

# DESARROLLO DE BIOCATALIZADORES TERMOESTABLES BASADOS EN LA INVERTASA DE *THERMOTOGA MARÍTIMA* PARA LA HIDRÓLISIS TOTAL DEL AZÚCAR DE CAÑA

**Autores principales:** Carmen Menéndez Rodríguez<sup>1</sup>, Duniesky Martínez García, Lázaro Hernández García y Enrique Pérez Cruz

**Otros autores:** Luis Enrique Trujillo, Yuliet Mazola, Bessy Viviana Cutiño Ávila, Alberto del Monte Martínez, Ernesto González, Liliana Basabe Tuero, Alina Sobrino Legón, Ricardo Ramírez Ibáñez, Merardo Pujol Ferrer y Carlos Borroto Nordelo

Laboratorio Interacciones Planta-Microorganismo, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Ave 31 entre 158 y 190. Cubanacán, Playa. Apartado Postal 6162. Teléfono: 271 6022 Ext. 3117.

Otras entidades participantes: Laboratorio de fermentaciones del Dpto. de Investigación/Desarrollo, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus, Laboratorio de Tecnología de enzimas del Centro de Estudios de proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana (UH).

<sup>1</sup> Autor de correspondencia. Correo electrónico: [carmen.menendez@cigb.edu.cu](mailto:carmen.menendez@cigb.edu.cu)

**Carmen Menéndez Rodríguez (18%).** Desarrollo de la estrategia de clonaje y expresión constitutiva a nivel de fermentadores del gen sintético *bfrA* en *Pichia pastoris*. Determinación del número de copias del gen *bfrA* integrado en el genoma de la levadura. Purificación de BfrA recombinante y determinación del tipo de glicosilación en la invertasa recombinante. Determinación del efecto de la concentración de sustratos en la acción de la enzima y productividad de las células muertas intactas. Escritura y manejo editorial del artículo publicado en Applied Microbiology and Biotechnology. Autor de presentaciones en eventos. Búsqueda de avales.

**Duniesky Martínez García (18%).** Expresión constitutiva a nivel de fermentadores del gen sintético *bfrA* en *Pichia pastoris*, determinación de los parámetros cinéticos de la invertasa libre e inmovilizada, experimentos relacionados con los biocatalizadores de enzima y células inmovilizadas. Escritura y manejo editorial del artículo publicado en Food Chemistry. Autor de presentaciones en eventos. Búsqueda de avales.

**Lázaro Hernández García (17%).** Dirección científica general de las estrategias de clonaje y expresión del gen *bfrA* en *P. pastoris*. Apoyo logístico en tareas del proyecto. Participación activa en la escritura de los 2 artículos que avalan esta propuesta. Autor de presentaciones en eventos. Búsqueda de avales.

**Enrique Pérez Cruz** (14%). Desarrollo de las estrategias de fermentación y expresión constitutiva del gen *bfrA* en *Pichia pastoris*. Inmovilización de células y enzima. Apoyo logístico y de coordinación en tareas del proyecto. Búsqueda de avales.

**Luis Enrique Trujillo** (5%). Selección de clones recombinantes y expresión constitutiva a nivel de fermentadores del gen sintético *bfrA* en *Pichia pastoris*.

**Yuliet Mazola** (5%). Análisis de la glicosilación de la invertasa expresada en *P. pastoris*.

**Bessy Viviana Cutiño Ávila** (5%). Selección del diseño racional para la inmovilización de la invertasa expresada en *P. pastoris*, experimentos relacionados con el biocatalizador de enzima inmovilizada.

**Alberto del Monte-Martínez** (5%). Selección del diseño racional para la inmovilización de la invertasa expresada en *P. pastoris*, experimentos relacionados con el biocatalizador de enzima inmovilizada. Búsqueda de avales.

**Ernesto González** (5%). Purificación de la invertasa expresada en *P. pastoris*.

**Alina Sobrino Legón** (2%). Determinación de las actividades enzimáticas, concentración de proteína de los procesos de fermentación, inmovilización y biocatálisis.

**Ricardo Ramírez Ibáñez** (2%). Pesquisa de los transformantes de levaduras. Trabajo técnico.

**Merardo Pujol Ferrer** (2%). Apoyo logístico y de coordinación en tareas del proyecto.

## RESUMEN

La termoestabilidad es una propiedad operacional deseada en las enzimas destinadas a la industria azucarera. La invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*, enzima que se emplea actualmente en la producción de sirope invertido, es termolábil. El CIGB desarrolló anteriormente dos biocatalizadores termolábiles de células vivas de las levaduras *Hansenula polymorpha* y *Pichia pastoris* inmovilizadas en alginato de calcio que expresan en el periplasma la invertasa de *S. cerevisiae* inducida por metanol con limitaciones operacionales. En este trabajo, un gen con uso de codones optimizado que codifica la invertasa de *Thermotoga maritima* (BfrA) se expresó de forma constitutiva a altos niveles en *Pichia pastoris*. El incremento gradual de una a cuatro copias del gen sintético tuvo un efecto aditivo sobre el rendimiento de BfrA sin causar toxicidad celular. La levadura transgénica secretó BfrA activa al periplasma (44%) y al medio de cultivo (56%). La ocurrencia de N-glicosilación no afectó las propiedades catalíticas y la termoestabilidad de la enzima recombinante. Este trabajo es el primer informe de

