

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DESARROLLO DE UN PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA TANASA
RECOMBINANTE DE INTERÉS INDUSTRIAL

Por

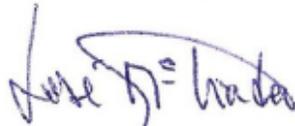
DANIELA ORDAZ PÉREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con orientación en Biotecnología

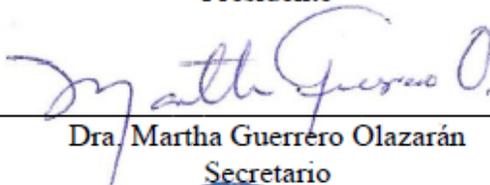
2021

**DESARROLLO DE UN PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN
DE UNA TANASA RECOMBINANTE DE INTERÉS
INDUSTRIAL**

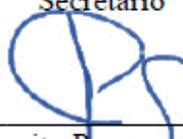
Comité de Tesis



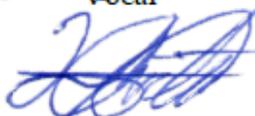
Dr. José María Viader Salvadó
Presidente



Dra. Martha Guerrero Olazarán
Secretario



Dr. Benito Pereyra Alférez
Vocal



Dr. Hamlet Avilés Arnaut
Vocal



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Vocal

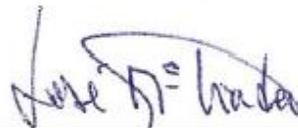


Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado



**DESARROLLO DE UN PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN
DE UNA TANASA RECOMBINANTE DE INTERÉS
INDUSTRIAL**

Dirección de Tesis



Dr. José María Viader Salvadó
Director



Dra. Martha Guerrero Olazarán
Co-Director

AVISO DERECHOS DE AUTOR

**DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

FINANCIAMIENTO

Este proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT), UANL CN1207-20.

Parte del presente trabajo ha sido presentado en forma de cartel en el siguiente congreso:

Daniela Ordaz-Pérez, Martha Guerrero-Olazarán, José María Viader Salvadó. “Construcción de cepas de *Pichia pastoris* productoras de una tannasa monomérica de *Aspergillus niger*. XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. León, Guanajuato, México. 23-28 de junio de 2019.

Además, ha sido publicado en la revista “Molecular Biotechnology”

Ordaz-Pérez D, Fuentes-Garibay JA, Guerrero-Olazarán JA, Viader-Salvadó JM. 2021. Sequence engineering of an *Aspergillus niger* tannase to produce in *Pichia pastoris* a single-chain enzyme with high specific activity. Molecular Biotechnology [Publicado en línea: 15 octubre 2021]. Doi: 10.1007/s12033-021-00416-6.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado.

Al Dr. José María Viader por aceptar ser mi director de tesis y recibirme en el L5, por sus enseñanzas que siempre llevaré en mi vida profesional, su apoyo y la dedicación que tuvo hacia el proyecto de tesis.

A la Dra. Martha Guerrero por sus aportaciones al desarrollo de la tesis, y por los consejos profesionales que siempre nos dio.

Al Dr. José Antonio por proporcionarme las cepas que requerí para el inicio del proyecto, y por el apoyo técnico y los tips que me dio durante el desarrollo de toda la tesis.

A mis amigos y compañeros del L5 Ana, Karla, Noé, Abel, Nancy, Yanelis, Fabián, David, Alber, Rebeca, Daniel, Diana y quienes pasaron por el laboratorio en este tiempo, que de una u otra forma siempre me apoyaron durante la realización de la tesis, con sus sugerencias, enseñándome técnicas nuevas o con su compañía para hacer más amena la estancia en el laboratorio.

A mis amigos de generación del doctorado, Laura, Nayelli y Alejandro por siempre estar ahí jalándonos unos a los otros para sacar las materias adelante, por ser el desahogo de las frustraciones del posgrado y por hacer que mi estancia en Monterrey fuera más divertida.

A los profesores del Instituto de Biotecnología por sus enseñanzas, guía y comentarios durante mi formación de posgrado.

A mi familia y amigos que me dieron su apoyo emocional y las palabras de motivación para iniciar y realizar mis estudios de posgrado.

DEDICATORIAS

A mis padres

Quienes me han dado todo. Sus enseñanzas, su ejemplo y su apoyo son la base de mis logros.

A mi hermana

Llegaste a darle alegría a la familia y me motivaste a convertirme en un mejor ejemplo para ti.

Luis

Mi cómplice en las buenas y en las malas. Siempre me apoyas y me motivas a ser mejor persona.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	xx
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xxi
RESUMEN.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxiv
1.INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Taninos.....	3
2.1.1. Propiedades.....	4
2.2. Tanasas.....	4
2.2.1. Importancia industrial.....	4
2.2.2. Fuentes de tanasas.....	5
2.2.3. Actividad específica y su importancia.....	6
2.2.4. Tanasas microbianas de mayor actividad específica.....	8
2.3. <i>Pichia pastoris</i>	8
2.3.1. Características generales.....	8
2.3.2. Ventajas en proteínas recombinantes.....	9
2.3.3. Características de cultivo.....	10
2.4. Tanasas recombinantes en <i>P. pastoris</i>	11
2.4.1. Tanasa recombinante de <i>Aspergillus niger</i> GH1.....	11
2.4.2. Sitios de reconocimiento de la proteasa Kex2.....	12
2.5. Estrategias de ingeniería de proteínas.....	13
2.5.1. Mutagénesis sitio dirigida.....	14
2.6. Herramientas bioinformáticas para el análisis de los modelos moleculares de proteínas.....	16
2.7. Etapas de downstream en tanasas.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
6.1. Materiales y equipos.....	23
6.2. Material biológico y medios de cultivo.....	24
6.3. Estrategia general.....	24
6.4. Construcción de una secuencia nucleotídica que codifique para la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 con modificación de uno de los sitios de reconocimiento de la proteasa Kex2.....	27
6.4.1. Diseño de oligonucleótidos para mutagénesis mediante extensión por PCR de fragmentos superpuestos.....	27
6.4.2. Obtención de la secuencia nucleotídica de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 con codones preferenciales para <i>P. pastoris</i> a partir del plásmido pPIC9ANT.....	28
6.4.3. Preparación de soluciones de trabajo de oligonucleótidos para la mutagénesis mediante extensión por PCR de fragmentos superpuestos.....	29
6.4.4. Síntesis de los fragmentos primarios de la mutagénesis mediante extensión por PCR de fragmentos superpuestos.....	30

