabilidad global de los panes.

4.3.1.5 Selección de las condiciones óptimas para la elaboración de panificados

Se analizaron los datos obtenidos en los ensayos físicos, texturales y sensoriales para identificar las concentraciones de enzimas y las materias primas que brindaban los mejores resultados en términos de calidad y aceptabilidad. Se identificaron las formulaciones más prometedoras para su posterior aplicación en la elaboración de los panificados.

4.3.2 Elaboración de panificados con xilanasa y lacasa recombinantes

La evaluación integral de las distintas concentraciones de enzimas y materias primas utilizados en la elaboración de panificados, brindó información valiosa para mejorar la calidad de estos productos y optimizar su producción. Una vez logrado esto, se mantuvieron

constantes las cantidades de los productos, las materias primas utilizadas, los moldes, como así también los tiempos de amasado y horneado.

De esta manera, en la elaboración de los panes, se mezclaron en un recipiente 500 g de harina (Blancaflor, Bs. As., Arg.) previamente tamizada, 10 g de sal (Celusal, Bs. As., Arg.) y 5 g de azúcar (Ledesma, Jujuy, Arg.). En un recipiente aparte, se diluyeron 15 g de levadura (Levex, Bs. As., Arg.) en 290 mL de agua de canilla tibia. Posteriormente, la preparación de levadura se vertió en el recipiente conteniendo la harina y se mezclaron todos los ingredientes. A continuación, se añadieron 40 mL de aceite girasol (Cocinero, Bs. As., Arg.) y por último la enzima correspondiente. En el caso de la xilanasa, se la utilizó en concentraciones de 3 U, 6 U y 9 U por g de harina, siguiendo lo propuesto por Zhan y col., (2014), y en el caso de la enzima lacasa, se utilizaron 1,5 U por g de harina.

El amasado se realizó a mano durante 20 minutos, hasta obtener una masa suave y elástica. Una vez finalizado, se formó un bollo que se colocó nuevamente en el recipiente y se cubrió con papel film para evitar que se deshidrate y permitir que fermente adecuadamente. Después de ello, se dejó reposar en un lugar cálido (25 °C) y sin corriente de aire durante aproximadamente 1 hora. Una vez que se dio por finalizada la fermentación de la masa, se procedió a dividirla en porciones del tamaño deseado para luego colocarlas en los moldes, que presentaban un volumen de 100,45 mL (3,5 cm de ancho; 2 cm de frente y 8,2 cm de largo). Se empleó una balanza para asegurarse de que cada porción pesara 50 g. Se dejó reposar durante 30 min para lograr la redistribución de la masa y que tomara la forma del molde antes de ser introducida en el horno.

Se elaboró un pan según se describió anteriormente, al cual no se le adicionaron ninguna de las dos enzimas estudiadas, al que se denominó “control”. Se compararon los resultados obtenidos con y sin adición de enzimas.

4.3.2.1 Horneado

Se precalentó el horno a una temperatura de 180 °C. Luego se introdujeron los panes moldeados y dejaron durante 45 minutos. Una vez transcurrido dicho tiempo, se retiraron y dejaron enfriar durante 1 h para luego realizar las diferentes determinaciones.

4.3.3 Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los panificados

4.3.3.1 Medición del volumen específico y pérdida de peso

El volumen específico (VE) de las muestras se determinó a partir de la sustitución de semillas de sésamo por el pan, contenidas en un recipiente de volumen conocido (AACC, 2000).

VE: volumen de semillas de sésamo en el recipiente – volumen de semillas de sésamo en un recipiente con pan / peso de pan.

La pérdida de peso (PP) del pan se determinó según el método utilizado por Da Mota Zanella y col. (2005):

$$PP: [(\text{peso de la masa} - \text{peso del pan}) / \text{peso de la masa}] \times 100$$

Los datos se reportaron como la media de tres mediciones, cada una realizada sobre un pan fresco.

4.3.3.2 Análisis del color

Las coordenadas del color de la corteza y la miga de los panificados, se determinaron usando un colorímetro marca HunterLab, modelo Miniscan EZ (Hunter Associates Laboratory, Reston, Virginia, USA). El equipo fue estandarizado usando los patrones IP blanco y negro. Las

determinaciones se hicieron por triplicado. Para determinar las coordenadas del color de los panificados, las muestras se colocaron en una placa de Petri y se cubrieron con film para no dañar el colorímetro. El BI se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$X = (a^* + 1,75L^*) / (5,645L^* + a^* - 3,012b^*)$$

$$BI = (100(X - 0,31)) / (0,17)$$

La diferencia total de color se determinó por la siguiente fórmula:

$$\Delta E_0 = \text{Diferencia de color} = [(L-L_0)^2 + (a-a_0)^2 + (b-b_0)^2]^{1/2}$$

Tomando como referencia el pan control.

4.3.4 Análisis de imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los panes elaborados se cortaron en rodajas de 1 cm³ sin dañar la estructura, y se liofilizaron durante 24 h. Dichas muestras se montaron sobre una cinta de carbono doble colocada sobre un soporte (*stap*) y se realizó un recubrimiento metálico con partículas de oro coloidal. Finalmente, las muestras se examinaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (MEB, Jeol 5800 LV) que operó a presión variable (entre 60 y 85 Pa) para visualizar la estructura de los panes en un rango de magnificaciones entre 50 y 4000 X.

4.3.5 Humedad

El contenido de humedad de los panificados se determinó mediante una estufa de secado. Para ello las muestras se dejaron en ésta a 80 ± 2 °C hasta peso constante. Se utilizó una balanza analítica de precisión 0,0001 g para determinar el peso de las muestras antes y

después de ser colocadas en la estufa. Los datos se presentaron como la media de tres mediciones. La fórmula utilizada para calcular este parámetro fue:

$$H = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

donde H= Humedad, P_i= peso inicial y P_f= peso final.

4.3.6 Caracterización de las propiedades texturales de los panificados

4.3.6.1 TPA

La calidad de la textura de la miga y la corteza se analizaron utilizando un texturómetro TAXT2i (Stable Micro Systems, Godalming, Reino Unido). La textura del pan se determinó mediante la prueba de dos ciclos de compresión utilizando una celda de carga de 50 kg equipada con plato de compresión (P/75). El ensayo se realizó con una fuerza de disparo de 0,098 N, utilizando un 60% de deformación y un tiempo de espera entre compresiones de 5 s. Las muestras se estandarizaron cortando trozos de pan de 2,5 cm de lado. Cada muestra se colocó sobre la base y se comprimió dos veces para obtener la curva completa del perfil de compresión-relajación-tensión.

Para cada muestra, se analizaron al menos diez piezas independientes y se informaron las desviaciones estándar del valor promedio. Los datos se obtuvieron a partir de las curvas utilizando el software *Texture Exponent* versión 1.22 (Stable Micro Systems).

Debido a las características de la muestra, los parámetros que se decidieron analizar fueron: dureza (N), elasticidad (adimensional), cohesividad (adimensional), gomosidad (N) y resiliencia (adimensional) según lo definido por Hleap y Velasco (2010).

Se realizó además el análisis de firmeza según el método estandarizado indicado por la norma AACC (74-09.01) utilizando la sonda SMS P/75. Para ambas pruebas, las muestras se prepararon el mismo día y la corteza se retiró justo antes de la prueba.

4.3.7 Caracterización de las propiedades sensoriales de los panificados

4.3.7.1 Participantes

Un total de 129 consumidores participaron en el estudio (89 mujeres y 40 hombres). Sus edades estuvieron en el rango de 18 a 53 años. Los participantes son miembros del Instituto de Biotecnología de Misiones y estudiantes del segundo año de la cátedra de Microbiología y Parasitología perteneciente a la carrera de Licenciatura en Enfermería de la UNaM, Argentina. Se trataba de consumidores frecuentes de panificados que presentaban habilidad para desenvolverse cómodamente con las planillas digitales. Ninguno de ellos fue remunerado.

El primer encuentro se llevó adelante en la sala de reuniones del Instituto de Biotecnología de Misiones Maria Ebe Reca, mientras que el segundo, en el gabinete de la cátedra en la escuela de enfermería perteneciente a la FCEQyN. Ambas instituciones se encuentran en la ciudad de Posadas, Misiones. La sala de reuniones y el gabinete mencionados anteriormente son espacios tranquilos, lo suficientemente amplios para acomodar a los participantes de forma cómoda, permiten una circulación fluida y cuentan con una iluminación adecuada.

4.3.7.2 Muestras

En el análisis sensorial se incluyeron 3 panificados elaborados a partir de la enzima xilanasa recombinante, en diferentes concentraciones, 1 panificado elaborado a partir de la

enzima lacasa recombinante y el control correspondiente. Se sirvieron a cada participante las rebanadas de pan codificadas y fueron presentadas en orden aleatorio. Se les ofreció agua para limpiar el paladar entre la degustación de cada muestra.

4.3.7.3 Recolección de datos

La evaluación sensorial se realizó con los panificados elaborados a partir de diferentes concentraciones de xilanasa recombinante y con los panificados elaborados a partir de la enzima lacasa recombinante.

Cada panificado contenía su respectivo código de muestra. Se les solicitó expresamente a los evaluadores que no fumaran ni ingieran alimentos dentro de los 30 minutos previos a la sesión, no utilizaran perfumes ni cosméticos y no se comunicaran entre ellos durante el desarrollo del ensayo.

Con el fin de recabar los resultados de la evaluación sensorial de los panificados preparados con las enzimas xilanasa y lacasa, los panelistas respondieron cuestionarios digitales realizados en *Google forms* (Fig. 44 A, B y C), donde seleccionaron las características y atributos que aplicaban a la muestra que estaban evaluando, utilizando una escala hedónica.

Además, para realizar una prueba CATA, se les presentó un listado elaborado teniendo en cuenta las características del producto previamente seleccionadas (Formulario 4.1 C). En este caso, los descriptores fueron: aspecto general del pan, opinión sobre el color de la corteza, de la miga, de la blandura, de la dureza y del aroma. No se dieron instrucciones a los consumidores sobre el número de bocados que podrían tomar de cada producto para responder al cuestionario CATA.

A



Características de los consumidores

Descripción del formulario

Sexo *

☐ M

☐ F

Edad *

Tu respuesta

¿Te gustan los panificados?

☐ Si

☐ No

¿Estás dispuesto a probar panificados elaborados a partir de enzimas naturales?


☐ Si

☐ No

Código de muestra

Tu respuesta

B



Evaluación sensorial

Descripción del formulario:

¿Cuál es tu opinión del aspecto general del pan?

☐ Me gusta mucho

☐ Me gusta moderadamente

☐ Me gusta

☐ Me es indiferente

☐ No me gusta

¿Cuál es tu opinión del color de la corteza?

☐ Me gusta mucho

☐ Me gusta moderadamente

☐ Me gusta

☐ Me es indiferente

☐ No me gusta

¿Cuál es tu opinión del color de la miga?

☐ Me gusta mucho

☐ Me gusta moderadamente

☐ Me gusta

☐ Me es indiferente

☐ No me gusta

¿Cuál es tu opinión del sabor?

☐ Me gusta mucho

☐ Me gusta moderadamente

☐ Me gusta

☐ Me es indiferente

☐ No me gusta

¿Cuál es tu opinión de la blandura?

☐ Me gusta mucho

☐ Me gusta moderadamente

☐ Me gusta

☐ Me es indiferente

☐ No me gusta

¿Cuál es tu opinión de la dureza?

☐ Me gusta mucho

☐ Me gusta moderadamente

☐ Me gusta

☐ Me es indiferente

☐ No me gusta

¿Cuál es tu opinión del aroma?

☐ Me gusta mucho

☐ Me gusta moderadamente

☐ Me gusta

☐ Me es indiferente

☐ No me gusta

C



CATA

Descripción del formulario

¿Qué palabras consideras que aplican a este producto?

☐ Sabor artificial

☐ Sabor natural

☐ Sabor intenso

☐ Sabor a cocido

☐ Sabor persistente

☐ Sabor desagradable

☐ Aroma agradable

☐ Aroma no agradable

☐ Color suave

Figura 44: Formulario A) Formulario digital (Google Forms) para evaluadores consumidores panarios. B) Formulario digital (Google Forms) para la evaluación sensorial de panificados elaborados a partir de diferentes concentraciones de las enzimas xilanasa y lacasa. C) Formulario digital (Google Forms) para CATA de panificados elaborados a partir de diferentes concentraciones de las enzimas xilanasa y lacasa.

4.3.8 Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante ANOVA con un nivel de significación del 95%. Se utilizó el Test LSD para la determinación de grupos homogéneos y el software Statgraphics Centurion XVII.

Se empleó el Test Q de Cochran (Meyners y col., 2013) y el análisis de Bonferroni. El Test Q se utilizó inicialmente para determinar si existían diferencias significativas en la percepción de los atributos sensoriales por parte de los consumidores. Posteriormente, se aplicó el análisis de Bonferroni para identificar las diferencias específicas entre las muestras cuando se habían detectado diferencias significativas en el Test Q.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Selección de la formulación para la elaboración de panificados

En lo que respecta a los ensayos preliminares para la elección de la mejor receta, los panificados que resultaron con las mejores características en cuanto a volumen, sabor, aroma, textura y aceptabilidad general fueron los que se realizaron con harina tipo 0000 de marca Blancaflor, elaborados con aceite girasol de marca Cocinero y con un agregado de agua de 290 mL. En cuanto a la concentración enzimática, se decidió trabajar con 3, 6 y 9 U de xilanasa y 1,5 U de lacasa.

Sección I: PANIFICADOS ELABORADOS A PARTIR DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA ENZIMA XILANASA RECOMBINANTE

4.4.2 Caracterización de las propiedades físicas de los panificados

4.4.2.1 Medición del volumen específico

El volumen específico de los panificados mostró un notorio aumento con el agregado de 6 U y 9 U de la enzima xilanasa recombinante, siendo las diferencias encontradas estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Por su parte, el porcentaje de pérdida de peso disminuyó respecto al control, cuando los panificados fueron tratados con dicha enzima. Estos resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Volumen específico y porcentaje de pérdida de peso de panificados elaborados a partir de 3, 6 y 9 U de xilanasa recombinante ($P < 0,05$). Superíndices iguales indican que no hay diferencias significativas.