producción de una invertasa bacteriana termoestable (BfrA) en levaduras. Se desarrollaron 3 modalidades de un biocatalizador termoestable (enzima libre, enzima inmovilizada a matriz glicosil-sefarosa CL 4B y células no viables atrapadas en alginato de calcio) que opera a alta concentración de azúcar de caña (70% inicial) y temperatura de pasteurización (60-70°C) y permite la hidrólisis total del sustrato. El biocatalizador admite flexibilidad de operación en sistemas continuos y discontinuos con ciclos repetidos de reacción. Su empleo para la producción comercial de sirope invertido de calidad alimenticia contribuiría a la diversificación de la industria azucarera cubana. Los resultados aparecen publicados en **Applied Microbiology and Biotechnology (FI 3,6)**, y en **Food Chemistry. (FI 3,3)**. Además, se han presentado en eventos internacionales y cuenta con el aval de importantes especialistas en este tópico.

## COMUNICACIÓN CORTA

### Introducción

Los siropes de azúcar invertido (igual proporción de los azúcares reductores glucosa y fructosa) elaborados por hidrólisis ácida o enzimática tienen alta demanda en la industria alimenticia a nivel mundial por su alto poder edulcorante. A nivel comercial la producción de estos siropes se realiza a partir de la hidrólisis enzimática del azúcar de caña o remolacha a partir de la invertasa de la *Saccharomyces cerevisiae*, ya sea en forma de crudo enzimático, enzima inmovilizada, o célula inmovilizada.

Hasta la fecha, en Cuba no existe una tecnología enzimática para la producción de siropes invertidos. En 1992 el CIGB obtuvo un premio otorgado por la Academia de Ciencias de Cuba con el trabajo: "Biotecnología de producción de sirope invertido de glucosa fructuosa utilizando microorganismos inmovilizados con alta actividad de sacarosa invertasa recombinante". Los biocatalizadores se basaron en células vivas a partir de células inmovilizadas en alginato de calcio de las levaduras *Hansenula polymorpha* y *Pichia pastoris* que acumulaban en el espacio periplasmático la invertasa (Suc2) de *S. cerevisiae*. Sin embargo, estos biocatalizadores presentaron serios inconvenientes operacionales que impidieron su implementación a escala industrial tales como: 1- Uso de un sistema de inducción por metanol para la expresión del gen *suc2* en ambas levaduras hospedadas. El uso de metanol para la producción en gran escala es un inconveniente ya que encarece el proceso productivo, es un reactivo altamente inflamable, su manipulación en grandes cantidades resulta peligrosa y no es compatible con el medio ambiente. 2- Ambos biocatalizadores utilizaban células de levaduras recombinantes vivas lo que desde el punto de vista ambiental resulta riesgoso. Además, como resultado del metabolismo celular de estas células viables existía burbujeo por liberación de CO<sub>2</sub> que hacía colapsar las columnas que contenían las perlas con los microorganismos inmovilizados cuando se operaba en procesos continuos de producción atentando contra su reuso. 3- La invertasa de *S. cerevisiae* se inactiva a temperaturas superiores a 45-50°C lo que resulta un inconveniente práctico importante ya que cuando se trabaja a altas

concentraciones de sacarosa es conveniente trabajar a 60°C o más para evitar contaminaciones microbianas y favorecer la difusión del sustrato al interior de las perlas. 4- Entre un 5 y un 10% de la sacarosa utilizada como sustrato no se convertía a Glucosa+Fructosa. A partir de estos antecedentes nos propusimos, en una primera etapa a nivel de laboratorio, eliminar los principales inconvenientes de los biorreactores anteriores por medio de una nueva estrategia que incluye a la  $\beta$ -fructosidasa (BfrA) de *Thermotoga maritima* que es la invertasa más termoactiva y termoestable identificada hasta la fecha. A través de esta nueva línea de investigación, múltiples copias del gen codificante para esta enzima se insertaron en el genoma de la levadura hospedera *P. pastoris* para su expresión constitutiva lo que permitió la inmovilización de las células de la levadura recombinante en perlas de alginato o de la enzima libre sobre un soporte sólido adecuado lo que aporta las siguientes ventajas sobre los biocatalizadores anteriores: 1- No se utiliza metanol para la expresión del gen *bfrA*, en su lugar azúcar de caña. 2- El biocatalizador que utiliza células inmovilizadas en alginato de calcio resulta desde el punto de vista medio ambiental superior a los descritos anteriormente ya que al operar a 60-70°C, las células de la levadura son no viables y permite operar en columnas al no haber emisiones de CO<sub>2</sub> y mantiene la actividad enzimática intacta. 3- Se pueden reusar los biocatalizadores, hecho este que los hace más rentables. 4- La producción enzimática a escala industrial de sirope invertido a temperatura de pasteurización (60-70°C) y solución de sacarosa concentrada (60-70%, p/v) deriva en un proceso más eficiente y desde el punto de vista ambiental menos riesgoso ya que se evitan contaminaciones microbianas. 5- Se logra el 100% de conversión de sacarosa a glucosa+fructosa.