6.4.5. Purificación de los fragmentos primarios.....	32
6.4.6. Síntesis del fragmento TanM a partir de los fragmentos primarios.....	33
6.4.7. Preparación de células de <i>E. coli</i> JM109 calcio-competentes.....	35
6.4.8. Adenilación del fragmento TanM.....	35
6.4.9. Ligación del fragmento TanM con el vector pGEM-T.....	36
6.4.10. Transformación de <i>E. coli</i> JM109 calcio competente con el fragmento TanM.....	37
6.4.11. Caracterización de las cepas de <i>E. coli</i> pGEMTanM.....	37
6.5. Construcción de cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> portadoras de la secuencia nucleotídica capaces de producir y secretar la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 modificada.....	41
6.5.1. Estrategia de subclonación del fragmento TanM en el plásmido pPIC9TqQ.....	41
6.5.2. Preparación de los plásmidos pPIC9TgQ y pGEMTanM.....	41
6.5.3. Digestión preparativa de los plásmidos pPIC9TgQ y pGEMTanM.....	42
6.5.4. Ligación del vector pPIC9 con el fragmento TanM.....	43
6.5.5. Transformación de células de <i>E. coli</i> JM109 calcio competentes con pPIC9TanM.....	44
6.5.6. Caracterización de las cepas de <i>E. coli</i> pPIC9TanM.....	44
6.5.7. Preparación a mediana escala del plásmido pPIC9TanM.....	46
6.5.8. Linealización de pPIC9TanM con la enzima de restricción <i>Sall</i>	48
6.5.9. Transformación de <i>P. pastoris</i> KM71 con el plásmido pPIC9TanM.....	49
6.5.10. Caracterización por PCR de células de <i>P. pastoris</i> KM71 transformadas con el plásmido pPIC9TanM.....	50
6.5.11. Reactivación de clonas de <i>P. pastoris</i> KM71ANT.....	52
6.6. Selección de una cepa de <i>P. pastoris</i> sobreproductora y producción de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 modificada.....	52
6.6.1. Cultivos de inducción en metanol.....	52
6.6.2. Determinación de la concentración de proteínas extracelulares por el método de Bradford y rendimiento proteínas extracelulares/biomasa.....	53
6.6.3. Determinación de actividad enzimática de tanasa.....	54
6.6.4. Determinación del rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$).....	57
6.6.5. Caracterización por PCR de la clona sobreproductora de <i>P. pastoris</i> KM71TanM.....	57
6.6.6. Diferenciación por PCR de la clona sobreproductora de <i>P. pastoris</i> KM71TanM con la clona KM71ANT.....	58
6.6.7. Caracterización de la cepa sobreproductora de <i>P. pastoris</i> KM71TanM en cultivos en matraz con adición de metanol cada 12 y 24 h.....	59
6.6.8. Comparación de la clona sobreproductora de <i>P. pastoris</i> KM71TanM contra la clona KM71ANT.....	59
6.6.9. Obtención del concentrado enzimático del sobrenadante libre de células de los cultivos de <i>P. pastoris</i> KM71TanM y KM71ANT.....	60
6.6.10. Análisis del concentrado enzimático de los cultivos de <i>P. pastoris</i> KM71TanM y KM71ANT por SDS-PAGE.....	60
6.6.11. N-desglicosilación del concentrado enzimático del cultivo de la clona de <i>P. pastoris</i> KM71TanM sobreproductora y KM71ANT.....	61
6.6.12. Cultivo en matraz con inducción en medio BMM-alanina de la clona de <i>P. pastoris</i> KM71TanM sobreproductora y de la cepa KM71ANT.....	62

6.6.13. Preparación de inóculo para el cultivo en biorreactor de la clona de <i>P. pastoris</i> KM71TanM sobreproductora.....	63
6.6.14. Cultivo en biorreactor de la clona de <i>P. pastoris</i> KM71TanM sobreproductora.....	64
6.7. Caracterización bioquímica de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 modificada.....	66
6.7.1. Purificación de la tanasa M y ANT producida en matraz con inducción en medio BMM-alanina.....	66
6.7.2. Actividad específica y constantes cinéticas de las tanasa M y ANT producidas en matraz con inducción en medio BMM-alanina.....	67
6.7.3. Purificación de la tanasa M producida a nivel de biorreactor.....	67
6.7.4. Determinación de la relación entre la concentración de proteínas de tanasa por el método de Bradford y BCA.....	68
6.7.5. Efecto del pH en la actividad enzimática de la tanasa M producida a nivel de biorreactor.....	68
6.7.6. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la tanasa M producida a nivel de biorreactor.....	69
6.7.7. Actividad residual de la tanasa M producida a nivel de biorreactor.....	69
6.7.8. Comparación del modelo molecular y análisis de acoplamiento molecular de las tanasas M y ANT.....	70
6.8. Diseño de un proceso de recuperación y formulación de la tanasa M.....	71
7. RESULTADOS.....	72
7.1. Construcción de una secuencia nucleotídica que codifique para la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 con una modificación de uno de los sitios de reconocimiento de la proteasa Kex2.....	72
7.1.1. Obtención de la secuencia nucleotídica de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 con codones preferenciales para <i>P. pastoris</i> a partir del plásmido pPIC9ANT.....	72
7.1.2. Síntesis del fragmento <i>TanM</i> mediante extensión por PCR de los fragmentos superpuestos.....	73
7.1.3. Construcción de la cepa de <i>E. coli</i> JM109 pGEMTanM.....	74
7.1.4. Caracterización de la cepa de <i>E. coli</i> JM109 pGEMTanM.....	76
7.2. Construcción de cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> portadoras de la secuencia nucleotídica capaces de producir y secretar la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 modificada.....	79
7.2.1. Digestión preparativa de los plásmidos pPIC9TgQ y pGEMTanM.....	79
7.2.2. Construcción de la cepa de <i>E. coli</i> JM109 pPIC9TanM.....	81
7.2.3. Caracterización de la cepa de <i>E. coli</i> JM109 pPIC9TanM.....	82
7.2.4. Construcción de la cepa de <i>P. pastoris</i> KM71TanM.....	85
7.2.5. Caracterización de la cepa de <i>P. pastoris</i> KM71TanM y KM71ANT.....	87
7.3. Selección de una cepa de <i>P. pastoris</i> sobreproductora y producción de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 modificada.....	88
7.3.1. Determinación del rendimiento proteínas extracelulares/biomasa de clonas de <i>P. pastoris</i> KM71TanM.....	88
7.3.2. Determinación del rendimiento producto/biomasa ($Y_{x/p}$).....	90
7.3.3. Caracterización por PCR de la clona sobreproductora de <i>P. pastoris</i> KM71TanM.....	92
7.3.4. Diferenciación por PCR de la clona sobreproductora de <i>P. pastoris</i> KM71TanM con la clona KM71ANT.....	93