Muestra	Volumen específico (cm ³ /g)	Porcentaje de pérdida de peso (%)
Control	1,94 ± 0,09 ^a	16 ± 0,09 ^a
3 U	2,09 ± 0,1 ^a	14 ± 0,1 ^{ab}
6 U	3,24 ± 0,05 ^c	8 ± 0,07 ^c
9 U	2,89 ± 0,09 ^b	10 ± 0,09 ^{ab}

A continuación, en la Fig. 45 A se muestran fotografías de los panes obtenidos, donde se distinguen visualmente los cambios de volumen cuantificados cuyos resultados se

muestran en la Tabla 6. La muestra elaborada a partir de 6 U de xilanasa presenta vacuolas de mayor tamaño que el resto de los panes.

La microestructura del producto define su apariencia, textura, percepción del sabor y estabilidad del producto final (Autio y col, 2001). Esto explica la razón por la que visualmente productos basados en materias primas de similares composiciones químicas tienen texturas diferentes. En la Fig. 45 B se presentan los resultados del examen por microscopía electrónica de barrido, en los cuales se pueden distinguir gránulos de almidón de la masa, gelatinizados luego de la cocción, observándose diferencias en la microestructura de cada muestra.

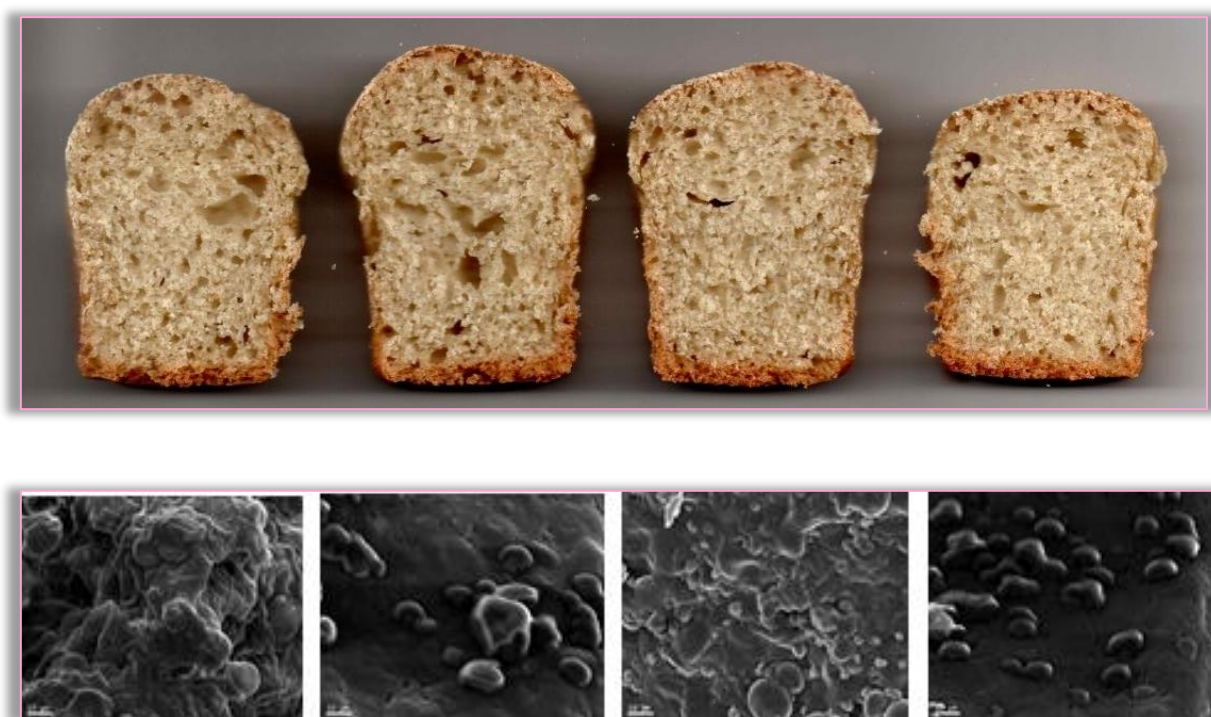


Figura 45: A) Fotografías de panificados elaborados a partir de 3, 6 y 9 U de xilanasa recombinante y el control sin el agregado de la enzima. B) Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido con una magnificación de 45X.

4.4.2.2 Color

Los resultados de las mediciones de color realizadas sobre la corteza, el suelo, los laterales y la miga, se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Valores de color en sistema CIE-L*a*b* obtenidos para la muestra control sin adición de enzima y con 3, 6 y 9 U de xilanasa recombinante. Valores promedio \pm Desvío estándar. Superíndices iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la misma columna.

L*	Corteza	Suelo	Lateral	Miga
Control	72,22 \pm 0,59 ^b	68,38 \pm 3,68 ^b	73,35 \pm 1,18 ^c	77,08 \pm 6,88 ^a
3 U	74,54 \pm 2,13 ^c	68,93 \pm 3,24 ^b	69,44 \pm 0,34 ^b	73,15 \pm 1,72 ^a
6 U	61,39 \pm 3,07 ^a	58,33 \pm 2,74 ^a	65,84 \pm 1,10 ^a	75,34 \pm 2,86 ^a
9 U	70,87 \pm 0,57 ^b	65,67 \pm 3,39 ^b	72,53 \pm 1,33 ^c	70,88 \pm 0,57 ^a
a*				
Control	5,01 \pm 0,68 ^a	4,21 \pm 0,23 ^a	0,66 \pm 0,17 ^a	-1,65 \pm 0,55 ^a
3 U	5,84 \pm 0,62 ^a	5,08 \pm 2,23 ^{ab}	2,63 \pm 0,98 ^b	-0,59 \pm 0,07 ^c
6 U	11,59 \pm 0,97 ^b	9,77 \pm 0,71 ^b	8,23 \pm 0,25 ^c	-0,53 \pm 0,11 ^c
9 U	7,74 \pm 0,71 ^c	6,73 \pm 1,93 ^c	4,56 \pm 1,74 ^b	-0,92 \pm 0,07 ^b
b*				
Control	25,67 \pm 1,04 ^{ab}	21,61 \pm 2,60 ^a	19,97 \pm 1,73 ^a	12,65 \pm 0,55 ^a
3 U	26,33 \pm 0,52 ^{ab}	23,18 \pm 2,56 ^a	19,80 \pm 1,72 ^a	12,32 \pm 0,36 ^a
6 U	26,64 \pm 1,23 ^b	21,92 \pm 4,98 ^a	26,71 \pm 0,38 ^b	12,82 \pm 1,4 ^a
9 U	23,32 \pm 2,33 ^a	22,81 \pm 2,10 ^a	19,45 \pm 3,99 ^a	12,02 \pm 0,66 ^a

El brillo de la corteza de los panificados, sus laterales y suelo no presentaron variaciones notorias respecto del control con el agregado de 3 y 9U de xilanasa. Sin embargo, los panes preparados con 6 U mostraron disminuciones significativas en los valores del brillo, especialmente en la corteza y el suelo. Con respecto a la miga, se distingue una leve tendencia al descenso de los valores del brillo con el aumento de la concentración de enzima adicionada, si bien las diferencias encontradas no son significativas.

El valor de a^* indica que, como era de esperarse, la corteza se encuentra dentro de las tonalidades naranjas. La corteza superior, lateral y del suelo de las muestras, mostraron una tendencia a aumentar el valor de a^* junto con el aumento de la concentración de xilanasa. Sin embargo, en la corteza lateral el valor de a^* tuvo un incremento más notorio con la concentración de 6 U, es decir que se intensificó el color rojo. Este efecto no pudo observarse en la miga, donde si bien se observa un descenso en la tonalidad verde ($-a^*$) respecto al control con el uso de xilanasa, las concentraciones 3 y 6 U, tuvieron un efecto similar y mayor que el agregado de 9 U de xilanasa recombinante a los panificados. El valor de b^* no mostró tendencias en la corteza o en la miga, esto quiere decir que el color amarillo ($+b^*$) se mantiene casi sin modificaciones en las muestras.

4.4.2.2.1 Parámetros BI, Chroma y Hue de la corteza

En lo que respecta al pardeamiento que se cuantifica por medio del índice BI, se observó un incremento en la corteza superior y lateral de los panificados adicionados con la enzima xilanasa recombinante comparados con el control, especialmente al adicionar 6 U de enzima (Tabla 8).

Algo similar ocurrió con el chroma, dado que con el agregado de 6 U de enzima se observó un aumento en la saturación del color de los panificados. Por el contrario, el agregado de 9 U, disminuyó dicho parámetro.

Por su parte, el parámetro hue disminuyó ligeramente en los panificados en los que se añadió la enzima xilanasa, siendo más notorio para los panes elaborados con 6U de xilanasa.

Tabla 8: Valores de índice de BI obtenidos a partir de los promedios \pm desvío estándar de la sección 4.4.2.2, para la corteza superior y lateral, Hue y Chroma.

Muestra	BI corteza	BI Lateral	Hue	Chroma
Control	48,36	31,92	79,87 ^º	26,15
3 U	49,85	35,88	77,46 ^º	26,88
6 U	69,86	62,78	65,25 ^º	29,05
9 U	47,5	35,49	73,83 ^º	24,30

4.4.2.2.2 Diferencia total de color

Al realizar el cálculo de diferencia de color respecto al pan control, se encontró que la misma se mantuvo prácticamente invariable para la corteza, suelo y laterales del pan adicionado con cantidades crecientes de enzima. Sin embargo, la miga mostró cambios importantes aumentando en relación directa con la cantidad adicionada de enzima.

Tabla 9: Valores de diferencia total de color para las muestras obtenidas a partir de los promedios de la sección 4.2.2.

Muestras	3 U	6 U	9 U
ΔE Corteza	2,55	13,57	3,85
ΔE Suelo/base	4,25	13,84	4,02
ΔE Lateral	4,38	13,92	4,02
ΔE Miga	4,08	6,21	8,10

A fin de visualizar los resultados obtenidos, en la Fig. 46 se muestran los colores sólidos obtenidos con los parámetros CIE-L*a*b* obtenidos mediante la herramienta online rakko.

	Corteza	Base	Lado	Miga
Control				
3 U				
6 U				
9 U				

Figura 46: Color sólido representativo de los valores CIE-L*a*b* promedio obtenido para cada muestra analizada.

4.4.2.2.3 Humedad

La Tabla 4.7 presenta los contenidos de humedad de la miga. La adición de 3 U de xilanasa no tuvo efecto significativo en el contenido de humedad en comparación con la muestra de control, a excepción del pan elaborado con 6 U de enzima el cual redujo un 25% su contenido de agua y el pan elaborado con 9 U de xilanasa.

Tabla 10: Humedad. Valores promedios de 3 muestras

Muestra	Humedad
Control	12,04 ^a
3 U	11,01 ^a
6 U	8,98 ^b
9 U	14,45 ^c

4.4.3 Caracterización de las propiedades texturales de los panificados

4.4.3.1 TPA

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos durante el ensayo TPA. En la misma se puede observar que el agregado de la enzima xilanasa produjo una reducción de la dureza del pan inversamente relacionada con la concentración enzimática, tanto es así, que con 3 U disminuyó cerca del 55% del valor original, llegando a un 25% para las mayores concentraciones de enzima. Algo similar ocurrió con la masticabilidad que disminuyó un 43% para 3 U y finalizó con un 32% del valor inicial.

Tabla 11: *Parámetros obtenidos mediante la prueba de TPA sobre panificados elaborados a partir de diferentes concentraciones de xilanasa recombinante. Valores promedio \pm desvío estándar. Hay diferencias significativas entre los valores que comparten distinto superíndice.*

	Dureza * (N)	Elasticidad *	Cohesividad *	Masticabilidad d	Resiliencia
Control	39,32 \pm 5,02 ^c	0,68 \pm 0,03 ^a	0,53 \pm 0,03 ^a	14,17 \pm 1,73 ^e	0,21 \pm 0,01 ^a
3 U	17,65 \pm 2,04 ^b	0,80 \pm 0,05 ^b	0,59 \pm 0,03 ^b	8,19 \pm 0,75 ^d	0,24 \pm 0,02 ^b
6 U	11,56 \pm 1,75 ^a	0,86 \pm 0,03 ^{bcd}	0,61 \pm 0,03 ^b	5,99 \pm 0,77 ^{bc}	0,26 \pm 0,02 ^b
9 U	9,91 \pm 1,87 ^a	0,85 \pm 0,03 ^{bc}	0,64 \pm 0,04 ^c	5,43 \pm 1,17 ^b	0,25 \pm 0,02 ^b

Por otra parte, si bien se observó un incremento superior al 18% en la elasticidad de los panificados elaborados con xilanasa recombinante, las diferentes concentraciones de dicha enzima no arrojaron diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$).

La cohesividad del producto aumentó con el incremento de la concentración de la enzima. En este sentido, el agregado de 3 y 6 U de xilanasa resultó estadísticamente igual y con un incremento del orden de 11-15%, mientras que el agregado de 9 U de la enzima aumentó un 20% en este parámetro.

Sin embargo, la masticabilidad disminuyó con el agregado de diferentes concentraciones de xilanas, con pérdidas del 42 y 62% de la masticabilidad para los panificados adicionados de 3 U y 9 U de enzima respectivamente.

Al evaluar la resiliencia, se observaron diferencias del 14% entre el control y las diferentes concentraciones de xilanas, aunque el agregado de 3U, 6U y 9U se mostró estadísticamente igual para este parámetro.

4.4.3.2 Firmeza

Al efectuar el análisis de firmeza según la norma AACC (74-09.01) se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 12. En ella se distingue una disminución significativa del 37 al 60% en la firmeza de los panificados elaborados con 3 U y 9 U de enzima respectivamente.

Tabla 12: Valores obtenidos a partir del ensayo de firmeza realizado sobre panificados elaborados a partir de 3, 6 y 9 U de la enzima xilanas recombinante. Valores promedio \pm Desvío estándar. Hay diferencias significativas entre los valores que comparten distinto superíndice.