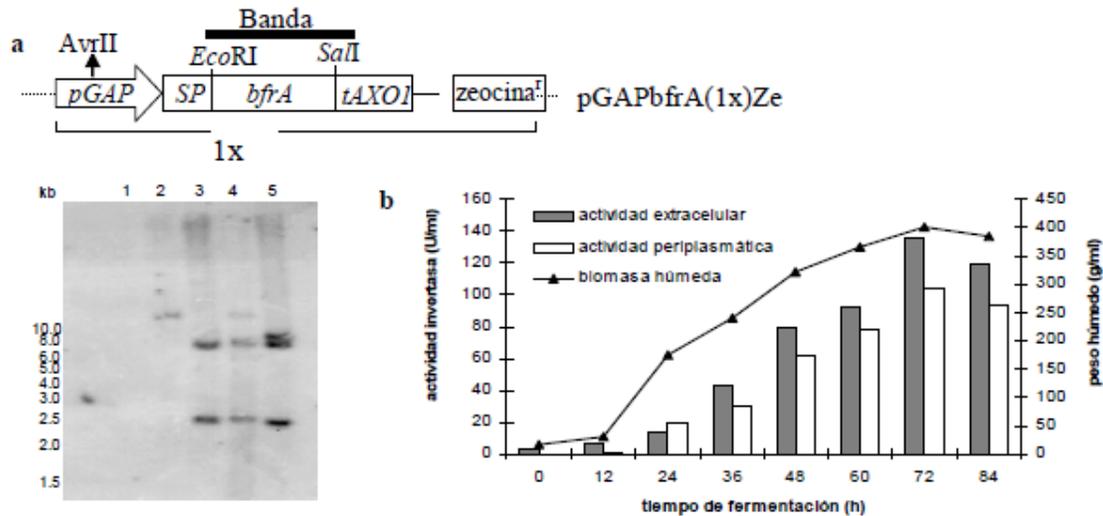
Como parte de esta investigación, se presentan tres biocatalizadores termoestables (enzima libre, enzima inmovilizada y células no viables inmovilizadas en alginato de calcio) que operan a 60°C-70°C y pH 5,5 e hidrolizan eficientemente la sacarosa altamente concentrada (70%) son compatibles con el medio ambiente y resultan atractivos para la obtención de sirope invertido a escala industrial lo que constituye una alternativa para agregar valor comercial al azúcar de caña y diversificar su empleo en la industria alimenticia.

## Resultados y discusión

### Expresión constitutiva del gen sintético *bfrA* con el uso de codones optimizado en *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris* carece de actividad sacarolítica endógena y constituye por tanto un hospedero ideal para estudiar la expresión de invertasas heterólogas en levaduras. Para la expresión óptima el gen sintético *bfrA* con el uso de codones optimizado fusionado al péptido señal del factor alfa de *S. cerevisiae*, se expresó en *P. pastoris* bajo el control del promotor constitutivo *GAP*, fusionado por el C terminal a una cola de 6 histidinas y al terminador *AOX1*. Con el aumento de la dosis génica de una a cuatro copias del casete de expresión p*GAP-bfrA*-*TAOX1* se logró un incremento proporcional de la suma de la actividad de la invertasa (BfrA) en las células intactas recolectadas y la fracción sobrenadante de 83 U/mL

de cultivo de crecimiento a 229 U/mL, respectivamente sin causar toxicidad celular. El análisis de transferencia por Southern blot confirmó la integración desde una hasta cuatro copias del gen foráneo en el genoma de la levadura.



**Figura 1.** Integración y expresión de multicopias del gen *bfrA* sintético con el uso de codones optimizados en *Pichia pastoris*. **a)** Análisis por Southern blot del ADN total de la cepa de *P. pastoris* digerido con *EcoRI* y el fragmento de 1.3-kb *EcoRI*-*SalI* marcado con <sup>32</sup>P del plásmido pGAPbfrA(1x)zeo. Los carriles corresponde a las cepas: 1- GS115, 2 -PpBfrA(1x), 3- PpBfrA(2x), 4- PpBfrA(3x), 5- PpBfrA(4x). Tallas en kb reflejan la migración del Marcador de peso molecular de ADN 1kb (Promega) no teñido. **b)** Expresión constitutiva del gen *bfrA* sintético en *P. pastoris* durante la fermentación de cultivo incrementado: Las cuatro copias del clon PpBfrA(4x) fue crecida en fermentador de 7 L a pH 5,5 y 30°C. La fase de alimentación comenzó a las 20 h usando azúcar de caña como fuente de carbono para el crecimiento. Muestras de cultivos (5 ml) fueron colectadas a intervalos de 12 h y centrifugadas. La actividad BfrA fue ensayada en el sobrenadante del cultivo (actividad extracelular) y la biomasa intacta (actividad periplasmática). Las reacciones fueron llevadas a cabo a velocidades iniciales con 120 mM de sacarosa en 100 mM de tampón de acetato de sodio pH 5.5 a 60°C. Una unidad es definida como la cantidad de BfrA recombinante que hidroliza 1 μmol de sacarosa por min en las condiciones de reacción mencionadas arriba.