7.3.5. Caracterización de la cepa sobreproductora de <i>P. pastoris</i> KM71TanM en cultivos en matraz con adición de metanol cada 12 y 24 h.....	94
7.3.6. Comparación de la clona sobreproductora de <i>P. pastoris</i> KM71TanM contra la clona KM71ANT.....	95
7.3.7. Análisis SDS-PAGE y N-desglicosilación del concentrado enzimático del cultivo de la clona de <i>P. pastoris</i> KM71TanM sobreproductora y KM71ANT.....	96
7.3.8. Cultivo en matraz con inducción en medio BMM-alanina de la clona de <i>P. pastoris</i> KM71TanM sobreproductora.....	97
7.3.9. Cultivo en biorreactor de la clona de <i>P. pastoris</i> KM71TanM sobreproductora.....	98
7.4. Caracterización bioquímica de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 modificada.....	100
7.4.1. Purificación de la tanasa M y ANT producida en matraz con inducción en medio BMM-alanina.....	100
7.4.2. Actividad específica y constantes cinéticas de las tanasa M y ANT producidas en matraz con inducción en medio BMM-alanina.....	102
7.4.3. Purificación de la tanasa M producida a nivel de biorreactor.....	104
7.4.4. Determinación de la relación entre la concentración de proteínas de tanasa por el método de Bradford y BCA.....	105
7.4.5. Efecto del pH en la actividad enzimática de la tanasa M producida a nivel de biorreactor.....	106
7.4.6. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la tanasa M producida a nivel de biorreactor.....	107
7.4.7. Actividad residual de la tanasa M producida a nivel de biorreactor.....	108
7.4.8. Comparación del modelo molecular y análisis de acoplamiento molecular de las tanasa M y ANT.....	108
7.5. Diseño de un proceso de recuperación y formulación de la tanasa M.....	112
8. DISCUSIÓN.....	114
9. CONCLUSIONES.....	123
10. PERSPECTIVAS.....	124
11. BIBLIOGRAFÍA.....	125

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fuentes microbianas de tanasas.....	6
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos para mutagénesis.....	27
Tabla 3. Volumen y concentración final de los reactivos utilizados en la PCR para caracterizar el plásmido pPIC9ANT.....	29
Tabla 4. Condiciones de la PCR para verificar la presencia del gen <i>ANT</i> en el plásmido pPIC9ANT con Flexi Taq DNA polimerasa.....	29
Tabla 5. Volúmenes para la preparación de soluciones de trabajo de los oligonucleótidos.....	30
Tabla 6. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR para el fragmento primario 5'TanX→3'TanMut.....	31
Tabla 7. Condiciones de la reacción de PCR para obtener el fragmento primario 5'TanX→3'TanMut.....	31
Tabla 8. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR para el fragmento primario 5'TanMut→3'TanNot.....	32
Tabla 9. Condiciones de la reacción de PCR para obtener el fragmento primario 5'TanMut→3'TanNot.....	32
Tabla 10. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR secundaria.....	34
Tabla 11. Condiciones de la reacción de PCR para obtener el fragmento de la PCR secundaria (<i>TanM</i>).....	34
Tabla 12. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción de adenilación del fragmento <i>TanM</i>	36
Tabla 13. Volúmenes de los reactivos utilizados en la reacción de ligación del fragmento <i>TanM</i> con el vector pGEM-T.....	37
Tabla 14. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR para caracterizar el plásmido pGEMTanM.....	39
Tabla 15. Condiciones de la reacción de PCR para caracterizar el plásmido pGEMTanM.....	39
Tabla 16. Volumen de las reacciones de digestión preparativa de los plásmidos pPIC9TgQ y pGEMTanM.....	42
Tabla 17. Tamaños de los fragmentos esperados después de la digestión de los plásmidos pPIC9TgQ y pGEMTanM, con las enzimas de restricción <i>XhoI</i> y <i>NotI</i>	42
Tabla 18. Volúmenes de los reactivos utilizados en la reacción de ligación del fragmento <i>TanM</i> con el vector pPIC9.....	44
Tabla 19. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR para caracterizar el plásmido pPIC9TanM.....	45
Tabla 20. Condiciones de la reacción de PCR para caracterizar el plásmido pPIC9TanM.....	45
Tabla 21. Volúmenes de los reactivos utilizados en la reacción de linealización de pPIC9TanM con la enzima de restricción <i>SalI</i>	48
Tabla 22. Parámetros de electroporación utilizados para transformar células competentes de <i>P. pastoris</i>	50