Muestra	Firmeza (gf)
Control	341,65 \pm 75,60 ^d
3 U	216,43 \pm 29,56 ^c
6 U	136,73 \pm 30,31 ^b
9 U	138,83 \pm 30,22 ^b

4.4.4 Caracterización de las propiedades sensoriales de los panificados

4.4.4.1 Evaluación sensorial

Los evaluadores que realizaron el análisis sensorial de los panificados elaborados con diferentes concentraciones de xilanasa recombinante, puntuaron diferentes descriptores según sus preferencias. De este modo, al analizar los valores promedio de los atributos sensoriales en relación con los diferentes niveles de adición de la enzima se determinó el efecto de su agregado en la calidad sensorial de los panificados. Se tuvo en cuenta el aspecto general, color de la corteza y de la miga, sabor, blandura, dureza y aroma.

En este sentido, se observa que la concentración de 6 U de xilanasa obtuvo la puntuación más alta en el aspecto general del pan alcanzando valores promedio de 4,18, superiores al límite de aceptación establecido. Esto pone en evidencia la mejora perceptible en la apariencia en comparación con el control y las concentraciones de 3 y 9 U. En cuanto al color de la corteza, la concentración de 3 U de xilanasa mostró el mayor puntaje, de 4,00 sugiriendo que esta concentración puede contribuir a que resulte una corteza más atractiva en comparación con las demás concentraciones y el pan control. Aun así, los puntajes de dicho atributo del resto de los panes evaluados adicionados de xilanasa siempre superaron el valor de 3. En lo que respecta al color de la miga, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes niveles de adición de xilanasa y el control, siendo en todos los casos mayores a 3,12. Por otra parte, los resultados indican que las concentraciones de 6 U y 9 U de xilanasa resultaron en una mejora notable en el sabor y la blandura, con puntajes superiores a 4,42, no habiendo diferencias significativas entre ambos niveles de adición. La concentración de 6 U de xilanasa también mostró la más alta puntuación en los parámetros de dureza y aroma,

4,71 y 4,36, mientras el resto de los panes recibieron puntajes por debajo de 4. Los resultados obtenidos se pueden visualizar en la Fig. 47.

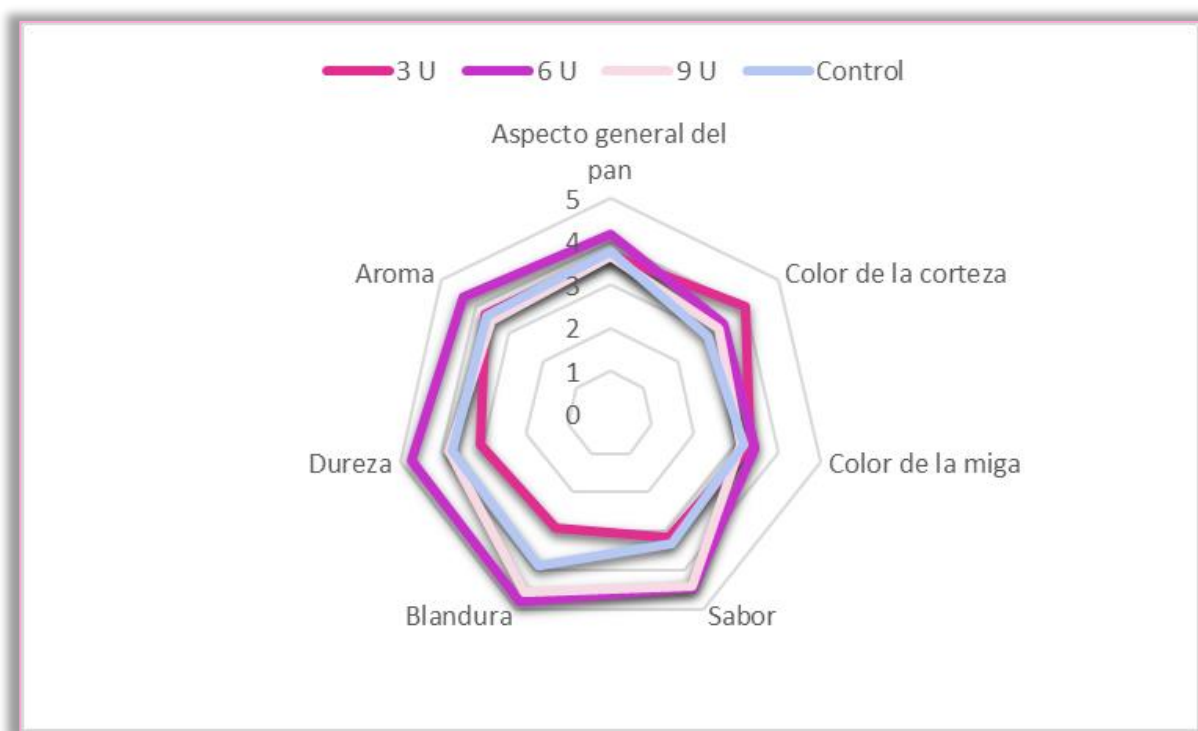


Figura 47: Resultados del análisis sensorial de panificados elaborados con 3, 6, 9 U de xilanasa y el pan control.

4.4.4.1.1 CATA

Cuando se realizó el test CATA y sus resultados fueron analizados aplicando la prueba Q de Cochran y post test de Bonferroni ($\alpha = 0,05$) se observó que, según las frecuencias de mención de las características, los panes elaborados con 6 U de xilanasa recibieron una cantidad de menciones acerca de la percepción de sabor artificial significativamente menor en comparación con el resto. Sin embargo, se tuvo el mayor número de menciones respecto del sabor intenso y el sabor persistente para 3 U y 6 U de xilanasa que las correspondientes a 9 U y el control. La percepción de sabor a cocido fue altamente significativa para panes con 6 U y 9 U de enzima adicionada a diferencia de lo observado para 3 U y el control. La mayor

percepción de un aroma agradable lo tuvieron los evaluadores para panificados elaborados con 9 U de xilanas, en tanto los adicionados con 6 U recibieron un número significativamente menor de menciones al igual que en la percepción del color suave. Por otra parte, ninguno de los evaluadores detectó sabores o aromas desagradables en los panificados. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 48.

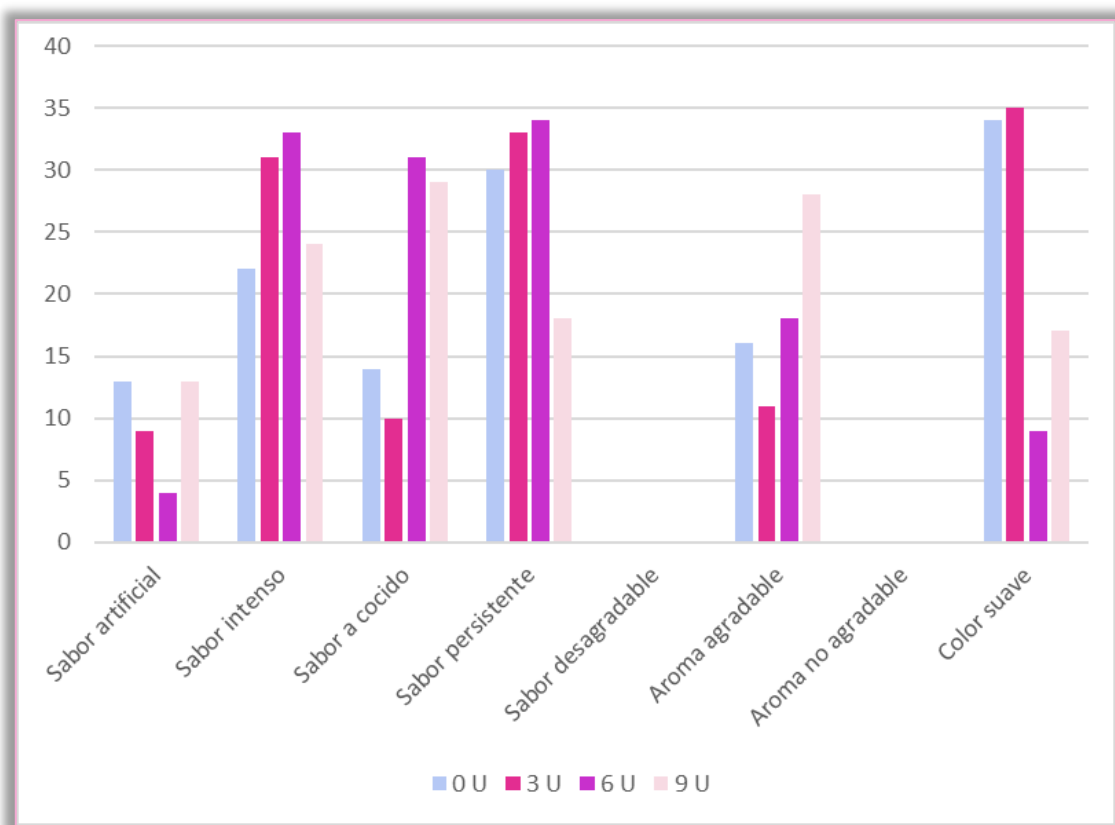


Figura 48: Gráfico de frecuencias para los descriptores color suave, sabor artificial, sabor intenso, sabor a cocido, sabor persistente, sabor desagradable, aroma agradable y aroma no agradable.

Sección II: PANIFICADOS ELABORADOS A PARTIR DE LA ENZIMA LACASA RECOMBINANTE

4.4.5 Caracterización de las propiedades físicas de los panificados

4.4.5.1 Medición del volumen específico

El volumen específico del panificado elaborado con la adición de 1,5 U de la enzima lacasa recombinante, mostró un aumento significativo respecto al control sin la adición de la enzima (Tabla 13). Esto es coincidente con las diferencias en el volumen que se distinguen visualmente en la Fig. 49 A, observándose un mayor tamaño de vacuolas. Asimismo, se determinó una disminución del 37% en la pérdida de peso del pan elaborado con lacasa recombinante.

Tabla 13: *Volumen específico y porcentaje de pérdida de peso de panificados elaborados a partir de 1,5 U de lacasa recombinante ($P < 0,05$).*

Muestra	Volumen específico (cm ³ /g)	Porcentaje de pérdida de peso (%)
Control	1,94 ± 0,09 ^a	16 ± 0,09 ^a
1,5 U	3,07 ± 0,08 ^b	10,13 ± 2,03 ^b

En la Fig. 49 B, se muestran los resultados del examen por microscopía electrónica de barrido. En la muestra elaborada a partir de 1,5 U de lacasa, se observaron gránulos de almidón gelatinizados.

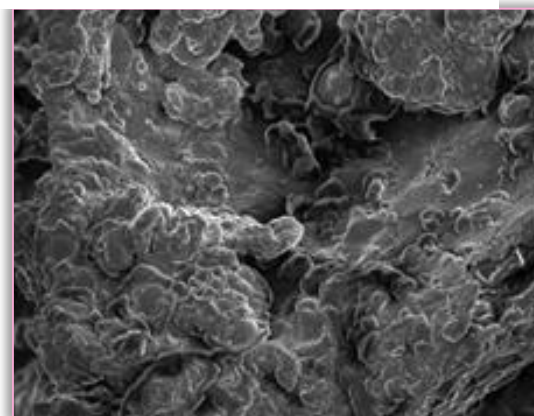
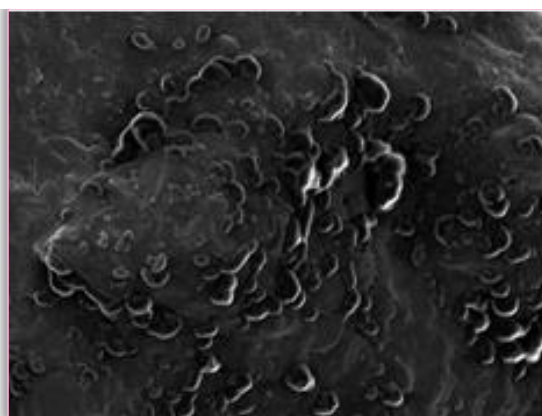


Figura 49: A) Fotografías de panificados elaborados a partir 1,5 U de lacasa recombinante y el control correspondiente. B) Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido con una magnificación de 45X.

Las mediciones del color de los panificados se hicieron sobre la corteza y la miga de éstos (Tabla 14). En relación al valor de L^* (brillo), se pudo observar que los panificados elaborados con 1,5 U de lacasa presentaron un mayor brillo en comparación con el control en la miga principalmente. En cuanto al valor de a^* (tono rojo-verde), se apreció que los panificados elaborados con la enzima lacasa tuvieron un tono ligeramente más rojizo en la corteza en comparación con el control. También para la miga se observan diferencias significativas en las tonalidades rojo-verde entre ambos tratamientos, tendiendo hacia valores menos verdosos para los panificados con enzimas. Por último, en relación al valor de b^* (tono

amarillo-azul), se observó que los panificados elaborados con 1,5 U de lacasa no presentaron diferencias significativas en la corteza ni en la miga respecto al control.

Tabla 14: Valores de color en sistema CIE-L*a*b* obtenidos para la muestra control y con la adición de 1,5 U de la enzima lacasa recombinante. Valores promedio \pm desvío estándar. Superíndices iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la misma columna.

L*	Corteza	Miga
Control	72,22 \pm 0,59 ^b	77,08 \pm 6,88 ^b
1,5 U	75,91 \pm 0,39 ^c	87,84 \pm 3,25 ^a
a*		
Control	9,01 \pm 0,68 ^a	-1,65 \pm 0,55 ^a
1,5 U	15,11 \pm 2,62 ^b	-0,89 \pm 1,01 ^c
b*		
Control	25,67 \pm 1,04 ^{ab}	12,65 \pm 0,55 ^a
1,5 U	29,41 \pm 1,57 ^{ab}	13,12 \pm 0,05 ^a

4.4.5.1.1 Valores BI, Hue y Chroma de la corteza

Los panificados elaborados con la enzima lacasa recombinante presentaron un mayor pardeamiento, evidenciado en el aumento del BI en comparación al control (Tabla 15). Por su parte, los valores de Hue y Chroma no presentaron diferencias significativas.

Tabla 15: Valores de BI promedio, Hue y Chroma para la corteza de los panificados con y sin lacasa adicionada

Muestra	BI Corteza	Hue	Chroma
Control	48,36	79,87 °	26,15
1,5 U	62,35	77,98 °	27,09

4.4.5.1.2 Diferencia total de color entre las muestras

La diferencia total de color entre el panificado con y sin enzima adicionada para la corteza y la miga se muestran en la Tabla 16. Los valores obtenidos se corresponden con diferencias de color perceptibles según la escala propuesta por Limbo y col. (2006).