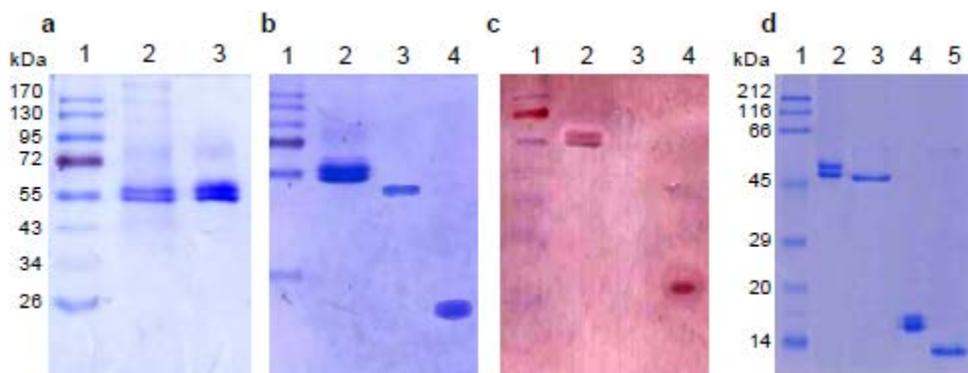
Los clones con cuatro copias *bfrA* fueron generados por retransformar la cepa PpBfrA(2x)His+4 con el plásmido pGAPbfrA(2x)Zeo digerido con *NdeI*, un sitio único creado en la región 5'AXO1 del vector para incorporar las dos copias extra en tándem *bfrA* por sola recombinación de cruce en el locus cromosómico AOX1. Como era de esperar el patrón de hibridación del clon PpBfrA(4x) muestra un aumento de la intensidad del fragmento de 2,47 kb (sitio *EcoRI* del gen *bfrA* del primer casete al mismo sitio del casete consecutivo) correspondiente a las copias integradas del gen en comparación con las otras dos bandas (Fig. 1a, carril 5), (Menéndez y cols., 2013).

El clon de *Pichia* de expresión constitutiva con cuatro copias del transgén, PpBfrA(4x), a escala de fermentador de 5 L en condiciones de crecimiento de cultivo incrementado con fuente de carbono azúcar refino, pH fijo de 5,5 y 30°C logro rendimiento de biomasa total de 402 g/L y la actividad invertasa total (241

unidades/mL de cultivo) a las 72 h. En este punto, la secreción de BfrA dio como resultado la retención en el periplasma (44%) y la liberación extracelular (56%), mientras que la productividad total de la enzima alcanzó 3,347 U/L/h (Figura 1b), (Menéndez y cols., 2013).

### BfrA activa secretada en *Pichia pastoris* es una glicoproteína

La enzima liberada extracelularmente que contiene la fusión de His6-C-terminal se purificó por cromatografía de afinidad de Ni, con un proceso de recuperación de 90%. La proteína purificada migra como dos bandas definidas en SDS-PAGE con masas moleculares estimadas de 58 y 53 kDa (Fig. 2a). Ambas bandas reaccionaron con la lectina marcada con digoxigenina en un gel de Western blot (Fig. 2c), revelando la presencia de cadenas de manosas. La eliminación de los oligosacáridos N-ligados por el tratamiento con endoglicosidasa-H resultó en una única banda de proteína con una movilidad correspondiente a un tamaño aparente de aproximadamente 50 kDa (Fig. 2d). Este valor es consistente con la masa teórica de 51,2 kDa calculadas para la BfrA N-desglicosilada madura con la cola de polihistidina en la base de la estructura primaria, lo que confirma la ocurrencia de N-glicosilación durante el paso por la ruta secretora de la levadura (Menéndez y cols., 2013).



**Fig. 2** Análisis de la glicosilación de BfrA purificada por IMAC del sobrenadante de cultivo *P. pastoris* del clon PpBfrA(4x). Las proteínas fueron desnaturalizadas y separadas en gel de SDS-Poliacrilamida (12,5%) y reveladas por tinción con azul Coomassie (**a**, **b** y **d**), o transferida a una membrana de nitrocelulosa y la detección de las cadenas de manosas con lectinas marcada con digoxigenina (**c**). Carriles en **a**: 1, Marcador de proteínas preteñido (Fermentas); 2, sobrenadante de cultivo (10 µg de proteína total); 3, BfrA purificada (10 µg). Carriles en **b** y **c**: 1, Marcador de proteínas preteñido (Fermentas); 2, BfrA purificada (10 µg); 3, proteína control no-glicosilada (5 µg); 4, Ribonucleasa-B glicosilada (5 µg). Carriles en **d**: 1, Marcador de proteínas de amplio rango (BIO-RAD); 2, BfrA purificada (5 µg); 3, BfrA tratada con endoH (5 µg); 4, Ribonucleasa-B glicosilada (5 µg); 5, Ribonucleasa-B glicosilada tratada con endoH (5 µg).