Tabla 23. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR para caracterizar clonas de <i>P. pastoris</i> KM71 transformadas con el plásmido pPIC9TanM.....	51
Tabla 24. Condiciones de la reacción de PCR para caracterizar clonas de <i>P. pastoris</i> KM71 transformadas con el plásmido pPIC9TanM.....	51
Tabla 25. Volúmenes de reacción para la recta de calibración del método de Bradford.....	53
Tabla 26. Volúmenes de reacción para la recta de calibración de la determinación de actividad enzimática de tanasa.....	55
Tabla 27. Mezcla de reacción para la determinación de actividad enzimática de tanasa.....	55
Tabla 28. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR para diferenciar entre la cepa de <i>P. pastoris</i> KM71TanM y la cepa KM71ANT.....	58
Tabla 29. Condiciones de la reacción de PCR para diferenciar entre la cepa de <i>P. pastoris</i> KM71TanM y la cepa KM71ANT.....	59
Tabla 30. Volúmenes para elaborar los geles de poliacrilamida 10%.....	61
Tabla 31. Volúmenes de la reacción de N-desglicosilación del concentrado enzimático de KM71TanM con Endo H.....	62
Tabla 32. Concentración de proteínas, porcentaje de recuperación y actividad específica (AE) de las etapas de purificación del sobrenadante a las 74 h de inducción del cultivo en matraz con medio BMM-alanina de la cepa KM71TanM.....	100
Tabla 32. Concentración de proteínas, porcentaje de recuperación y actividad específica (AE) de las etapas de purificación del sobrenadante a las 74 h de inducción del cultivo en matraz con medio BMM-alanina de la cepa KM71ANT.....	101
Tabla 34. Fuentes microbianas, huésped microbiano para la producción de la enzima, número de cadenas (#C), residuo en el lado carboxilo de la serina de la triada catalítica (R-Ser), constantes cinéticas, actividad específica (AE) y pH y temperatura para la determinación de la actividad de tanasa utilizando galato de metilo como sustrato de diferentes tanasas de <i>Aspergillus</i>	103
Tabla 35. Concentración de proteínas, porcentaje de recuperación y actividad específica (AE) de las etapas de purificación del sobrenadante a las 74 h de inducción del cultivo en biorreactor.	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de taninos.....	3
Figura 2. Estrategia de mutagénesis dirigida por PCR de los fragmentos superpuestos, las flechas P1, P2, P3 y P4 corresponden a los oligonucleótidos. a) Fragmentos de DNA obtenidos durante la PCR primaria. b) Fragmentos de DNA obtenidos durante la PCR secundaria.....	15
Figura 3. Estrategia general que se empleó.....	26
Figura 4. Lugar de hibridación de los oligonucleótidos 5'TanX y 3'TanMut en la secuencia nucleotídica <i>ANT</i>	30
Figura 5. Lugar de hibridación de los oligonucleótidos 5'TanMut y 3'TanNot en la secuencia nucleotídica <i>ANT</i>	31
Figura 6. Superposición de los fragmentos primarios para la síntesis del fragmento secundario de PCR.....	34
Figura 7. Esquema del traslape de los fragmentos secuenciados con los oligonucleótidos utilizados.....	40
Figura 8. Esquema del traslape de los fragmentos secuenciados con los oligonucleótidos utilizados.....	46
Figura 9. Geles de agarosa al 0.8% de A) la extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> JM109 pPIC9ANT. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: DNA plasmídico de <i>E. coli</i> JM109 pPIC9ANT. B) Reacción de PCR para caracterizar el plásmido pGEMANT. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo de PCR (agua), 2: Control positivo de PCR, 3: Muestra del plásmido pPIC9ANT.....	72
Figura 10. Gel de agarosa al 0.8% de la reacción de PCR para sintetizar los fragmentos primarios de la mutagénesis. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo de la PCR del fragmento 5'TanX→3'TanMut, 2: Fragmento 5'TanX→3'TanMut, 3: Control negativo de la PCR del fragmento 5'TanMut→3'TanNot, 4: Fragmento 5'TanMut→3'TanNot.....	73
Figura 11. Gel de agarosa al 0.8% de la reacción de PCR para sintetizar el fragmento <i>TanM</i> a partir de los fragmentos primarios. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo de la PCR del fragmento <i>TanM</i> , 2: Fragmento <i>TanM</i>	74
Figura 12. Gel de agarosa 0.8% de la reacción de ligación entre el vector pGEM-T y el fragmento <i>TanM</i> . M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo de la ligación (sin inserto), 2: Ligación del vector pGEM-T y el fragmento <i>TanM</i>	75
Figura 13. Placas sembradas con células de <i>E. coli</i> JM109 transformadas con el plásmido pGEMTanM. A) Control de viabilidad, B) control negativo de resistencia a ampicilina, C) placa con 4 colonias blancas, D) Placa con 2 colonias blancas.....	76
Figura 14. Geles de agarosa 0.8% de A) la extracción de DNA plasmídico de las clonas blancas de <i>E. coli</i> JM109 transformadas. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1-6: colonias blancas. B) La caracterización por PCR del plásmido pGEMTanM. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo de la reacción de PCR, 2-7: Colonias blancas.....	77