Tabla 16: Valores de diferencia total de color para la corteza y miga del panificado elaborado con lacasa recombinante obtenidos a partir de los promedios de la sección 4.10.

Muestra	1,5 U
ΔE Corteza	4,43
ΔE Miga	3,97

A fin de visualizar estos resultados, en la Fig. 50 se muestran los colores sólidos obtenidos con los parámetros CIE-L*a*b* obtenidos haciendo uso de rakko, disponible online (<https://es.rakko.tools/>).





	Corteza	Miga
Control		
1.5 U		

Figura 50: Color sólido representativo de los valores CIE-L*a*b* promedio obtenido para cada muestra analizada.

4.4.5.1.3 Humedad

La Tabla 4.15 presenta los contenidos de humedad de la miga, en la que se puede observar que la adición lacasa no tuvo un efecto significativo en este parámetro en comparación con la muestra de control.

Tabla 17: *Humedad de panes control y adicionados de lacasa. Valores promedios obtenidos de 3 muestras.*

Muestra	Humedad
Control	12,04 ± 0,87
1,5 U	11,85 ± 1,29

4.4.6 Caracterización de las propiedades texturales de los panificados

4.4.6.1 TPA

En términos de dureza y resiliencia, los panificados adicionados con 1,5 U de lacasa presentaron una reducción significativa de estos parámetros en orden del 63 y 20% respectivamente en comparación con el control. Por otra parte, no se observaron diferencias en los parámetros de elasticidad, cohesividad y masticabilidad (Tabla 18).

Tabla 18: *Parámetros obtenidos mediante la prueba de TPA sobre panificados elaborados a partir de 1,5 U de lacasa recombinante. Valores promedio ± desvío estándar.*

	Dureza * (N)	Elasticidad *	Cohesividad *	Masticabilidad	Resiliencia
Control	39,32±5,02 ^c	0,68±0,03 ^a	0,53 ±0,03 ^a	14,17 ±1,73 ^e	0,21± 0,01 ^a
1,5 U	14,50±2,65 ^a	0,62±0,06 ^a	0,45±0,07 ^a	4,57±0,82 ^a	0,17±0,04 ^b

4.4.6.2 Firmeza

Con respecto a la firmeza, la adición de lacasa a los panificados disminuyó un 65% de su firmeza, valores muy próximos a los cambios observados para el parámetro de dureza (Tabla 19).

Tabla 19: Valores obtenidos a partir del ensayo de firmeza realizado sobre panificados elaborados a partir de 1,5 U de la enzima lacasa.

Muestra	Firmeza (gf)
Control	341,65±75,60 ^d
1,5 U	120,76 ± 23,3 ^a

4.4.7 Caracterización de las propiedades sensoriales de los panificados

4.4.7.1 Evaluación sensorial

Los evaluadores que realizaron el análisis sensorial de los panificados elaborados con 1,5 U de lacasa recombinante, puntuaron los diferentes descriptores según sus preferencias. Al analizar los valores promedio de los atributos sensoriales en relación con la adición de la enzima, se determinó el efecto de su agregado en la calidad sensorial de los panificados. Se tuvo en cuenta el aspecto general, color de la corteza y de la miga, sabor, blandura, dureza y aroma.

Se observó que el pan elaborado con la enzima recombinante obtuvo la puntuación más alta en el aspecto general del pan alcanzando valores promedio de 4,76 superiores al límite de aceptación establecido. Esto pone en evidencia la mejora perceptible en la apariencia en comparación con el control. Los puntajes obtenidos para color de la corteza, color de la miga, sabor y blandura, no presentaron diferencias significativas entre los panificados

elaborados con la enzima lacasa y el control y en todos los casos superó el límite inferior de 3, salvo para el color de la corteza del pan control que alcanzó valores de 2,91. Si bien el pan elaborado con la enzima lacasa obtuvo una puntuación ligeramente inferior para el aroma en comparación con el grupo de control, ésta se encontró por encima del límite de aceptación establecido. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 51.

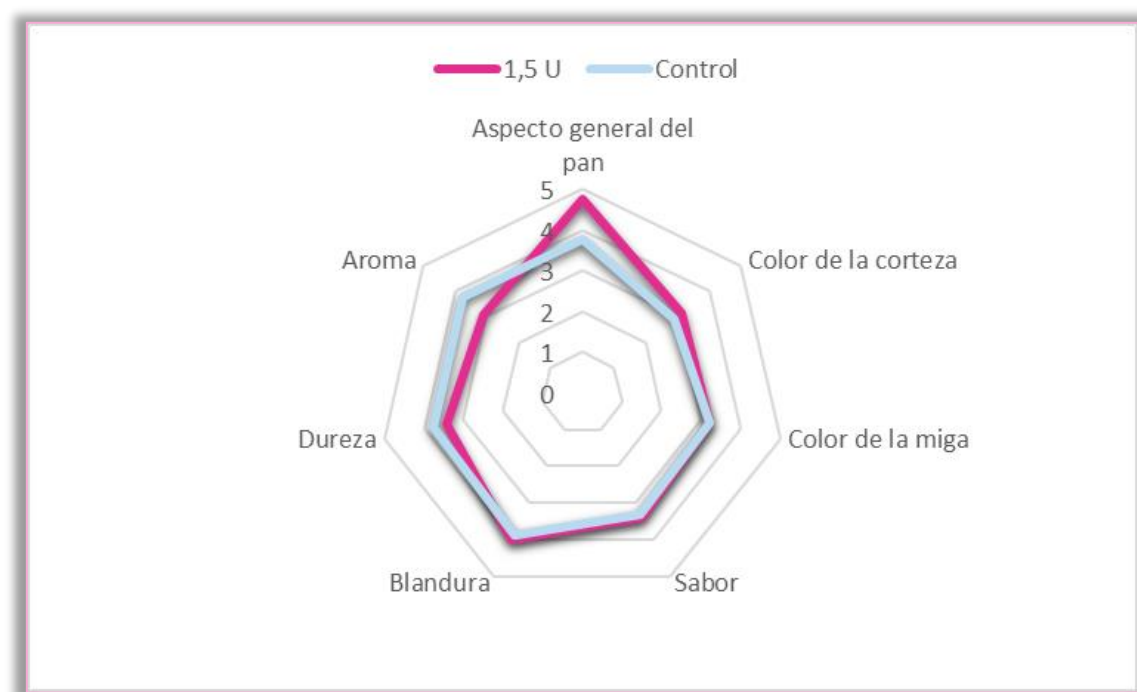


Figura 51: Resultados del análisis sensorial de panificados elaborados con 1,5 U de la enzima lacasa recombinante y control.

4.4.7.2 CATA

Cuando se realizó el test CATA y sus resultados fueron analizados aplicando la prueba Q de Cochran y post test de Bonferroni ($\alpha = 0,05$) se observó que, según las frecuencias de mención de las características, los panificados elaborados con 1,5 U de lacasa tuvieron un mayor número de menciones para los atributos sabor intenso y a cocido y las frecuencias de mención para persistencia de sabor, color y aroma, fueron más altas para los panificados controles. El sabor artificial fue evaluado de la misma manera en ambos panificados. Por su

parte, ninguno de los evaluadores detectó sabores o aromas desagradables en los panificados.

Estos resultados se muestran en la figura 52.

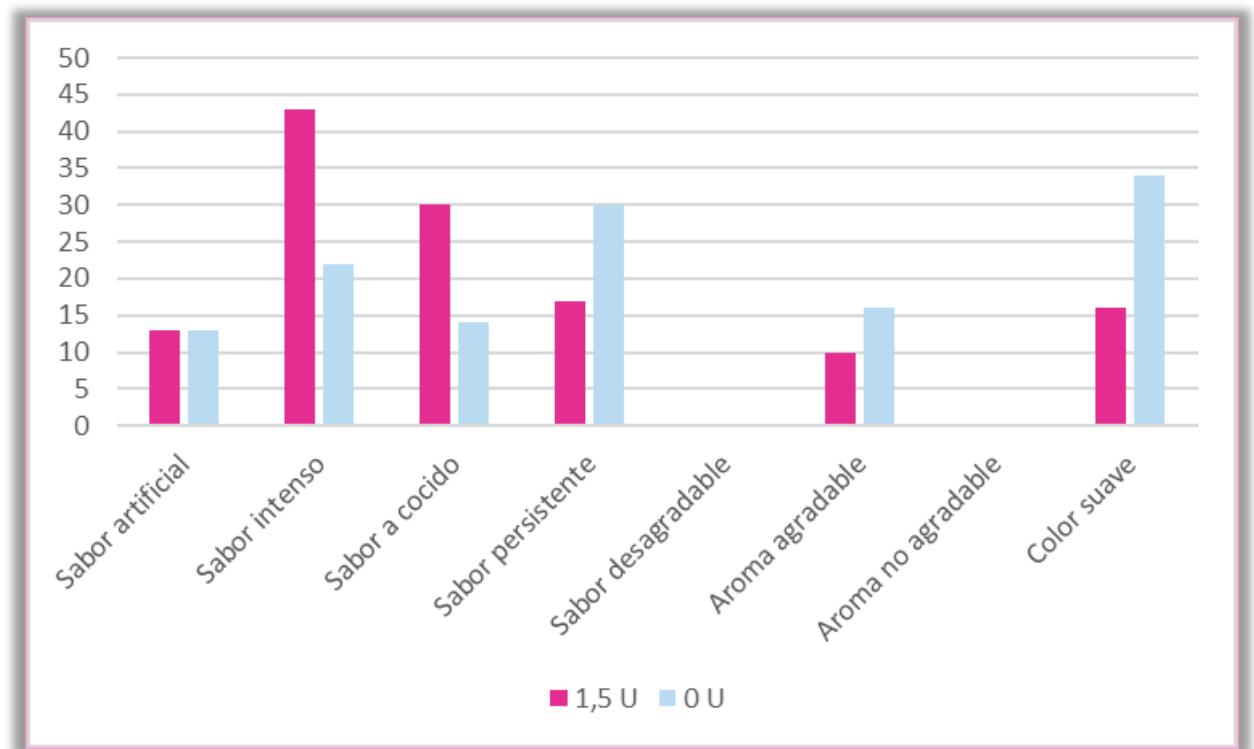


Figura 52: Gráfico de frecuencias para los descriptores color suave, sabor artificial, sabor intenso, sabor a cocido, sabor persistente, sabor desagradable, aroma agradable y aroma no agradable

4.5 DISCUSIÓN

En los últimos años, xilanasas y lacasas han atraído la atención en las industrias de alimentos y bebidas con el fin de ser utilizadas para realizar productos de alta calidad (Cândida de Queiroz Brito Cunha y col., 2018; Mayolo-Deloisa y col., 2020). Las enzimas microbianas desempeñan un papel importante en la industria alimentaria porque son más estables que las enzimas vegetales y animales (Raveendran y col., 2018).

4.5.1 Selección de la formulación para la elaboración de panificados

La etapa de selección de la receta de panificación involucró una evaluación completa de diversos factores, incluyendo la elección de harina, tipo de aceite y nivel de hidratación. Estos componentes son cruciales en la determinación de la textura, volumen, sabor y aroma de los panificados (Baire y col., 2018). La variedad de combinaciones ensayadas permitió explorar la interacción entre los ingredientes y ajustar las formulaciones para obtener productos con mejores características. La inclusión de ensayos sensoriales con un panel semi entrenado añadió una dimensión importante a la evaluación de las formulaciones. En este sentido, el análisis de atributos como el sabor, aroma, textura y aceptabilidad general permitió al panel semi entrenado validar la calidad sensorial de los panificados.

4.5.2 Propiedades físicas de los panificados

4.5.2.1 Volumen

El volumen específico de los panificados es uno de los parámetros más importantes que influyen en la calidad de estos productos (Nieter y col., 2016). En este trabajo, se observó

que los panificados elaborados con las enzimas xilanasa y lacasa recombinantes, aumentaron significativamente su volumen.

En este sentido, en las imágenes por microscopía se puede ver que la muestra elaborada a partir de 6 U de xilanasa presenta una mayor cantidad de vacuolas, lo que podría explicar el aumento en el volumen de los panificados elaborados a partir de dicha concentración de la enzima (Kim y col., 2001).

Las xilanasas tienen influencia en la capacidad de retención de gases de la masa de trigo y estabilizar su estructura. Zhan y col., (2014) observaron que los panificados aumentaban su volumen cuando eran suplementados con xilanasas recombinantes. Según nuestros resultados, la cantidad óptima de xilanasa fue 6 U, dado que con 9 U disminuyó el volumen de los panificados. Resultados similares se obtuvieron por Dornez y col., (2011), quienes además explicaron que un exceso en cuanto a la cantidad de esta enzima, tendría un efecto negativo en la manejabilidad de la masa. En este sentido, la optimización de la concentración de xilanasa podría ser importante para lograr el equilibrio deseado entre las propiedades del producto final y las preferencias sensoriales.

En el caso de la enzima lacasa, se ha informado que su adición a la masa provoca un efecto oxidante que mejora la resistencia de las estructuras del gluten y los productos horneados, aumentando así su volumen (Brijwani y col., 2010). En concordancia con nuestros hallazgos, Flander y col. (2008) reportaron un incremento en el volumen del pan usando lacasa en masas de avena y trigo y Ayala Soto y col. (2017) observaron un aumento del volumen en panificados libres de gluten como consecuencia de la adición de la enzima lacasa. Las imágenes obtenidas por microscopía de los panificados elaborados con 1,5 U de lacasa, muestran gránulos de almidón gelatinizados y una mayor cantidad de vacuolas, esto podría explicar, según Kim y col., (2001) el aumento en el volumen de los panificados elaborados con

dicha enzima. En este caso, la acción de la lacasa en la masa de pan está relacionada principalmente con la oxidación de compuestos fenólicos y las reacciones de polimerización que resultan de esta oxidación.

4.5.2.2 Color

La industria de los alimentos experimenta constantemente desafíos relacionados con la calidad y la seguridad de los productos. Entre estos, uno de los aspectos más importantes que se deben abordar es el cambio en el color de los alimentos durante el procesamiento y el almacenamiento, ya que puede afectar su aceptabilidad y la percepción sensorial por parte de los consumidores. En este sentido, el color de la corteza y la miga es un atributo importante del pan, que contribuye a la preferencia del consumidor (Seke, 2018).