### Eficiencia catalítica de la BfrA glicosilada purificada

La cinética de BfrA glicosilada purificada se analizó de acuerdo con el modelo de Michaelis-Menten. Los valores de los parámetros cinéticos cinéticas  $V_{max}$  (3,333 µmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>),  $K_M$  (51 mM),  $k_{cat}$  (2,8 x 10<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>) y  $k_{cat}/K_M$  (5,6 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>)

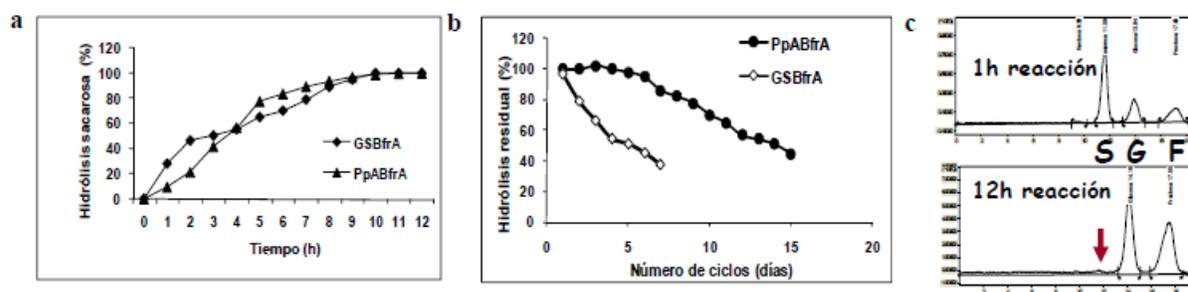
determinado para la hidrólisis de sacarosa en tampón acetato de sodio pH 5,5 medida a velocidades iniciales a 75°C mostraron valores similares a los reportados para la enzima no glicosilada producida en *E. coli* (Menéndez y cols., 2013).

### Biocatalizadores termoestables a escala de laboratorio empleados para la hidrólisis total del azúcar de caña

Del sobrenadante de cultivo de la fermentación del clon PpBfrA(4x) filtrado por 0,2 µM una parte se rotoevaporó a 60°C para obtener el biocatalizador de BfrA libre en polvo y la otra se inmovilizó. El proceso de inmovilización de la BfrA extracelular se realizó por un diseño racional utilizando el programa RDID1.0 para incorporar la cantidad óptima de proteína/actividad/área de superficie del soporte Glyoxyl-Sepharose CL 4B. Los grupos aldehídos de la Glyoxyl-Sepharose CL 4B activada a pH 10 se unen irreversiblemente a los grupos ε-amino de lisinas y el residuo N-terminal de la enzima. La enzima inmovilizada (biocatalizador GSBfrA) a escala de laboratorio realizó la inversión completa del azúcar de caña (70%) a las 9 h en un reactor de tanque agitado a pH 5,5 y 60°C con 4 mg de biocatalizador/mL de solución de azúcar de caña y logró productividad de 22 g de sustrato hidrolizado/g de biocatalizador/h (Figura 3a). La vida media de la enzima inmovilizada fue de 5 días a 60°C en un reactor de columna de lecho fijo operado continuamente alimentado a la velocidad de flujo constante de 5 ml/h de 70% de azúcar de caña (Figura 3b), (Martínez y cols., 2014).

Las células de levadura provenientes de la fermentación del clon PpBfrA(4x) mantuvieron la actividad invertasa en el periplasma luego de tratamiento a 70°C durante 30 minutos. Las células no viables inmovilizadas en alginato de calcio (biocatalizador PpABfrA) operan a escala de laboratorio en reactor de tanque agitado con relación 1:10 de peso de perlas (g)/ volumen de solución de azúcar de caña (mL) a 60°C.

En la figura 3c se observa la hidrólisis total del 70% del azúcar de caña a las 12 h no así a la hora de reacción, con una productividad de 0,6 g de sacarosa hidrolizada/g de biocatalizador/h (Figura 3a). La vida media de las células no viables inmovilizadas en 15 reacciones discontinuas de 24 horas (15 días) sobre 70% de azúcar de caña con pH libre y 100 rpm de agitación en el reactor se estimó de 14 días (Figura 3b).



**Figura 3 Porcentaje de hidrólisis de sacarosa (70%) (a), Actividad residual (b) de los biocatalizadores PpABfrA.y GSBfrA. Cromatografía líquida de alta resolución de los productos de la reacción del biocatalizador PpABfrA (c).** (a) Se tomaron muestras a diferentes tiempos de reacción para ambos biocatalizadores GSBfrA y PpABfrA, las reacciones se realizaron utilizando las relaciones indicadas de peso de biocatalizador (g): volumen de reacción (mL) a la concentración de 70% de sacarosa, pH 5,5 y 60°C, agitación 100 rpm. (b) Con ambos biocatalizadores se empleó sacarosa al 70%, 60°C y pH libre. Con el biocatalizador PpABfrA se realizaron reacciones de 24 h en un reactor discontinuo con agitación a 100 rpm con una relación 1:10 de peso de perlas (g), volumen de solución (mL). Con el biocatalizador GSBfrA la reacción se realizó en una columna de 1 mL con 0,35 g de biocatalizador alimentado a un flujo de 5 mL/h. La actividad es relativa al primer lote (100%) las reacciones. Los valores representan la media de tres repeticiones del ensayo. La dispersión de los datos con relación a la media fue menor del 5%. (c) S: sacarosa, G: glucosa y F: fructosa. Determinación de los productos a la hora y 12 h de reacción del biocatalizador PpABfrA sobre 70% de sacarosa.