Figura 15. Alineamiento de las secuencias obtenidas por secuenciación y secuencia consenso obtenida con la herramienta CAP de BioEdit.....	78
Figura 16. Gel de agarosa 0.8% de la extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> JM109 pPIC9TgQ y <i>E. coli</i> JM109 pGEMTanM. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: DNA plasmídico de <i>E. coli</i> JM109 pPIC9TgQ, 2: DNA plasmídico de <i>E. coli</i> JM109 pGEMTanM.....	79
Figura 17. Geles de agarosa 0.8% de la reacción de digestión con A) <i>Xho</i> I. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Digestión de pPIC9TgQ, 2: Digestión de pGEMTanM. B) <i>Not</i> I. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Digestión de pPIC9TgQ, 2: Digestión de pGEMTanM.....	80
Figura 18. Gel de agarosa 0.8% de la purificación de los fragmentos pPIC9 y <i>TanM</i> . M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: pPIC9, 2: <i>TanM</i>	81
Figura 19. Gel de agarosa 0.8% de la reacción de ligación entre el vector pPIC9 y el fragmento <i>TanM</i> . M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo de la ligación (sin ligasa), 2: Ligación del vector pPIC9 y el fragmento <i>TanM</i>	81
Figura 20. Placas de la transformación de células competentes de <i>E. coli</i> JM109 con el plásmido pPIC9TanM. A) Control de viabilidad B) Control negativo de resistencia a ampicilina, C) Células transformadas con la reacción de ligación (pPIC9TanM).....	82
Figura 21. Gel de agarosa 0.8% de la PCR para confirmar la presencia del plásmido pPIC9TanM. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo (agua), 2-5: Colonia 1-4.....	83
Figura 22. Alineamiento de las secuencias obtenidas por secuenciación y secuencia consenso obtenida con la herramienta CAP de BioEdit.....	84
Figura 23. Geles de agarosa 0.8% del plásmido pPIC9TanM. A) Extracción de mediana escala, después de concentrar y filtrar en dispositivos concentradores YM3 Millipore. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 2: Plásmido pPIC9TanM. B) Linealización con <i>Sal</i> I, después de concentrar. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1: Plásmido pPIC9TanM linealizado.....	85
Figura 24. Placas de la transformación de células electrocompetentes de <i>P. pastoris</i> KM71 con el plásmido pPIC9TanM. A) Control de viabilidad antes de electroporar, B) control de viabilidad después de electroporar, C) control negativo de la transformación, D) células transformadas (200 μ L), E) Células transformadas (300 μ L), F) Células transformadas (100 μ L), G) Células transformadas (400 μ L).....	86
Figura 25. Geles de agarosa 0.8% de A) la extracción de DNA genómico de clonas de <i>P. pastoris</i> KM71TanM y KM71ANT. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1-2: KM71TanM clona 57 y 59, 3-4: KM71ANT clona 1 y 2. B) Caracterización por PCR de clonas de <i>P. pastoris</i> KM71TanM y KM71ANT. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1: Control negativo (agua), 2: Control positivo (pPIC9TanM), 3-4: KM71TanM clona 57 y 59, 5-6: KM71ANT clona 1 y 2.....	87
Figura 26. Crecimiento celular (DO ₆₀₀) de las 84 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71TanM durante la etapa de inducción en metanol.....	88
Figura 27. Concentración de proteínas extracelulares de las 84 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71TanM a las 48 h de inducción del gen heterólogo.....	89

Figura 28. Rendimiento proteínas extracelulares/biomasa de las 84 clonas de <i>P. pastoris</i> KM71TanM a las 48 h de inducción del gen heterólogo.....	90
Figura 29. Crecimiento celular de las clonas de <i>P. pastoris</i> KM71TanM seleccionadas como de mayor, medio y menor rendimiento proteínas extracelulares /biomasa.....	90
Figura 30. Cinética de actividad volumétrica de tanasa de las clonas de <i>P. pastoris</i> KM71TanM seleccionadas como de mayor, medio y menor rendimiento proteínas extracelulares /biomasa.....	91
Figura 31. Rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$) a las 12 h de inducción de las clonas de <i>P. pastoris</i> KM71TanM seleccionadas como de mayor, medio y menor rendimiento proteínas extracelulares/biomasa.....	92
Figura 32. Geles de agarosa 0.8% de A) la extracción de DNA genómico de la cepa sobreproductora <i>P. pastoris</i> KM71TanM-83. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1: KM71TanM clona 83. B) Caracterización por PCR de la cepa sobreproductora <i>P. pastoris</i> KM71TanM-83. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1: Control negativo (agua), 2: Control positivo (pPIC9TanM), 3: KM71TanM clona 83.....	93
Figura 33. Gel de agarosa 0.8% de la PCR para diferenciar entre la clona KM71TanM de la clona KM71ANT. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1: Control negativo (agua) con los oligonucleótidos 5'TanCgs y 3'TanNot, 2: KM71TanM, 3: KM71ANT, 4: Control negativo (agua) con los oligonucleótidos 5'TanCgs y 3'TANGSA, 5: KM71TanM, 6: KM71ANT.....	94
Figura 34. Cinética de crecimiento y concentración de proteínas extracelulares de la clona KM71TanM-83 con adición de metanol cada 12 y 24 h.....	94
Figura 35. Cinética de crecimiento y producción de proteínas de las cepas KM71TanM y KM71ANT.....	95
Figura 36. Cinética de actividad volumétrica y pH de los cultivos de las cepas KM71TanM y ANT.....	96
Figura 37. Geles de poliacrilamida al 10% de los tratamientos de N-desglicosilación de los cultivos de KM71TanM y KM71ANT a las A) 24 h y B) 48 h de inducción. M: Marcador de masa molecular, 1: Tanasa M sin desglicosilar, 2: Tanasa M desglicosilada, 3: Tanasa ANT sin desglicosilar, 4: Tanasa ANT desglicosilada, 5: EndoH.	97
Figura 38. Gel de poliacrilamida al 10% del tratamiento de N-desglicosilación de los cultivos de KM71TanM y KM71ANT en medio BMM-alanina a pH 5.0 a las 72 h de inducción. M: Marcador de masa molecular, 1: Tanasa M sin desglicosilar, 2: Tanasa M desglicosilada, 3: Tanasa ANT sin desglicosilar, 4: Tanasa ANT desglicosilada, 5: EndoH.....	98
Figura 39. Cinética de crecimiento celular y actividad de tanasa extracelular del cultivo en biorreactor de la clona sobreproductora de <i>P. pastoris</i> KM71TanM.....	99
Figura 40. Gel de poliacrilamida al 10% del tratamiento de N-desglicosilación del sobrenadante a las 74 h de inducción del cultivo en biorreactor de la cepa KM71TanM. M: Marcador de masa molecular, 1: Tanasa M sin desglicosilar, 2: Tanasa M desglicosilada, 3: Endo H.....	100
Figura 41. Cromatogramas de la purificación por cromatografía de intercambio aniónico del sobrenadante de los cultivos de A) KM71TanM y B) KM71ANT en	