Tras la liberación de xilosa a mediante el uso de xilanasa, se observó un aumento en los valores de a^* , BI , y L^* , contrariamente, los valores de b^* no aumentaron. Por su parte, la adición de la enzima lacasa resultó en una coloración con menos tonos rojos (a^*) y más brillo (L^*), y se conservaron los tonos amarillos de la corteza (b^*). En general, el pan con hidrocoloide añadido muestra una corteza más ligera (Culetu y col., 2021). De esta manera, los resultados observados al añadir tanto la enzima xilanasa como la enzima lacasa, relacionados a un aumento en las tonalidades marrones, puede atribuirse a un aumento de azúcares reductores producto de la acción de las enzimas, favoreciendo la reacción de Maillard (Wu y col., 2018) durante el proceso de cocción.

En lo que respecta a la diferencia de color en los panificados, para la enzima xilanasa se observó que los valores de ΔE en la corteza, suelo/base y lateral son significativamente más altos en la muestra con 6 U de enzima en comparación con las otras dos muestras (3 U y 9 U). De esta manera puede decirse que es conveniente encontrar el nivel adecuado de enzima para

lograr el equilibrio entre la mejora de las propiedades del pan y la apariencia visual del producto final.

En lo que respecta a la enzima lacasa, los valores de ΔE indican que hay una diferencia perceptible en el color entre las muestras de panificados con 1,5 U de esta enzima y las muestras sin ella. La corteza experimentó un cambio de color ligeramente mayor que la miga, lo que podría estar relacionado con la acción de la lacasa en la oxidación de compuestos fenólicos en la superficie del pan. Este tipo de análisis es importante para asegurar la calidad de los productos alimentarios.

4.5.3 Humedad

El contenido de humedad final de los panificados depende de la absorción de agua durante la preparación de la masa y la pérdida de agua durante la cocción. La morfología de la miga, también afecta fuertemente la tasa de transporte de agua (Krupa Kozak y col., 2012). Un exceso de humedad en los panificados podría propiciar el crecimiento de moho. Por el contrario, un contenido de humedad deficiente, puede hacer que el producto se torne seco y quebradizo.

En este trabajo, el agregado de las enzimas xilanasas y lacasas no tuvo un efecto significativo en cuanto al contenido de humedad en comparación con la muestra control. El agregado de dichas enzimas tiene un efecto notorio en la mejora de la calidad de la masa y la estructura del pan sin detectarse modificaciones en el contenido de agua del producto (O'Shea y col., 2016; Serventi y col., 2016). Para aumentar significativamente el contenido de humedad en un panificado, es más efectivo utilizar ingredientes con mayor capacidad de retener agua como emulsificantes o grasas (Tebben y col., 2018).

Por su parte, la pérdida de peso en los panificados está relacionada con el contenido de humedad inicial, ya que el horneado implica la evaporación del agua presente en la masa. La humedad juega un papel clave en la textura y la apariencia de los productos de panificación y puede influir en su calidad durante el almacenamiento.

4.5.4 Propiedades texturales de los panificados

La enzima xilanasa es ampliamente utilizada en la industria de la panificación para mejorar la calidad de panificados (Fernandes de Souza y col., 2022). Esta enzima es capaz de hidrolizar las hemicelulosas presentes en la pared celular de los granos de cereales como el trigo (Tebben y col., 2018). A partir de los arabinoxilanos presentes en las hemicelulosas, se forman moléculas de menor tamaño molecular con menor capacidad de retención del agua, minimizando su competencia con el gluten para retener el agua y la interferencia en la formación de la red del gluten durante el mezclado de la masa. Autio (2006) había propuesto que la fracción de arabinoxilanos no extraíble interfiere en la formación del gluten, formando intrusiones en las paredes celulares alrededor de las moléculas de gas formadas durante el proceso de fermentación.

En el presente trabajo, la aplicación de una xilanasa recombinante ha mostrado resultados prometedores: tuvo un efecto significativo reduciendo significativamente los parámetros de dureza y masticabilidad. La acción de la xilanasa en la hidrólisis de las hemicelulosas de la pared celular del trigo resulta en la ruptura de enlaces cruzados que se forman durante la formación de la red de gluten. Esta ruptura permite una disminución en la fuerza de la red, lo que se traduce en una reducción en la dureza del pan (Li y col., 2022). Por su parte, un aumento en la cohesividad en panes resulta significativo para el consumidor ya que resistirá mayores tensiones sin desgranarse, resultando panes más palatables y

permitiendo una mejor manipulación durante la preparación de los alimentos. Hallazgos relacionados a los parámetros de dureza y masticabilidad, fueron reportados recientemente por Li y col., (2022) quienes utilizaron una xilanasa GH8 para mejorar las propiedades de panificados. Sin embargo, estos autores reportaron un aumento en la resiliencia, cohesividad y elasticidad de los panificados y contrariamente a los resultados obtenidos en el presente trabajo, no se observaron variaciones para dichos parámetros.

El gluten es una red proteica elástica que le da al pan su estructura y elasticidad característica. La dureza y la masticabilidad están influenciadas principalmente por la formación de redes de gluten durante la fermentación y el horneado. Mediante la adición de la enzima lacasa, se observó una disminución significativa de la dureza y la masticabilidad. En concordancia con nuestros hallazgos, Serventi y col. (2016) informaron que la enzima lacasa condujo a una textura más suave y una disminución de la dureza en la calidad de panes elaborados a partir de harinas de trigo y mandioca, probablemente como resultado de la oxidación de polifenoles y/o arabinoxilanos. La reducción de la dureza implica un pan de miga más blando, generalmente más agradable al paladar del consumidor. Estos efectos de la enzima sobre los panificados pueden deberse principalmente al entrecruzamiento de las fracciones de gliadinas por la oxidación de tirosina triptófano y cisteína (Mattinen y col., 2006; Selinheimo y col., 2007), lo que generaría una mejor absorción y distribución del agua en la masa con una consecuente mejora en la estructura de la miga. Por otra parte, no se observaron efectos significativos sobre la elasticidad, la cohesividad y resiliencia mediante el agregado de la enzima lacasa. En este sentido, Caballero y col. (2007), reportaron que la enzima lacasa no tuvo una influencia significativa sobre las propiedades texturales de los panificados.

En lo que respecta a la firmeza del panificado, la adición durante el proceso de elaboración de ambas enzimas, xilanasa y lacasa, tuvo efectos notorios en este parámetro. Las reducciones de la firmeza observadas superaron el 37% para 3 U de xilanasa, y prácticamente se duplicaron cuando se utilizaron mayores concentraciones de xilanasa y lacasa, siendo estos resultados muy similares entre sí. Esto nos está indicando que la adición de enzimas afecta la estructura interna del pan.

4.5.5 Propiedades sensoriales de los panificados

Al analizar la aceptación de los panificados, se observó que las formulaciones con el agregado de la enzima xilanasa tuvo un impacto en las propiedades sensoriales. Al igual que los resultados obtenidos en el presente trabajo, Driss y col. (2012), utilizaron la enzima xilanasa GH11 purificada de *Penicillium occitanis*, como aditivo durante la mezcla de harinas de trigo y observaron mejoras significativas en las propiedades sensoriales y texturales de panificados. Los resultados obtenidos en la presente tesis, sugieren que la concentración de 6 U de xilanasa podría ser la más adecuada para mejorar la calidad sensorial del pan en términos de aspecto, color de la corteza, sabor, blandura y aroma. Estos hallazgos podrían ser de relevancia en la industria de la panificación para la optimización de productos con base en la acción de la xilanasa.

Por su parte, Vega Castro y col. (2015) demostraron mediante un análisis sensorial que no había diferencias significativas en los panificados elaborados con las enzimas lacasa y xilanasa respecto al control. En el presente trabajo, la adición de 1,5 U de lacasa en la formulación de panificados parece tener un impacto positivo en el aspecto general del pan sin afectar significativamente el sabor, la textura o el color de la miga, y aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en varios atributos, se observaron tendencias hacia

una corteza de color ligeramente mejorado, mayor blandura y menor dureza en el pan con lacasa.

4.6 CONCLUSIONES

En el presente estudio, se evaluó el impacto de la enzima xilanasa en los panificados elaborados con harina de trigo. Los resultados obtenidos revelaron cambios significativos en diversas propiedades de los panificados en relación con la concentración de la enzima utilizada. En este sentido, la incorporación de la enzima recombinante influye en las propiedades físicas, texturales y sensoriales de panificados elaborados con harina de trigo. Estos hallazgos sugieren que la xilanasa puede tener un efecto positivo en la expansión de la masa, y la textura de los panificados.

La incorporación de 6 y 9 U de la enzima xilanasa y de 1,5 U de la enzima lacasa en panificados a base de harina de trigo, mostró que esta enzima mejora propiedades físicas como el volumen disminuyendo la dureza y masticabilidad.

Este abordaje interdisciplinario que abarca la ingeniería genética aplicada en alimentos y la química, busca contribuir al conocimiento en la industria alimentaria al explorar y detallar los efectos de las enzimas recombinantes en los panificados, aportando conocimientos valiosos para la mejora de la calidad estos productos.

5 CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo, la enzima xilanasa recombinante obtenida a partir de un hongo autóctono de la provincia de Misiones, representa una herramienta prometedora para mejorar la calidad de los panificados, especialmente en términos de textura y estructura. Los beneficios observados en la disminución de la dureza y masticabilidad, y el aumento en la elasticidad y cohesividad, destacan la importancia de esta enzima en la industria de la panificación y abren oportunidades para la creación de productos de mayor calidad y aceptación por parte de los consumidores.

En lo que respecta a lacasa, este es el primer estudio que utiliza una enzima lacasa recombinante fúngica para mejorar la calidad de panificados.

Para poder utilizar estas enzimas industrialmente, se debe tener en cuenta su actividad. Si la actividad enzimática es alta, provocaría una hidrólisis muy extensa, dificultando el manejo de la masa. Además, deben reunir las condiciones de seguridad y cumplir con las normativas vigentes.

De esta manera, con un enfoque continuo en la investigación y la optimización de sus aplicaciones, las enzimas xilanasa y lacasa podrían convertirse en valiosas aliadas para la mejora de la industria de la panificación a nivel global.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

La aplicación de xilanasa en la panificación puede tener beneficios adicionales, como la mejora de la digestibilidad, lo que podría abordarse en futuras investigaciones para maximizar los beneficios en la utilización de esta enzima y asegurar la estabilidad y calidad de los productos finales.

Partiendo de la base que una miga más suave y elástica podría retener la frescura durante más tiempo, como proyección a estos conocimientos, nos proponemos estudiar la influencia de las enzimas recombinantes xilanasa y lacasa en la vida útil de los panificados.

Asimismo, xilanasas y lacasas purificadas, obtenidas en la presente tesis, presentan un amplio espectro de aplicaciones más allá de la elaboración de productos panificados, siendo útiles en áreas tan diversas como la producción de etanol, la industria papelera, el tratamiento de efluentes. De esta manera la versatilidad y capacidad para catalizar reacciones, convierten a estas enzimas recombinantes en herramientas prometedoras para diversas industrias y procesos biotecnológicos, contribuyendo así al desarrollo sostenible y la innovación.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2018). Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0190-z>
- Agrawal, K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2018). Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0190-z>
- Ahmad, Z., Butt, M. S., Ahmed, A., Riaz, M., Sabir, S. M., Farooq, U., & Rehman, F. U. (2014). Effect of *Aspergillus niger* xylanase on dough characteristics and bread quality attributes. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2445–2453. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0734-8>
- Ahmed, S., Riaz, S., & Jamil, A. (2009). Molecular cloning of fungal xylanases: An overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 19-35.
- Akpınar, M., & Öztürk Urek, R. (2017). Induction of fungal laccase production under solid state bioprocessing of new agroindustrial waste and its application on dye decolorization. *3 Biotech*, 7(2), 98. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0742-5>
- Ali, H. M.; El-Gizawy, A. M.; El-Bassiouny, R. E. I.; Saleh, M. A. (2016). The role of various amino acids in enzymatic browning process in potato tubers, and identifying the browning products. *Food Chemistry*. 192: 879–885
- Alnoch, R.C., Alves, G.S., Salgado, J.C.S., de Andrades, D., Freitas, E.N., Nogueira, K.M.V., Vici, A.C., Oliveira, D.P., Carvalho-Jr, V.P., Silva, R.N., Buckeridge, M.S., Michelin, M., Teixeira, J.A., & Polizeli, M.L.T.M. (2022). Immobilization and Application of the Recombinant Xylanase GH10 of *Malbranchea pulchella* in the Production of Xylooligosaccharides from Hydrothermal Liquor of the *Eucalyptus* (*Eucalyptus grandis*) Wood Chips. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13329. <https://doi.org/10.3390/ijms232113329>.
- Altinel, B., & Ünal, S. S. (2017). The effects of certain enzymes on the rheology of dough and the quality characteristics of bread prepared from wheat meal. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1628–1637.

- Andaleeb, H., Ullah, N., Falke, S., et al. (2020). High-resolution crystal structure and biochemical characterization of a GH11 endoxylanase from *Nectria haematococca*. *Scientific Reports*, 10, 15658. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72644-w>.
- Ares, G., & Varela, P. (2017a). Trained vs. consumer panels for analytical testing: Fueling a long lasting debate in the field. *Food Quality and Preference*, 61, 79–86.
- Ares, G., Antúnez, L., Bruzzone, F., Vidal, L., Giménez, A., Pineau, B., ... Jaeger, S. R. (2015). Comparison of sensory product profiles generated by trained assessors and consumers using CATA questions: Four case studies with complex and/or similar samples. *Food Quality and Preference*, 45, 75–86
- Ares, G., Jaeger, S. R., Bava, C. M., Chheang, S. L., Jin, D., Gimenez, A., Vidal, L., Fiszman, S. M., & Varela, P. (2013). CATA questions for sensory product characterization: Raising awareness of biases. *Food Quality and Preference*, 30(2), 114–127. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.04.012>.
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X. et al. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, 18, 200. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>
- Asis, A., Shahriar, S.A., Naher, L., et al. (2021). Identification patterns of *Trichoderma* strains using morphological characteristics, phylogenetic analyses and lignocellulolytic activities. *Molecular Biology Reports*, 48, 3285–3301. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06321-0>.
- Autio, K. (2006). Functional aspects of cereal cell-wall polysaccharides. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 159, 167.
- Ayala-Soto, F. E., Serna-Saldívar, S. O., & Welte-Chanes, J. (2017). Effect of arabinoxylans and laccase on batter rheology and quality of yeast-leavened gluten-free breads. *Journal of Cereal Science*, 73, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.11.003>
- Bae, H.J., Kim, H.J., & Kim, Y.S. (2008). Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. *Bioresource Technology*, 99(9), 3513–3519. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.064>.

- Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I., & Ninnekar, H. Z. (2017). Optimization of laccase production and its application in delignification of biomass. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 6(4), 351–365. <https://doi.org/10.1007/s40093-017-0184-4>
- Bajaj, B.K., & Manhas, K. (2012). Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(4), 330-337. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.07.003>.
- Balderas Hernández, V.E., Salas-Montantes, C.J., Barba-De la Rosa, A.P., & De Leon-Rodriguez, A. (2021). Autodisplay of an endo-1,4- β -xylanase from *Clostridium cellulovorans* in *Escherichia coli* for xylans degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 149, 109834. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109834>.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 215-242.
- Bamburowicz-Klimkowska, M., Kasprzak, A., Bystrzejewski, M., et al. (2023). Characteristics of glucose oxidase immobilized on carbon-encapsulated iron nanoparticles decorated with polyethyleneimine. *Polym. Bull.*, 80, 1565–1586. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04125-1>
- Bao, C., Li, J., Chen, H., et al. (2020). Expression and function of an Hac1-regulated multi-copy xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 10, 11686.
- Bao, S., Teng, Z., & Ding, S. (2013). Heterologous expression and characterization of a novel laccase isoenzyme with dyes decolorization potential from *Coprinus comatus*. *Molecular Biology Reports*, 40, 1927–1936. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2249-9>
- Barchuk, M. L. (2017). Caracterización bioquímica y genética de endoxilanasas secretadas por *Trichoderma* sp. nativos de Misiones para su utilización en el proceso de pretratamiento. (Tesis doctoral) https://rid.unam.edu.ar/bitstream/handle/20.500.12219/2368/BARCHUK%20M%C3%B3nica%20Lucrecia_2017_%20Caracterizaci%C3%B3n%20bioqu%C3%ADmica%20y%20gen%C3%A9tica....pdf

- Barchuk, M.L., Díaz, G.V., Coll, P.A.F., Velazquez, J.E., Fonseca, M.I., Villalba, L.L., & Zapata, P.D. (2016). Selection of *Trichoderma* Strain to Enhanced Cellulase-Poor Xylanase Production Using Sugarcane Bagasse as Sole Carbon Source under Light. *International Journal of Recent Biotechnology*, 4(2), 25-34.
- Basit, A., Liu, J., Miao, T., et al. (2018). Characterization of two endo- β -1,4-xylanases from *Myceliophthora thermophila* and their saccharification efficiencies, synergistic with commercial cellulase. *Frontiers in Microbiology*, 9, 233. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00233>.
- Basu, M., Kumar, V., & Shukla, P. (2018). Recombinant approaches for microbial xylanases: Recent advances and perspectives. *Current Protein and Peptide Science*, 19(1), 87-99.
- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Tinoco, R., Rojas-Trejo, S., Serrano-Carreón, L., & Trejo-Hernández, M. R. (2013). Induction of laccases in *Trametes versicolor* by aqueous wood extracts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 815-825. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1420-3>
- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Tinoco-Valencia, R., Rojas, S., Acosta-Urdapilleta, L., & Trejo-Hernández, R. (2015). Biochemical and molecular characterization of laccase isoforms produced by the white-rot fungus *Trametes versicolor* under submerged culture conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 339-347. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.10.009>
- Bhardwaj, N., Kumar, B., & Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases: An emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1). doi:10.1186/s40643-019-0276-2.
- Biely, P. (1993). Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. *Hemicellulose and Hemicellulases*, 29-51.
- Bock, J. E. (2015). Enzymes in breadmaking. In *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality* (pp. 181–198). doi:10.1016/b978-1-78242-285-3.00009-0

- Bonilla, J. C., Erturk, M. Y., Schaber, J. A., & Kokini, J. L. (2020). Distribution and function of LMW glutenins, HMW glutenins, and gliadins in wheat doughs analyzed with 'in situ' detection and quantitative imaging techniques. *Journal of Cereal Science*, 93, 102931.
- Boonrung, S., Katekaew, S., Mongkolthanaruk, W., Aimi, T., & Boonlue, S. (2016). Purification and characterization of low molecular weight extreme alkaline xylanase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* BF1-7. *Mycoscience*. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2016.07.003>
- Callejón, S., Sendra, R., Ferrer, S., & Pardo, I. (2017). Recombinant laccase from *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 with ability to degrade tyramine. *PLoS ONE*, 12(10), e0186019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186019>
- Cao, J., Xu, N., Zhang, J., Zhang, G., & Zhang, Y. (2023). Sonochemical Effects on the Preparation, Structure and Function of Gliadin-(–)-EpigalloCatechin 3-Gallate Conjugates. *Foods*, 12(7), 1376. <https://doi.org/10.3390/foods12071376>
- Cárdenas Mazón, N. V., Cevallos Hermida, C. E., Salazar Yacelga, J. C., Romero Machado, E. R., Gallegos Murillo, P. L., & Cáceres Mena, M. E. (2018). Uso de pruebas afectivas, discriminatorias y descriptivas de evaluación sensorial en el campo gastronómico. *Dominio de las Ciencias*, 4(3), 253-263. ISSN-e 2477-8818.
- Cauvain, S. P. (2003). *Bread making: Improving quality*. Cambridge, Inglaterra: Woodhead Publishing Ltd.
- Cauvain, S. P., & Young, L. S. (2008). *Bakery Food Manufacture and Quality: Water Control and Effects*. Stanley P. Cauvain and Linda S. Young. ISBN: 978-1-405-17613-2.
- Cayetano-Cruz, M., de los Santos, A. I. P., García-Huante, Y., Santiago-Hernández, A., Pavón-Orozco, P., López, V. E. L., & Hidalgo-Lara, M. E. (2016). High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia pastoris* cultured in a bioreactor with methanol as the sole carbon source: Purification and biochemical characterization of the enzyme. *Biochemical Engineering Journal*, 112, 161-169.

- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., & Srivastava, A. K. (2016). Bacterial xylanases: Biology to biotechnology. *3 Biotech*, 6(2), 150. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0457-z>.
- Chaudhary, N., & Malik, P. (2021). Wheat: Contribution to Healthy Diet and Health. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 266–274). DOI: 10.1201/9781003155508-2
- Chaudhary, S., Varma, A., Mandal, M., Prasad, R., & Porwal, S. (2023). Isolation and Characterization of a Novel Laccase-Producing Bacteria *Bhargavaea beijingensis* from Paper and Pulp Effluent-Treated Soil Using In Silico Approaches. *Current Microbiology*, 80(8), 241. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03346-5>
- Chávez, R., Navarro, C., Calderón, I., Peirano, A., Bull, P., & Eyzaguirre, J. (2002). Secretion of endoxylanase A from *Penicillium purpurogenum* by *Saccharomyces cerevisiae* transformed with genomic fungal DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 212(2), 237-241.
- Chen, K., & Arnold, F. H. (2020). Engineering new catalytic activities in enzymes. *Nature Catalysis*, 3, 203–213. <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0385-5>
- Cheng-Di Dong, Ashutosh Tiwari, Grace Sathyanesan Anisha, Chiu-Wen Chen, Anusuiya Singh, Dibyajyoti Haldar, Anil Kumar Patel, Reeta Rani Singhania (2023). Laccase: A potential biocatalyst for pollutant degradation. *Environmental Pollution*, 319, 120999. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.120999>
- Chmelová, D., Legerská, B., & Kunstová, J. (2022). The production of laccases by white-rot fungi under solid-state fermentation conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38, 21. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03207-y>
- Crowe, J. D., & Olsson, S. (2001). Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2088–2094. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2088-2094.2001>
- Culetu, A., Duta, D. E., Papageorgiou, M., & Varzakas, T. (2021). The Role of Hydrocolloids in Gluten-Free Bread and Pasta; Rheology, Characteristics, Staling and Glycemic Index. *Foods* (Basel, Switzerland), 10(12), 3121. <https://doi.org/10.3390/foods10123121>

- D'Souza, T.M., Boominathan, K. and Reddy, C.A. (1996). Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3739–3744.
- Da Mota Zanella, V., Mireles Mendoza, C., Camarena Aguilar, E., & Bautista Justo, M. (2005). Efecto del uso de masas congeladas sobre las características y textura en pan blanco. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 13, 456–465.
- Dai, Y., & Tyl, C. (2021). A review on mechanistic aspects of individual versus combined uses of enzymes as clean label-friendly dough conditioners in breads. *Journal of Food Science*, 86(5), 1583–1598. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15713>
- Daud, Z., Ismail, A., & Sarmadi, B. (2016). Ascorbic acid: Physiology and health effects. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 266–274). Oxford Academic Press.
- De Brabander, P., Uitterhaegen, E., Delmulle, T., De Winter, K., & Soetaert, W. (2023). Challenges and progress towards industrial recombinant protein production in yeasts: A review. *Biotechnology Advances*, 64, 108121. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108121>
- Del Cerro, C., Erickson, E., Dong, T., Wong, A. R., Eder, E. K., Purvine, S. O., ... Salvachúa, D. (2021). Intracellular pathways for lignin catabolism in white-rot fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(9), e2017381118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017381118>
- Deng, P., Li, D., Cao, Y., Lu, W., & Wang, C. (2006). Cloning of a gene encoding an acidophilic endo- β -1,4-xylanase obtained from *Aspergillus niger* CGMCC1067 and constitutive expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(5), 1096-1102.
- Dey, P., & Roy, A. (2018). Molecular structure and catalytic mechanism of fungal family G acidophilic xylanases. *3 Biotech*, 8, 78.
- Dhaver, P., Pletschke, B., Sithole, B., et al. (2022). Optimization, purification, and characterization of xylanase production by a newly isolated *Trichoderma harzianum* strain by a two-step statistical experimental design strategy. *Scientific Reports*, 12, 17791. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22723-x>.

- Dhiman, S., & Mukherjee, G. (2018). Recent Advances and Industrial Applications of Microbial Xylanases: A Review. In *Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives* (pp. 329-348). Springer, Singapore.
- Díaz Molins, Pedro. (2009). Calidad y deterioro de platos “sous vide” preparados a base de carne y pescado almacenados en refrigeración.
- Diaz-Bustamante, M. L., Keppler, J. K., Reyes, L. H., & Alvarez Solano, O. A. (2023). Trends and prospects in dairy protein replacement in yogurt and cheese. *Heliyon*, 9(6), e16974. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16974>
- Dong, Y., & Karboune, S. (2021). A review of bread qualities and current strategies for bread bioprotection: Flavor, sensory, rheological, and textural attributes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1937–1981. doi:10.1111/1541-4337.12717
- Dornez, E., Verjans, P., Arnaut, F., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2011). Use of psychrophilic xylanases provides insight into the xylanase functionality in bread making. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(17), 9553–9562. <https://doi.org/10.1021/jf201752g>
- Durán-Sequeda, D., Suspes, D., Maestre, E., Alfaro, M., Perez, G., Ramírez, L., Pisabarro, A. G., & Sierra, R. (2021). Effect of Nutritional Factors and Copper on the Regulation of Laccase Enzyme Production in *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Fungi*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.3390/jof8010007>
- Eggert, C., Temp, U., & Eriksson, E. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1151–1158.
- El-Sohaimy, S. A., Shehata, M. G., Mehany, T., & Zeitoun, M. A. (2019). Nutritional, Physicochemical, and Sensorial Evaluation of Flat Bread Supplemented with Quinoa Flour. *International journal of food science*, 2019, 4686727. <https://doi.org/10.1155/2019/4686727>
- Ezike, T. C., Udeh, J. O., Joshua, P. E., Ezugwu, A. L., Isiwu, C. V., Eze, S. O. O., Chilaka, F. C., & Isiwu, C. V. (2021). Substrate specificity of a new laccase from *Trametes polyzona* WRF03. *Heliyon*, 7(1), e06080. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06080>

- Fernandes de Souza, H., Aguiar Borges, L., Di Próspero Gonçalves, V. D., dos Santos, J. V., Bessa, M. S., Carosia, M. F., ... Kamimura, E. S. (2022). Recent advances in the application of xylanases in the food industry and production by actinobacteria: A review. *Food Research International*, 162(B), 112103. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112103>
- Fernandez, P., & Carvalho, F. (2023). Microbial enzymes used in the food industry. In *Biotechnology of Microbial Enzymes* (pp. 445–496). DOI: 10.1016/B978-0-443-19059-9.00009-8
- Flander, L., Holopainen, U., Kruus, K., & Buchert, J. (2011). Effects of tyrosinase and laccase on oat proteins and quality parameters of gluten-free oat breads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8385–8390.
- Fonseca, M. I., Farina, J. I., Castrillo, M. L., Rodríguez, D., Nuñez, C. E., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2014). Biopulping of wood chips with *Phlebia brevispora* BAFC 633 reduces lignin content and improves pulp quality. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90, 29–35.
- Fonseca, M. I., Fariña, J. I., Sanabria, N. I., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2013). *BioResources*, 8(2), 2855-2866.
- Fonseca, M. I., Molina, M. A., Winnik, D. L., Busi, M. V., Fariña, J. I., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2018). Isolation of a laccase coding gene from the lignin-degrading fungus *Phlebia brevispora* BAFC 633 and heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1454–1468. <https://doi.org/10.1111/jam.13720>
- Forootanfar, H., & Faramarzi, M. A. (2015). Insights into laccase producing organisms, fermentation states, purification strategies, and biotechnological applications. *Biotechnology Progress*, 31, 1443–1463. <https://doi.org/10.1002/btpr.2173>
- Freeman, C. J., Nayar, G. P., Begley, P. T., & Villafranca, J. J. (1993). Stoichiometry and spectroscopic identity of copper centers in phenoxazinone synthase. *Biochemistry*, 32, 4826-4830.
- Fuzi, S. F. Z. M., Mahadi, N. M., Jahim, J. M., Murad, A. M. A., Bakar, F. D. A., Jusoh, M., ... Illias, R. M. (2011). Development and validation of a medium for recombinant endo- β -1,4-xylanase production by *Kluyveromyces lactis* using a statistical experimental design. *Annals of Microbiology*, 62(1), 283–292. doi:10.1007/s13213-011-0258-x.