## Descripción científico-técnica detallada del resultado

### NOVEDAD CIENTÍFICA DEL TRABAJO

1. Primer informe de producción de una invertasa bacteriana termoestable en levaduras. Se demuestra que la ocurrencia de N-glicosilación en la invertasa de *Thermotoga maritima* secretada en *Pichia pastoris* no afecta la eficiencia catalítica en comparación con la enzima nativa no glicosilada. (Menéndez y cols., 2013)
2. Primer informe de inmovilización de una invertasa (natural o recombinante) proveniente de un microorganismo hipertermófilo. (Martínez y cols., 2014)
3. Primer informe de inmovilización de células enteras no viables de una levadura recombinante con actividad invertasa y su empleo en la hidrólisis total del azúcar de caña en ciclos de operación continua a temperaturas de pasteurización.

### IMPORTANCIA PRÁCTICA PRINCIPAL DEL TRABAJO

El clón PpBfrA(4x) de *Pichia pastoris* constituye una fuente de producción recombinante de la enzima invertasa termoestable de *Thermotoga maritima* a escala industrial. (Menéndez y cols., 2013). El empleo del biocatalizador termoestable (enzima libre, enzima inmovilizada y célula inmovilizada) para la producción comercial de sirope invertido de calidad alimenticia en Cuba contribuiría a la diversificación de la industria azucarera. (Menéndez y cols., 2013, Martínez y cols., 2014).

1. Constitutive high level expression of a codon-optimized  $\beta$ -fructosidase gene from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* in *Pichia pastoris* (2013) C. Menéndez, D. Martínez, L.E. Trujillo, Y. Mazola, E. González, E. Pérez, L. Hernández (*Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (3): 1201-1212). (FI 3.6) (Esta en el 8vo lugar entre los diez artículos más leído en el dominio BioMedlib desde su publicación en el 2013)
2. A thermostable exo- $\beta$ -fructosidase immobilized through rational design (2014) D. Martínez, B. Cutiño-Avila, E.R. Pérez, C. Menéndez, L. Hernández, A. del Monte-Martínez. (*Food Chemistry*, 14 (5): 826-831). (FI 3.3)

## **Presentaciones en eventos científicos (4 eventos con 1 conferencia invitada)**

2011, Congreso Biotecnología Habana, Habana, Cuba. (Nov 29-Dic 2); 2011, XX Conferencia de Química, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba, (Diciembre 2-11); 2012, VIII Congreso Internacional de Química, Ingeniería Química y Bioquímica, La Habana (Octubre 9-12); 2013, IX Simposio Latinoamericano de Producción de alcoholes y levadura, La Habana, (Abril 08-11).

**Trabajos premiados como Logro Institucional Anual del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología 2012**, Expresión constitutiva a altos niveles en *Pichia pastoris* de una fructosidasa termoestable de origen bacteriano.

**Avales Nacionales:** Dra Alina Forrellat, Decana Fac Biol, UH (**Centro de Proteínas, grupo colaborador de esta propuesta a logro**), Dr. Eduardo Ortega, Fac Biol, UH. **Internacionales:** Prof. Sjef Smeekens, Univ Utrecht, Holanda; Prof. Joe Gallagher, Univ Aberystwyth, UK; Prof. Francisco Plou, Inst Catálisis, Madrid, España; Prof. Marie-pascale Prud'homme, Univ Caen, France; Prof. Agustín Lopez-Mungia, Inst. Biotecnol, Cuernavaca, México; Prof. Maria Angela Machado, Inst. Botánica, Sao Paulo, Brasil; Prof. Ruth Heinz, INTA Castelar, Argentina.

## **Referencias bibliográficas**

- (1) Alberto F, Bignon C, Sulzenbacher G, Henrissat B, Czjzek M (2004). The three-dimensional structure of invertase  $\beta$ -fructosidase from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. ***J Biol Chem* 279:18903–18910.**
- (2) Alberto F., E. Jordi, B. Henrissat y M. Czjzek, (2006). Crystal structure of inactivated *Thermotoga maritima* Invertase in complex with the trisaccharide substrate raffinose *Biochemistry Journal* 395 (18): 457-462.
- (3) Alvaro G, Blanco RM, Fernández-Lafuente R y Guisán JM (1991). Stabilizing effects of penicillin G sulfoxide, a competitive inhibitor of penicillin G acylase: its practical applications *Enzyme Microb Technol* 13: 210-214.
- (4) Andjelković, U., Pićurić, S., & Vujčić Z. (2010). Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. *Food Chemistry*, 120, 799-804.
- (5) Arruda LMO and Vitolo M (1999). Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads *Applied Biochemistry and Biotechnology* 81: 23-33.
- (6) Belcarz A, Ginalska G and Lobarzewski J (2002). Immobilized, thermostable S- and F-forms of the extracellular invertase from *Candida utilis* can hydrolyse sucrose up to 100 °C *Biotechnology Letters* 24: 1993–1998.