medio BMM-alanina a pH 5.0 a las 72 h de inducción después del cambio de buffer a Tris-HCl 100 mM pH 7.0.....	101
Figura 42. Gel de poliacrilamida al 10% del tratamiento de N-desglicosilación de la fracción eluida a 0.18 M NaCl de los cultivos de KM71TanM y KM71ANT en medio BMM-alanina a pH 5.0 a las 72 h de inducción. M: Marcador de masa molecular, 1: Tanasa M sin desglicosilar, 2: Tanasa M desglicosilada, 3: Tanasa ANT sin desglicosilar, 4: Tanasa ANT desglicosilada, 5: EndoH.....	102
Figura 43. Cinéticas Michaelis-Menten para A) la tanasa M y B) la tanasa ANT utilizando galato de metilo como sustrato. Los puntos representan la media de tres ensayos enzimáticos independientes, y la línea punteada representa los mínimos cuadrados no lineales que mejor se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten.....	103
Figura 44. Cromatograma de la purificación por cromatografía de intercambio aniónico del sobrenadante del cultivo en biorreactor a las 74 h de inducción después del cambio de buffer a Tris-HCl 100 mM pH 7.0.....	104
Figura 45. Gel de poliacrilamida al 10% del tratamiento de N-desglicosilación de las fracciones recuperadas en la cromatografía de intercambio aniónico del cultivo en biorreactor de KM71TanM. M: Marcador de masa molecular, 1: Fracción eluida a 0.18 M NaCl sin desglicosilar, 2: Fracción eluida a 0.18 M NaCl desglicosilada, 3: Fracción eluida a 0.30 M NaCl sin desglicosilar, 4: Fracción eluida a 0.18 M NaCl desglicosilada, 5: EndoH.....	105
Figura 46. Relación entre la concentración de proteínas de tanasa por el método de Bradford y BCA. Los puntos representan la media de tres determinaciones de proteínas independientes.....	106
Figura 47. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la tanasa M a 30°C. Los puntos representan la media de tres ensayos enzimáticos independientes.....	107
Figura 48. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la tanasa M a pH 5.0. Los puntos representan la media de tres ensayos enzimáticos independientes.....	107
Figura 49. Actividad residual de la tanasa M a pH 5.0 almacenada a 4 y 30°C. Los puntos representan la media de tres ensayos enzimáticos independientes.....	108
Figura 50. Superposición de la tanasa M y la tanasa ANT. Los dominios tapa de la tanasa M y ANT se muestran en colores rojo y verde, respectivamente. Los dominios hidrolasa α/β se muestran en color naranja y azul cielo, respectivamente.....	109
Figura 51. Perspectiva del bucle flexible de la tanasa M y la tanasa ANT; a partir de la figura 50 con rotación de 90°, -20° y 30° para los ejes y, x y z, respectivamente. El bucle flexible se visualiza (dentro del círculo) en el dominio tapa en la superficie del surco de actividad. El galato de metilo se muestra en color magenta. Los dominios tapa de la tanasa M y ANT se muestran en colores rojo y verde, respectivamente. Los dominios hidrolasa α/β se muestran en color naranja y azul cielo, respectivamente.....	110
Figura 52. Superposición de la triada catalítica y el puente disulfuro de la tanasa M (color tan) y la tanasa ANT (color azul cornflower). Los primeros y segundos números corresponden a los residuos de la tanasa M y ANT, respectivamente.....	111

Figura 53. Complejo enzima-sustrato entre la tanasa M y el galato de metilo (color azul cielo). Se muestran la triada catalítica, las cisteínas vecinas, y los aminoácidos alrededor del sustrato. Los puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del galato de metilo y los residuos de la enzima se muestran en líneas discontinuas color verde.....	112
Figura 54. Diagrama del downstream propuesto para obtener el formulado en polvo de la tanasa M a concentración de 500 U/g.....	113

ÍNDICE DE ECUACIONES.

Ecuación 1. Cálculo de la cantidad de inserto requerida para ligar el vector pGEM-T.....	36
Ecuación 2. Cálculo de la cantidad de inserto requerida para ligar con el vector pPIC9.....	43
Ecuación 3. Cálculo de la concentración de proteínas extracelulares.....	54
Ecuación 4. Cálculo del rendimiento de proteínas extracelulares por g de biomasa peso seco.....	54
Ecuación 5. Cálculo de la absorbancia de ácido gálico liberado.....	56
Ecuación 6. Cálculo de la concentración de ácido gálico.....	56
Ecuación 7. Cálculo de la concentración de ácido gálico.....	56
Ecuación 8. Cálculo de la actividad específica de tanasa.....	57
Ecuación 9. Cálculo del rendimiento producto/biomasa $Y_{p/x}$	57
Ecuación 10. Cálculo de la actividad residual de tanasa.....	68

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
AE	Actividad específica
AOX1	Gen que codifica para la AOX1
AGL	Ácido gálico liberado
ART	Actividad residual de tanasa
ASB	Albúmina sérica bovina
AVT	Actividad volumétrica de tanasa
BMG	Medio mínimo amortiguado, adicionado con glicerol
BMM	Medio mínimo amortiguado, adicionado con metanol
BMM-alanina	Medio mínimo amortiguado, adicionado con metanol y L-alanina
CAGL	Concentración de ácido gálico liberado
DO _{520nm}	Densidad óptica a 520 nm
DO _{595nm}	Densidad óptica a 595 nm
DO _{600nm}	Densidad óptica a 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
His ⁺	Fenotipo <i>HIS4</i> positivo
<i>HIS4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa
IPTG	Isopropilthio-β-D-galactósido
kb	Kilobase = Mil pares de bases
kDa	Kilodaltones= Mil daltones
K _m	Constante de Michaelis Menten
KOH	Hidróxido de potasio
KM71ANT	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de la tanasa de <i>Aspergillus niger</i> GH1
KM71TanM	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de la tanasa de <i>Aspergillus niger</i> GH1 con modificación en el sitio de reconocimiento de la proteasa Kex2
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
M	Marcador de masa molecular
mA	Miliamperes
μg/mL	Microgramos por mililitro
μL	Microlitros
μM	Micromolar
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de iones de hidrógeno
PSA	Persulfato de amonio
RDB	Medio de regeneración básico de dextrosa sin histidina
rpm	Revoluciones por minuto