- Fuzi, S. F. Z. M., Razali, F., Jahim, J. M., Rahman, R. A., & Illias, R. M. (2014). Simplified feeding strategies for the fed-batch cultivation of *Kluyveromyces lactis* GG799 for enhanced recombinant xylanase production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(9), 1887–1898. doi:10.1007/s00449-014-1163-z.
- Gerits, L. R., Pareyt, B., & Delcour, J. A. (2014). A lipase based approach for studying the role of wheat lipids in bread making. *Food Chemistry*, 156, 190–196.
- Ghaffar, A., Khan, S. A., Mukhtar, Z., Rajoka, M. I., & Latif, F. (2011). Heterologous expression of a gene for thermostable xylanase from *Chaetomium thermophilum* in *Pichia pastoris* GS115. *Molecular Biology Reports*, 38(5), 3227-3233.
- Gioia, L., Ganancio, J., & Steel, C. (2017). Food additives and processing aids used in breadmaking. In *Food Additives* (pp. 147–166). IntechOpen.
- Goel, S., Singh, M., Grewal, S., Razzaq, A., & Wani, S. (2021). Wheat Proteins: A Valuable Resource to Improve Nutritional Value of Bread. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.769681>
- Goesaert, H., Bris, K., Veraberbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., & Delcour, J. A. (2005). Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1), 12-30.
- Guan, Z. B., Luo, Q., Wang, H. R., et al. (2018). Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 3569–3592. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2883-z>
- Gutiérrez-Antón, M., Santiago-Hernández, A., Rodríguez-Mendoza, J., et al. (2023). Improvement of Laccase Production by *Thielavia terrestris* Co3Bag1. *Journal of Fungi*, 9(3), 308. <https://doi.org/10.3390/jof9030308>
- Hahn, V. (2023). Potential of the enzyme laccase for the synthesis and derivatization of antimicrobial compounds. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 39(4), 107. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03539-x>

- Heinen, P. R., Betini, J. H. A., & Polizeli, M. L. T. M. (2019). Xylanases. In *Encyclopedia of Microbiology* (Fourth Edition) (pp. 604-615). Academic Press. ISBN 9780128117378.
- Henrissat, B., & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(5), 637-644.
- Heredia-Sandoval, N., Valencia-Tapia, M., Calderón de la Barca, A., & Islas-Rubio, A. (2016). Microbial Proteases in Baked Goods: Modification of Gluten and Effects on Immunogenicity and Product Quality. *Foods*, 5(4), 59. doi:10.3390/foods5030059
- Hleap, J. H., & Velasco, V. A. (2010). Análisis de las propiedades de textura durante el almacenamiento de salchichas elaboradas a partir de tilapia roja (*Oreochromis* sp.). *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 8(2), 46–56
- Huang, R., Ding, Q., Xiang, Y., Gu, T., & Li, Y. (2016). Comparative Analysis of DNA Methyltransferase Gene Family in Fungi: A Focus on Basidiomycota. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1556. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01556>
- Iqbal, S., Arif, S., Khurshid, S., Iqbal, H. M., Akbar, Q. U., Ali, T. M., & Mohiuddin, S. (2023). A combined use of different functional additives for improvement of wheat flour quality for bread making. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 103(7), 3261-3271. doi:10.1002/jsfa.12508
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkotazka, A., & Paszczyński, A. (2020). Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 966. <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>
- Jiamyangyuen, S., Srijesaruk, V., & Harper, W. J. (2005). Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27(1), 55-64.
- Jiang, Z., Cong, Q., Yan, Q., Kumar, N., & Du, X. (2010). Characterisation of a thermostable xylanase from *Chaetomium* sp. and its application in Chinese steamed bread. *Food Chemistry*, 120(2), 457-462.
- Joshi, J. B., Priyadarshini, R., & Uthandi, S. (2022). Glycosyl hydrolase 11 (xynA) gene with xylanase activity from thermophilic bacteria isolated from thermal springs. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 62.

- Juturu, V., & Wu, J. C. (2012). Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1219-1227.
- Kilaru, S., Hoegger, P. J., & Kües, U. (2006). The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Current Genetics*, 50(1), 45–60. <https://doi.org/10.1007/s00294-006-0074-1>
- Kim, H. J., & Kim, H. J. (2016). Yeast as an expression system for producing virus-like particles: What factors do we need to consider? *Letters in Applied Microbiology*, 64, 111–123.
- Kim, H.-J., Morita, N., Lee, S.-H., & Moon, K.-D. (2003). Scanning electron microscopic observations of dough and bread supplemented with *Gastrodia elata* Blume powder. *Food Research International*, 36, 387-397. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00231-4](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00231-4).
- Kiribayeva, A., Mukanov, B., Silayev, D., Akishev, Z., Ramankulov, Y., & Khasenov, B. (2022). Cloning, expression, and characterization of a recombinant xylanase from *Bacillus sonorensis* T6. *PLoS One*, 17(3), e0265647.
- Knob, A., & Carmona, E.C. (2010). Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: A novel acidophilic xylanase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 429–443. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8731-8>.
- Knob, A., Beitel, S.M., Fortkamp, D., Terrasan, C.R.F., & De Almeida, A.F. (2013). Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. *Biomed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/728735>.
- Köppl, C., Lingg, N., Fischer, A., et al. (2022). Fusion tag design influences soluble recombinant protein production in *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7678. <https://doi.org/10.3390/ijms23147678>
- Kumar, A., & Naraian, R. (2019). Differential Expression of the Microbial β -1, 4-Xylanase, and β -1, 4-Endoglucanase Genes. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 95-111). Elsevier.

- Kumar, D., Kumar, S., Kumar, J., & Kumar, O. (2017). Xylanases and their industrial applications: A review. *Biochemical and Cellular Archives*, 17, 353-360.
- Kunamneni, A., Plou, F.J., Alcalde, M., & Ballesteros, A. (2014). Trichoderma Enzymes for Food Industries. In V.K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R.S. Upadhyay, I. Druzhinina, & M.G. Tuohy (Eds.), *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (pp. 339-344). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00024-2>.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Li, F., Li, T., Zhao, J., Fan, M., Qian, H., Li, Y., & Wang, L. (2023). Entanglement between Water Un-Extractable Arabinoxylan and Gliadin or Glutenins Induced a More Fragile and Soft Gluten Network Structure. *Foods*, 12(9), 1800. doi:10.3390/foods12091800
- Li, M., Deng, H., Ma, R., Luo, H., Yao, B., & Su, X. (2018). Biochemical and mutational analyses of a *Trametes pyranose oxidase* and comparison of its mutants in breadmaking. *AMB Express*, 8(1), 38. doi:10.1186/s13568-018-0570-y
- Li, Q., Xie, J., Zhao, L., Xue, Q., & Pei, J. (2013). Optimization of fermentation conditions for laccase production by recombinant *Pichia pastoris* GS115-LCCA using response surface methodology and its application to dye decolorization. *BioResources*, 8(3), 4072–4087. <https://doi.org/10.15376/biores.8.3.4072-4087>
- Lin, W., Zhang, D., Huang, J., et al. (2023). Expression and characterization of a maltogenic amylase from *Lactobacillus plantarum* in *Escherichia coli* and its application in extending bread shelf life. *Systematic Microbiology and Biomanufacturing*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s43393-022-00155-y>
- Lopez, J. A. (2013). Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y reológicas del pandebono formulado con emulsificantes y componentes fisiológicamente activos. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.

- Maestre-Reyna, M., Liu, W. C., Jeng, W. Y., Lee, C. C., Hsu, C. A., Wen, T. N., ... Shyur, L. F. (2015). Structural and functional roles of glycosylation in fungal laccase from *Lentinus* sp. *PLoS One*, 10(4), e0120601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120601>
- Mahilraj, S., Balakumar, S., & Vasanthy, A. (2014). Kinetic properties of the purified xylanase from *Bacillus pumilus*.
- Mahuri, M., Paul, M., & Thatoi, H. (2023). A review of microbial laccase production and activity toward different biotechnological applications. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. <https://doi.org/10.1007/s43393-023-00163-6>
- Manfugás, J. E. (2020). Evaluación sensorial de los alimentos. Editorial Universitaria (Cuba).
- Manhivi, V. E., Amonsou, E. O., & Kudanga, T. (2020). Transglutaminase and tyrosinase as potential cross-linking tools for the improvement of rheological properties of gluten-free amadumbe dough. *International Journal of Food Science & Technology*, 55, 2399–2407.
- Marino, I., Pignataro, E., Danzi, D., et al. (2022). A comparative screening of laccase-mediator systems by white-rot fungi laccases for biocatalytic benzyl alcohol oxidation. *Scientific Reports*, 12, 21602. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24839-6>
- Markovic, I., Ilic, J., Markovic, D., Simonovic, V., & Kosanic, N. (2013). Color measurement of food products using CIE Lab* and RGB color space. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 4, 50–53.
- Martins, L. O., Melo, E. P., Sanchez-Amat, A., & Robalo, M. P. (2020). Bacterial Laccases: Some Recent Advances and Applications. In D. Schlosser (Ed.), *Laccases in Bioremediation and Waste Valorisation* (pp. 17-35). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-47906-0_2
- Mate, D. M., & Alcalde, M. (2017). Laccase: A multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 10, 1457–1467. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12422>
- Mathias-Rettig, K., & Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos: un criterio de calidad medible. *Agro Sur*, 42(2), 57–66. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2014.v42n2-07>

- Mayolo-Deloisa, K., González-González, M., & Rito-Palomares, M. (2020). Laccases in the food industry: Bioprocessing, potential industrial and biotechnological applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 222. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00222>
- Melis, S., & Delcour, J. A. (2020). Impact of wheat endogenous lipids on the quality of fresh bread: Key terms, concepts, and underlying mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19, 3715–3754.
- Melis, S., Meza Morales, W. R., & Delcour, J. A. (2019). Lipases in wheat flour bread making: Importance of an appropriate balance between wheat endogenous lipids and their enzymatically released hydrolysis products. *Food Chemistry*, 298, 125002.
- Mendonça, M., Barroca, M., & Collins, T. (2023). Endo-1,4- β -xylanase-containing glycoside hydrolase families: Characteristics, singularities and similarities. *Biotechnology Advances*, 65, 108148.
- Meng, Q. S., Zhang, F., Liu, C. G., Bai, F. W., & Zhao, X. Q. (2021). Measurement of cellulase and xylanase activities in *Trichoderma reesei*. In *Trichoderma reesei* (pp. 1-11). Humana.
- Mettler Toledo. (2015). Drying oven vs. halogen moisture analyzer: a practical guide to compare methods. Greifensee: Mettler Toledo.
- Meyners, M., Castura, J. C., & Carr, B. T. (2013). Existing and new approaches for the analysis of CATA data. *Food Quality and Preference*, 30, 309–319.
- Miguel, Â., Martins-Meyer, T., Figueiredo, É., Lobo, B., Dellamora-Ortiz, G. (2013). Enzymes in Bakery: Current and Future Trends. 10.5772/53168.
- Miller GL. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* 31(3): 426-428.
- Molina, M. A., Cazzaniga, A., Milde, L. B., Sgroppo, S. C., Zapata, P. D., & Fonseca, M. I. (2023). Purification and characterization of a fungal laccase expressed in *Kluyveromyces lactis* suitable for baking. *Journal of Food Science*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16497>
- Moussaoui, K. A., & Varela, P. (2010). Exploring consumer product profiling techniques and their linkage to a quantitative descriptive analysis. *Food Quality and Preference*, 21, 1088–1099.

- Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2010). Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. *Food and Bioprocess Technology*.
- Murugan, S., Arnold, D., Pongiya, U., & Narayanan, P. M. (2011). Production of xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 using sawdust as substrate under solid state fermentation. *Enzyme Research*.
- Murugesan, K., Nam, I. H., Kim, Y. M., & Chang, Y. S. (2007). Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1662–1672.
- Nieter, A., Kelle, S., Takenberg, M., Linke, D., Bunzel, M., Popper, L., & Berger, R. G. (2016). Heterologous production and characterization of a chlorogenic acid esterase from *Ustilago maydis* with a potential use in baking. *Food Chemistry*, 209, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.106>
- Osborne, T. (1970). The Proteins of the wheat. Kernel Carnegie Institute. Publisher Washington. Publications 84, p 235-237.
- Othman, A. M., Elsayed, M. A., Elshafei, A. M., & Hassan, M. M. (2018). Purification and biochemical characterization of two isolated laccase isoforms from *Agaricus bisporus* CU13 and their potency in dye decolorization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1142–1148. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.043>
- Owczarek, B., Gerszberg, A., & Hnatuszko-Konka, K. (2019). A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. *Biomedical Research International*, 2019, 1–13. doi: 10.1155/2019/4216060
- P. Mazumder, B. S. Roopa, & S. Bhattacharya, Textural attributes of a model snack food at different moisture contents. *Journal of Food Engineering*, 79 (2007) 511–516. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.011>.
- Paës, G., Berrin, J. G., & Beaugrand, J. (2012). GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology Advances*, 30(3), 564-592.