- (7) Bezzate S, Steinmetz M, Aymerich S (1994). Cloning, sequencing, and disruption of a levanase gene of *Bacillus polymyxa* CF43. *J Bacteriol* 176:2177–2183.
- (8) Blatch G. y Woods D.R. (1993). Molecular characterization of a fructanase produced by *Bacteroides fragilis* BF-1. *J. Bacteriol.* 175, 3058-3066.
- (9) Bock K y Lemieux RU (1982). The conformational properties of sucrose in aqueous solution: intramolecular hydrogen- bonding *Carbohydr Res* 100: 63-75.
- (10) Bowski R. S., D. Y. Ryu y W. R. Vieth, (1971). Kinetic modelling of the hydrolysis of sucrose by invertase. *Biotechnol Bioeng* 13: 641–656.
- (11) Bowski R. S., D. Y. Ryu y W. R. Vieth, (1971). Kinetic modelling of the hydrolysis of sucrose by invertase. *Biotechnol Bioeng* 13: 641–656.
- (12) Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- (13) Caragea C, Sinapov J, Silvescu A, Dobbs D y Honavar V (2007). Glycosylation site prediction using ensembles of Support Vector Machine classifiers. *BMC Bioinformatics* 8:438-451.
- (14) Cereghino J. L. y Cregg J. M., (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 45-66.
- (15) Combes, D. y Monsan, P. (1983). Sucrose hydrolysis by invertase Characterisation of products and substrate inhibition. *Carbohydr Res* 117: 215–228.
- (16) D'Souza SF y Godbole SS (2002). Immobilization of invertase on rice husk using polyethyleneimine. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* 52: 59-62.
- (17) Danisman, T., Tan, S., Kacar, Y., & Ergene, A. (2004). Covalent immobilization of invertase on microporous pHEMA-GMA membrane. *Food Chemistry*, 85, 461-466.
- (18) Del Monte, A., Nolasco, H., Forrellat, A., Aragón, C., García, A., Díaz, J., & Carrillo, O. (2002). Evidencias de la presencia de lipasas en el hepatopáncreas de *Litopenaeus schmitii*. *Revista Electrónica AquaTIC*, 6, 207-222.
- (19) Del Monte-Martínez, A., & Cutiño-Avila, B.V., (2012). Rational design of immobilized lipases and phospholipases. *Methods in Molecular Biology*, 861, 343-82.

- (20) Freeman A y Malcolm LD (1998). Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and Microbial Technology* 23: 335-345.
- (21) Goosen C., X. L. Yuan, J. M. Munster, A. F. Ram, M. J. Maarel, L. Dijkhuizen 2007. Molecular and biochemical characterization of a novel intracellular invertase from *Aspergillus niger* with transfructosylating activity. *Eukaryot Cell*. 4:674-81.
- (22) Goulart AJ, Claudia A, Benedetti P, Tavano OL, Parreira D, Contiero J, Carmona E y Monti R (2008). Multipoint Immobilization of Invertase on Agarose: Stability and Kinetic Properties *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 2(3): 462-470.
- (23) Guimaraes, L. S., H. F. Terenzi, M. T. M. Polizeli, J. A. Jorge, (2007). Production and characterization of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology* 42: 52–57.
- (24) Guisán JM (1988). Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilisation-stabilization of enzymes. *Enz Microb Technol* 10: 375-382.
- (25) Guisán, J.M. (1988). Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilisation-stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 10, 375-382.
- (26) Guisán, J.M., & Millán, F. (2007). Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1160-1166.
- (27) Hasal P., V. Vojtisek, A. Cejkova, P. Kleezek, O. Kofronova (1992). An immobilized whole yeast cell biocatalyst for enzymatic sucrose hydrolysis. *Enzyme Microb Technol*. 14: 221-229.
- (28) Hsieh HJ, Liu PC y Liao WJ (2000). Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnol Lett* 22:1459-64.
- (29) Illanes A (2008). Homogeneous Enzyme Kinetics. *Enzyme Biocatalysis. Principles and Applications*. Springer Science + Business Media B.V. pp 107-112.
- (30) Iqbal J y Saleemuddin M (1985). Sucrose hydrolysis using invertase immobilized on concanavalin A–Sepharose. *Enzyme Microb Technol* 7:175-8.
- (31) Jaenicke R (1991). Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur J Biochem* 202: 715-728.

- (32) Johannes, T.W., Simurdiak, M. and Zhao, H. (2006). Biocatalysis. In Encyclopedia of Chemical Processing, (S. Lee, ed.) Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 101-110.
- (33) Kotwal, S. M. y V. Shankar, 2009. Immobilized invertase. *Biotechnol Advan.* 27:311-322
- (34) Laemmli U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680–5.
- (35) Liebl, W., D. Brem, y A, Gotschlich (1998). Analysis of the gene for Beta-fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 55-64.
- (36) Marconi W, Gulinelli S y Morisi F. (1974). Properties and use of invertase entrapped in fibers. *Biotechnol Bioeng* 16:501-11.
- (37) Martínez D., Cutiño-Avila B., Pérez E.R., Menéndez C., Hernández L., del Monte-Martínez A. (2014). A thermostable exo- $\beta$ -fructosidase immobilized through rational design. *Food Chemistry*, 14 (5): 826-831.
- (38) Mateo, C., Palomo, J.M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., López-Gallego, F., Pessela, B., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J.M. (2006). Glyoxyl-agarose: a fully inert hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 274-280.
- (39) Menéndez C., L. Hernández, A. Banguela, J. País (2004). Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol.* 34:446–452.
- (40) Menéndez C., Martínez D., Trujillo L.E., Mazola Y., González E., Pérez E., Hernández L (2013). Constitutive high level expression of a codon-optimized  $\beta$ -fructosidase gene from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (3): 1201-1212.
- (41) Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- (42) Milovanović A, Božić N y Vujčić Z (2007). Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads *Food Chemistry* 104: 81-86.
- (43) Milovanović A, Božić N y Vujčić Z (2007). Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads *Food Chemistry* 104: 81-86.