s	Segundos
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
TE	Amortiguador de pH Tris-HCl con EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSNT	Tritón-SDS-NaCl-Tris-HCl
U	Unidades enzimáticas
U/mg	Unidades por miligramo de proteína
U/mL	Unidades por mililitro
UV	Radiación ultravioleta
V _{max}	Velocidad máxima
YNB	Base nitrogenada de levadura
YPD	Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y dextrosa
X	Número de veces la concentración
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

RESUMEN

Las tanin acil hidrolasas o tanasas (E.C. 3.1.1.20) son enzimas que hidrolizan el enlace éster de los taninos para producir ácido gálico y glucosa. Estas enzimas han sido utilizadas en la industria de bebidas para potenciar la clarificación de cervezas, vinos e infusiones de té. En este trabajo, se desarrolló un proceso de producción de una tanasa recombinante de una cadena polipeptídica de interés industrial. Para ello la secuencia que codifica para la tanasa de *Aspergillus niger* GH1 fue mutada y clonada en cepas de *Pichia pastoris* Mut^S para producir y secretar la enzima como una proteína de una cadena. La tanasa recombinante N-glicosilada tuvo una masa molecular aparente después de N-desglicosilar de 65.4 kDa, y mostró actividad en un amplio intervalo de pH y temperatura (2.5 a 9 y 10 a 60°C, respectivamente). El pH y temperatura óptimos fueron de 5.0 y 20°C. La actividad específica de la tanasa mutada fue 11 veces mayor comparada con la tanasa recombinante de *A. niger* GH1 de doble cadena también producida en *P. pastoris*. El análisis estructural sugirió que la alta actividad específica puede deberse a la presencia de un bucle flexible en el dominio tapa, el cual puede controlar y guiar al sustrato hacia el sitio activo. En contraste, la baja actividad específica de la tanasa recombinante de *A. niger* GH1 puede deberse a la presencia de un bucle flexible y desordenado que puede impedir el acceso del sustrato hacia el sitio de unión. Un análisis de costos de la preparación de un producto prototipo de tanasa recombinante basado en los rendimientos del proceso en biorreactor y en una propuesta del proceso de preparación de un formulado en polvo llevaron a un precio comercial de 30 a 50 veces menor al de las tanasas disponibles en el mercado. Basados en los perfiles de pH y temperatura, estabilidad, alta actividad específica, y la posibilidad de la producción en el sistema de expresión de *P. pastoris*, la tanasa producida y descrita en este trabajo puede ser utilizada en procesos de alimentos y bebidas a temperaturas bajas y medias.

ABSTRACT

Tannin acyl hydrolases or tannases (E.C.3.1.1.20) are enzymes that hydrolyze the ester bond of tannins to produce gallic acid and glucose. This enzyme has been used in beverage industry to enhance the beer, wine, and tea infusions clarification. In this work, the production process of recombinant tannase of one polypeptide chain of industrial interest was developed. For this, the sequence that codes for *Aspergillus niger* GH1 tannase was mutated and cloned in *Pichia pastoris* Mut^S strains to produce and secrete the enzyme as a single-chain protein. The recombinant tannase was N-glycosylated, had a molecular mass after N-deglycosylation of 65.4 kDa, and showed activity over broad pH and temperature ranges from 2.5 to 9 and 10 to 60°C, respectively. The optimum pH and temperature were 5.0 and 20°C, respectively. The single-chain tannase had an 11-fold increased specific activity in comparison to the double-chain *A. niger* GH1 tannase, which was also produced in *P. pastoris*. Structural analysis suggested that the high specific activity may be due to the presence of a flexible loop in the lid domain, which can control and drive the substrate to the active site. In contrast, the low specific activity of the double-chain tannase may be due to the presence of a disordered and flexible loop that could hinder the substrate's access to the binding site. A cost analysis of the preparation of a prototype recombinant tannase product based on the bioreactor process yields and a proposal for the preparation process of a powder formulation led to a commercial price of 30 to 50 times lower than that of tannases available in the market. Based on its biochemical properties, high specific activity, and the possibility of its production in *P. pastoris*, the tannase described could be used in food and beverage processing at low and medium temperatures.

1. INTRODUCCIÓN

Los taninos son compuestos polifenólicos que se encuentran de manera natural en diversas plantas. Tienen la capacidad de formar complejos con moléculas como proteínas, celulosa, almidón y metales pesados. Esta capacidad los vuelve un problema cuando se encuentran en productos a base de frutas y alimentos de rumiantes, ya que no permiten la adecuada nutrición del animal o le dan sabor amargo al alimento. Además, son moléculas resistentes a la biodegradación y al acumularse en efluentes constituyen un grave problema de contaminación (Rodríguez-Durán et al. 2010).

Las tanasas, son enzimas que degradan los taninos (Belmares et al. 2004), por ello son enzimas con potencial aplicación en procesos industriales de alimentos, como la clarificación de jugos, café, refrescos, vinos, cerveza y procesos de detanificación de alimentos para rumiantes, o bien de producción de ácido gálico, precursor del trimpetroprim (Govindarajan et al. 2016). A pesar de ser enzimas con diversas aplicaciones, la producción industrial de tanasas está limitada por factores como los elevados costos de producción y el escaso conocimiento respecto al comportamiento de la enzima. Por ello casi no se encuentran tanasas disponibles en el mercado (Aguilar et al. 2007).