- Pareyt, B., Finnie, S. M., Putseys, J. A., & Delcour, J. A. (2011). Lipids in bread making: Sources, interactions, and impact on bread quality. *Journal of Cereal Science*, 54, 266-279. doi:10.1016/j.jcs.2011.08.011
- Park, S. W., Kang, B. H., Lee, H. M., et al. (2021). Efficient brazzein production in yeast (*Kluyveromyces lactis*) using a chemically defined medium. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44, 913-925.
- Patel, H., Gupte, A., & Gupte, S. (2009). Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioResources*, 4(1), 268–284.
- Pezzella, C., Guarino, L., & Piscitelli, A. (2015). How to enjoy laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(5), 923–940. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1823-9>
- Pires, M. A., Pastrana, L. M., Fuciños, P., Abreu, C. S., & Oliveira, S. M. (2020). Sensorial Perception of Astringency: Oral Mechanisms and Current Analysis Methods. *Foods*, 9(8), 1124. <https://doi.org/10.3390/foods9081124>.
- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., & Faraco, V. (2011). Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics*, 12, 104–112.
- Polyakov, K. M., Gavryushov, S., Ivanova, S., et al. Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: Insights into the reaction mechanism.
- Pooalai, R., Khongfak, S., Leungtongkam, U., et al. (2022). Genomic analysis uncovers laccase-coding genes and biosynthetic gene clusters encoding antimicrobial compounds in laccase-producing *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 12, 11932. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16122-5>
- Pourmohammadi, O., Hosseini Ghaboos, S. H., & Jafarian, S. (2020). Physicochemical, rheological, and sensorial properties of bread supplemented with pumpkin powder and basil seed gum. *Journal of Food Processing and Preservation*. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14739>

- Preethi, P. S., Gomathi, A., Srinivasan, R., Pavan Kumar, J. G. S., Murugesan, K., & Kodiveri Muthukailannan, G. (2020). Laccase: Recombinant expression, engineering and its promising applications. In N. Arora, J. Mishra, & V. Mishra (Eds.), *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries* (pp. 27-42). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_3
- Rahman, M., Islam, R., Hasan, S., Zzaman, W., Rana, M. R., Ahmed, S., Roy, M., Sayem, A., Matin, A., Raposo, A., Zandonadi, R. P., Botelho, R. B. A., & Sunny, A. R. (2022). A Comprehensive Review on Bio-Preservation of Bread: An Approach to Adopt Wholesome Strategies. *Foods* (Basel, Switzerland), 11(3), 319. <https://doi.org/10.3390/foods11030319>
- Raimondi, S., Zanni, E., Amaretti, A., Palleschi, C., Uccelletti, D., & Rossi, M. (2013). Thermal adaptability of *Kluyveromyces marxianus* in recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-34>
- Rangel, D. E., Braga, G. U., Fernandes, É. K., Keyser, C. A., Hallsworth, J. E., Roberts, D. W. (2015). Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Current Genetics*, 61(3), 383-404.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., & Pandey, A. (2018). Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16-30. doi:10.17113/ftb.56.01.18.5491
- Rodrigues, B., Peinado, J. M., Raposo, S., Constantino, A., Quintas, C., & Lima-Costa, M. E. (2015). Kinetic and energetic parameters of carob wastes fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Crabtree effect, ethanol toxicity, and invertase repression. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 837–844.
- Różyło, R., Laskowski, J. (2011). Predicting Bread Quality (Bread Loaf Volume and Crumb Texture). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(1), –. doi:10.2478/v10222-011-0006-8
- Sakamoto, Y., Nakade, K., Yoshida, K., et al. (2015). Grouping of multicopper oxidases in *Lentinula edodes* by sequence similarities and expression patterns. *AMB Express*, 5(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0151-2>

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandoval-Denis, M., Sutton, D. A., Cano-Lira, J. F., Gené, J., Fothergill, A. W., Wiederhold, N. P., & Guarro, J. (2014). Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), 2112–2125.
- Santos, B. A., Campagnol, P. C. B., Cruz, A. G., Galvão, M. T. E. L., Monteiro, R. A., Wagner, R., & Pollonio, M. A. R. (2015). Check all that apply and free listing to describe the sensory characteristics of low sodium dry fermented sausages: Comparison with trained panel. *Food Research International*, 76, 725–734.
- Stone, H., & Sidel, J. (2004). *Sensory evaluation practices* (3rd edition). New York: Academic Press
- Santos, C.R., Hoffmann, Z.B., De Matos Martins, V.P., Zanphorlin, L.M., De Paula Assis, L.H., Honorato, R.V., De Oliveira, P.S.L., Ruller, R., Murakami, M.T. (2014). Molecular mechanisms associated with xylan degradation by xanthomonas plant pathogens. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 32186–32200. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.605105>.
- Savinova, O. S., Moiseenko, K. V., Vavilova, E. A., et al. (2019). Evolutionary relationships between the laccase genes of Polyporales: Orthology-based classification of laccase isozymes and functional insight from *Trametes hirsuta*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 152. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00152>
- Selinheimo, E., Autio, K., Kruus, K., & Buchert, J. (2007). Elucidating the Mechanism of Laccase and Tyrosinase in Wheat Bread Making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6357–6365. doi:10.1021/jf0703349
- Shah, A. R., & Madamwar, D. (2005). Xylanase production by a newly isolated *A. foetidus* strain and its characterization. *Process Biochemistry*, 40, 763–777.
- Sheikholeslami, Z., Mahfouzi, M., Karimi, M., Hejrani, T., Ghiafehdavoodi, M., & Ghodsi, M. (2021). Evaluating the traditional bread properties with new formula: Affected by triticale and cress seed gum. *Food Science and Technology International*, 27(5), 413–425. <https://doi.org/10.1177/1082013220961777>

- Shengli, Y., Zhongshan, L., Shengzhou, C., Sheng, H., Qingwei, M., Congcong, L., Yi, L., & Guoqing, H. (2009). Production of Beer with a Genetically Engineered Strain of *S. cerevisiae* with Modified Beta Glucanase Expression. *Journal of The Institute of Brewing*, 115, 361-367.
- Shevkani, K., & Chourasia, S. (2021). Dietary Proteins: Functions, Health Benefits and Healthy Aging. In Rattan, S. I. S., & Kaur, G. (Eds.), *Nutrition, Food and Diet in Ageing and Longevity* (pp. 1-20). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-83017-5_1
- Shewry, P. R., & Hey, S. J. (2015). The Contribution of Wheat to Human Diet and Health. *Food and Energy Security*, 4, 178–202. doi:10.1002/fes3.64
- Shi, H., Zhang, Y., Li, X., et al. (2013). A novel highly thermostable xylanase stimulated by Ca²⁺ from *Thermotoga thermarum*: cloning, expression and characterization. *Biotechnology and Biofuels*, 6, 26.
- Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, Kumar A. (2011). Laccase: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Research*, 2011, 217861. <https://doi.org/10.4061/2011/217861>
- Shylesha, B. S., Mariswamy, M., Ramanath, S., & Yoganandamurthy, V. N. (2021). Production, Purification and Characterization of Xylanase Enzyme from *Bacillus* sp in Solid State Fermentation. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 9(7), 640-648.
- Singh, S., Sidhu, G. K., Kumar, V., Dhanjal, D. S., Datta, S., & Singh, J. (2019). Fungal Xylanases: Sources, Types, and Biotechnological Applications. In *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi* (pp. 329-348). Fungal Biology. Springer.
- Sjaarda, C. P., Abubaker, K. S., & Castle, A. J. (2015). Induction of lcc2 expression and activity by *Agaricus bisporus* provides defense against *Trichoderma aggressivum* toxic extracts. *Microbial Biotechnology*, 8(6), 918–929. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12277>
- Spohner, S. C., Schaum, V., Quitmann, H., & Czermak, P. (2016). *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 222, 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.023>

- Spohner, S. C., Schaum, V., Quitmann, H., & Czermak, P. (2016). *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 222, 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec>
- Strausberg, R. L., & Strausberg, S. L. (2001). Overview of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Protocols in Protein Science*, Chapter 5, Unit 5.6.
- Struyf, N., Verspreet, J., Verstrepen, K., & Courtin, C. (2017). Investigating the impact of α -amylase, α -glucosidase and glucoamylase action on yeast-mediated bread dough fermentation and bread sugar levels. *Journal of Cereal Science*, 75, 10.1016/j.jcs.2017.03.013.
- Su, L., Yang, Y., & Wu, J. (2020). Recombinant expression, characterization and application of maltotetraohydrolase from *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(8), 3456–3464. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10381>
- Subajini Mahilrajan, Sandrasegarampillai Balakumar, & Vasanthy Arasaratnam (2014). Effect of Selected Polyols And Salts on Stability of Xylanase Produced By *Bacillus pumilus*. *Proceedings of Jaffna University International Research Conference*.
- Surmacka Szczesniak, A. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13(4), 215-225. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(01\)00039-8](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(01)00039-8).
- Taylor, A. B., Stoj, C. S., Ziegler, L., Kosman, D. J., & Hart, P. J. (2005). The copper iron connection in biology: Structure of the metallooxidase Fet3p. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 15459-15464.
- Tebben, L., Chen, G., Tilley, M., & Li, Y. (2020). Individual effects of enzymes and vital wheat gluten on whole wheat dough and bread properties. *Journal of Food Science*, 85, 4201–4208.
- Tebben, L., Shen, Y., & Li, Y. (2018). Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 10–24.
- Thomas, L., Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2015). Production of an alkaline xylanase from recombinant *Kluyveromyces lactis* (KY1) by submerged fermentation and its application in bio-bleaching. *Biochemical Engineering Journal*, 102, 24-30.

- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19-26.
- Tien, M., & Kirk, T. K. (1983). Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science*, 221, 661-663.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D. H., et al. (2004). Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the "secrets" of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 207-233.
- Torronen, A., & Rouvinen, J. (1997). Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4- β -xylanases. *Journal of Biotechnology*, 57, 137-149.
- Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 420. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>
- Tülek, A., Karataş, E., Çakar, M. M., Aydın, D., Yılmazcan, Ö., & Binay, B. (2020). Optimisation of the production and bleaching process for a new laccase from *Madurella mycetomatis*, expressed in *Pichia pastoris*: From secretion to yielding prominent. *Molecular Biotechnology*, 63(1), 24–39. <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00281-9>
- Uhoraningoga, A., Kinsella, G. K., Henahan, G. T., & Ryan, B. J. (2018). The goldilocks approach: A review of employing design of experiments in prokaryotic recombinant protein production. *Bioengineering*, 5(4), 89.
- Upadhyay, P., Shrivastava, R., & Agrawal, P. K. (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, 6(1). doi:10.1007/s13205-015-0316-3
- Valderrama, B. (2003). Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*.
- Valencia, M., Corrales, C., Meneses, J. (2007). SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLÍMERO BIODEGRADABLE A PARTIR DEL ALMIDÓN DE YUCA. *Revista EIA*. 57-67.
- Valentas, K., Levine, L., & Clark, J.. (2020). Food Processing Operations and Scale-Up. 10.1201/9781003066422.

- Vargas MCA, Simsek S. (2021). Clean Label in Bread. *Foods*, 10(9), 2054. <https://doi.org/10.3390/foods10092054>
- Walsh, D. J., Gibbs, M. D., & Bergquist, P. L. (1998). Expression and secretion of a xylanase from the extreme thermophile, *Thermotoga* strain FjSS3B.1, in *Kluyveromyces lactis*. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 2(1), 9-14.
- Wang, H., Li, Z., Liu, H., et al. (2017). Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of a novel GH11 xylanase from saline-alkali soil with excellent tolerance to high pH, high salt concentrations and ethanol. *Protein Expression and Purification*, 139, 71-77.
- Wang, K., Cao, R., Wang, M., et al. (2019). A novel thermostable GH10 xylanase with activities on a wide variety of cellulosic substrates from a xylanolytic *Bacillus* strain exhibiting significant synergy with commercial Celluclast 1.5 L in pretreated corn stover hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*, 12, 48.
- Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., & Wang, S. (2015). Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 568-585. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12143>
- Wieser, H., Koehler, P., & Scherf, K. A. (2020). The Two Faces of Wheat. *Frontiers in Nutrition*, 7. doi:10.3389/fnut.2020.517313
- Wünsche, J., Lambert, C., Gola, U., & Biesalski, H. K. (2018). Consumption of gluten-free products increases heavy metal intake. *NFS Journal*, 12, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2018.06.001>
- Xu, F. (1996). Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, 35, 7608–7614.
- Xu, X., Zhou, Y., Wang, B., Ding, L., Wang, Y., Luo, L., Zhang, Y., & Kong, W. (2019). Genome-wide identification and characterization of laccase gene family in *Citrus sinensis*. *Gene*, 689, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.12.015>

- Yang, J., Li, W., Ng, T. B., Deng, X., Lin, J., & Ye, X. (2017). Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 832. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00832>
- Yang, J., Wang, G., Ng, T. B., Lin, J., & Ye, X. (2016). Laccase Production and Differential Transcription of Laccase Genes in *Cerrena* sp. in Response to Metal Ions, Aromatic Compounds, and Nutrients. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1558. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01558>
- Yaxi Dai, Catrin Tyl . A review on mechanistic aspects of individual versus combined uses of enzymes as clean label-friendly dough conditioners in breads. *J Food Sci.* 2021;86:1583–1598. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.1571>
- Yazar, G., Kokini, J., & Smith, B. (2021). Effect of endogenous wheat gluten lipids on the non-linear rheological properties of the gluten network. *Food Chemistry*, 367. [10.1016/j.foodchem.2021.130729](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130729).
- Yazawa, R., Takakura, J., Sakata, T., Ihsanawati, Y., Yatsunami, R., Fukui, T., Kumasaka, T., Tanaka, N., Nakamura, S. (2011). A calcium-dependent xylan-binding domain of alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75, 379-381.
- Yegin, S. (2023). Microbial xylanases in xylooligosaccharide production from lignocellulosic feedstocks. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13, 3619-3658.
- Zannini, E., Bravo Núñez, Á., Sahin, A. W., & Arendt, E. K. (2022). Arabinoxylans as Functional Food Ingredients: A Review. *Foods* (Basel, Switzerland), 11(7), 1026. <https://doi.org/10.3390/foods11071026>
- Zhan, F. X., Wang, Q. H., Jiang, S. J., Zhou, Y. L., Zhang, G. M., & Ma, Y. H. (2014). Developing a xylanase XYNZG from *Plectosphaerella cucumerina* for baking by heterologously expressed in *Kluyveromyces lactis*. *BMC Biotechnology*, 14, 107. <https://doi.org/10.1186/s12896-014-0107-7>
- Zhang, G., & Ge, H. (2012). Prediction of xylanase optimal temperature by support vector regression. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(1), 7.

- Zhang, S., Zhao, S., Shang, W., et al. (2021). Synergistic mechanism of GH11 xylanases with different action modes from *Aspergillus niger* An76. *Biotechnology and Biofuels*, 14, 118.
- Zheng, H., Guo, B., Chen, X.-L., Fan, S.-J., & Zhang, Y.-Z. (2011). Improvement of the quality of wheat bread by addition of glycoside hydrolase family 10 xylanases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(2), 509–515.