- (44) Monsan P y Combes D (1984). Application of immobilized invertase to continuous hydrolysis of concentrated sucrose solutions. *Biotechnol Bioeng* 26:347-51.
- (45) Muñoz–Gutiérrez I, Rodríguez–Alegria ME, López–Mungía A (2009). Kinetic behavior and specificity of  $\beta$ –fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans. *Process Biochemistry* 44:891–898.
- (46) Pedroche, J., Yust, M.M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., Guisán, J.M., & Millán, F. (2007). Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxylagarose supports: correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1160-1166.
- (47) Petrescu AJ, Milac AL, Petrescu SM, Dwek RA, Wormald MR (2004). Statistical analysis of the protein environment of N–glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology* 14:103–114.
- (48) Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) . UCSF Chimera –a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612.
- (49) Pingzuo L., A. Anumanthan, X. Gao, K. Ilangovan, V. Suzara, N. Duzgunes, V. Renugopalakrishnan, (2007). Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol*. 142: 105-124.
- (50) Prodanović R, Jovanović S y Vujčić ZM. (2001). Immobilization of invertase on a new type of macroporous glycidyl methacrylate. *Biotechnol Lett* 23:1171-4.
- (51) Rajoka MI y Yasmeeen A (2005). Improved productivity of beta-fructofuranosidase by a derepressed mutant of *Aspergillus niger* from conventional and non-conventional substrates *World J. Microbiol. Biotechnol* 21: 471-478.
- (52) Ritsema T, Hernández L, Verhaar A, Altenbach D, Boller T, Wiemken A, Smeekens S (2006). Developing fructan–synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose–binding box. *Plant J* 48:228–237.
- (53) Rossi-Alva JC y Rocha-Leão MHM (2003). A strategic study using mutant-strain entrapment in calcium alginate for the production of *Saccharomyces cerevisiae* cells with high invertase activity *Biotechnol Appl Biochem* 38: 43-51.
- (54) Sanjay G y Sugunan S (2006). Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K–10 *Food Chemistry* 94(4): 573-579.
- (55) Seo SK, Wei A (2008). Probing osmotic effects on invertase with L-(–)-sucrose. *Org Biomol Chem* 6:3362–3365.

- (56) Straathof A. J. J., A. P. G. Kieboom, H. Bekkum (1986). Invertase- catalysed fructosyl transfer in concentrated solutions of sucrose. *Carbohydr Res* 146: 154–159.
- (57) Thu B, Smidsrod O y Skjak-Braek G (1996). Alginate gels-Some structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. *Immobilized Cells: Basics and Applications*. Editado por Wijffels RH, Buitelaar RM, Bucke C y Tramper J. Elsevier Science B. V. pp 19-30.
- (58) Torres R, Mateo C, Fuente M, Palomo JM, Ortiz C, Tam A, Daminati M, Fernández-Lafuente R y Guisan JM (2002). Reversible immobilization of invertase on sepabeads coated with polyethyleneimine: optimization of the biocatalyst's stability *Biotechnology Progress* 18: 1221-1226.
- (59) Trimble RB, Atkinson PH, Tschopp JF, Townsend RR, Maley F (1991). Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces* SUC2 invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Biol Chem* 266:22807–22817.
- (60) Tschopp, J. F., G. Sverlow, R. Kosson, W. Craig, y L. Grinna, (1987). High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnol* 5:1305-1308.
- (61) Tull D, Gottschalk TE, Svendsen I, Kramhøft B, Phillipson BA, Bisgård-Frantzen H, Olsen O y Svensson B (2001). Extensive N-glycosylation reduces the thermal stability of a recombinant alkalophilic bacillus alpha-amylase *ASEAN Food J* 15:(1) 73-78.
- (62) Vu, TKH y Le VVM (2008). Biochemical studies on the immobilization of the enzyme invertase (EC.3.2.1.26) in Alginate Gel and its Kinetics produced in *Pichia pastoris Protein Expr Purif* 21(1): 13-23.
- (63) Vujčić Z, Miloradović Z, Aleksandra Milovanović, Božić N (2011). Cell wall invertase immobilisation within gelatin gel *Food Chemistry* 126, 236–240.
- (64) Wanker, E., A. Huber, y H. Schwab (1995). Purification and characterization of the *Bacillus subtilis* levanase produced in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 1953-1958.
- (65) Willaert RG, Backer L y Baron G (1996). Mass Transfer in Immobilised Cell Systems En: *Immobilized Living Cell Systems: Modeling and Experimental Methods*. Ltd. pp 32-45.