La actividad específica es un parámetro bioquímico que se define como la actividad enzimática por miligramo de proteína total, expresada en U/mg proteína. Además de ser una medida de la pureza de una enzima, también es una medida de la eficiencia de la enzima debido a que está relacionada con el número de recambio. Por lo anterior, el precio de las enzimas se fija en base a las unidades enzimática, lo cual hace que una enzima con alta actividad específica sea más deseable para un proceso industrial (Svoboda 1985; Saraswat et al. 2013). Actualmente se ha explorado la opción de producir tanasas recombinantes en modelos microbianos más estables y que garanticen mayor producción de la enzima, como lo es la levadura *Pichia pastoris* (Rosano y Ceccarelli, 2014; Sphoner et al., 2015). No obstante, las tanasas recombinantes actualmente producidas en *P. pastoris* tienen baja actividad específica, lo que les da una desventaja para ser utilizadas en la industria. La ingeniería de proteínas es una herramienta que permite realizar

modificaciones puntuales a las enzimas recombinantes que pueden ser determinantes para cambiar sus propiedades intrínsecas.

En un trabajo anterior del laboratorio se produjo la tanasa recombinante de *A. niger* GH1 (Fuentes-Garibay et al. 2015), un hongo xerofílico aislado del semi desierto mexicano, el cual tolera condiciones extremas típicas de la región (45 a -15°C) (Renovato et al. 2011). En dicho trabajo se utilizó la levadura *P. pastoris* (*Komagataella* spp.) como hospedero debido a que en bioprocesos controlados puede crecer en medio simple y alcanza altas concentraciones de concentración de biomasa, además de producir altos niveles de proteína recombinante extracelular (Karbalei et al. 2020). Sin embargo, la actividad específica de la tanasa recombinante fue baja comparada con lo reportado para la tanasa nativa (Fuentes-Garibay et al. 2015, Renovato et al. 2011). Además, el análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostró que la tanasa recombinante es una enzima con dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro y generadas por el corte proteolítico específico mediado por la proteasa Kex2. En contraste, la tanasa nativa de *A. niger* GH1 es una tanasa de una cadena (Renovato et al. 2011). Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un proceso de producción en *P. pastoris* de una tanasa recombinante de una cadena polipeptídica con alta actividad específica atractiva para su aplicación industrial.

2. ANTECEDENTES

2.1. Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos con un peso molecular de 300 a 3000 Da, que se encuentran de manera natural en diversas plantas (Lekha y Lonsane 1997). Son considerados metabolitos secundarios porque no participan directamente en el metabolismo de las plantas. Son el grupo de compuestos más abundante en plantas, después de la lignina (Aguilar et al. 2007).

Aunque a menudo se emplea el término taninos como una sola unidad de moléculas con características comunes, los taninos están clasificados en cuatro grandes grupos: galotaninos, elagitaninos, taninos condensados y taninos complejos (Figura 1). Los galotaninos son aquellos en los cuales las unidades de galoil están unidas a diversas unidades de poliolcatequinas o triterpenoides. Los elagiotaninos son taninos en los cuales al menos dos unidades de galoil están acopladas una a la otra mediante un enlace C-C, y no contienen una unidad de catequina unida mediante un enlace glicosídico. Los taninos complejos son taninos que tienen una unidad de catequina unida glicosídicamente a una unidad de galotanino o elagiotanino. Los taninos condensados son todas las proantocianidinas oligoméricas y poliméricas formadas por la unión del carbono 4 de una catequina con el carbono 8 ó 6 de la siguiente catequina monomérica. (Khanbabaee y Ree, 2001).

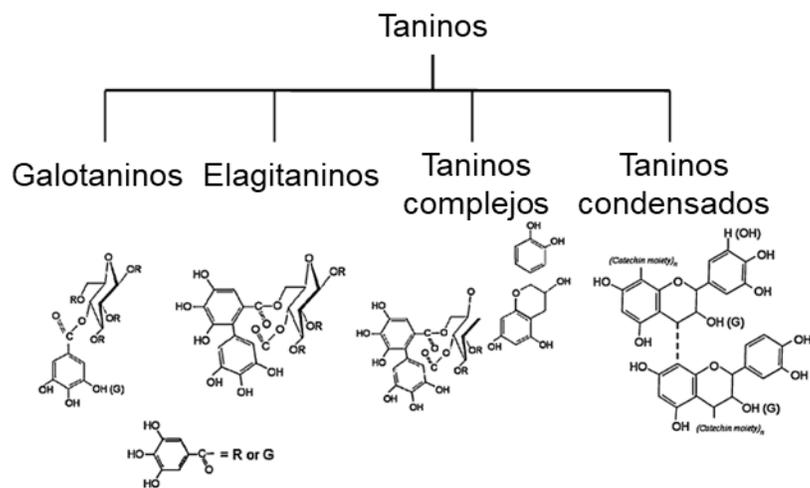


Figura 1. Clasificación de taninos (imagen tomada de Aguilar et al. 2007).

2.1.1. Propiedades

Los taninos son muy utilizados en medicina tradicional en China y Japón como antiinflamatorios, antisépticos, antihemorrágicos, antidiuréticos, antidiarreicos y como agentes astringentes. Sin embargo, tienen la capacidad de formar complejos con moléculas como proteínas, celulosa, almidón y metales pesados. Esta capacidad los vuelve un problema cuando se encuentran en alimentos de rumiantes, ya que no permiten la adecuada nutrición del animal o le dan sabor amargo al alimento (Kumar y Singh 1984). Además, son moléculas resistentes a la biodegradación y al acumularse en efluentes constituyen un grave problema de contaminación (Rodríguez-Durán et al. 2010).

2.2. Tanasas

Las tanin acil hidrolasas (EC 3.1.1.20) o también conocidas como tanasas, son enzimas de tipo hidrolasa que catalizan la ruptura de los enlaces tipo éster de taninos formándose principalmente ácido gálico y glucosa (Belmares et al. 2004).

2.2.1. Importancia industrial

Las tanasas tienen aplicaciones en procesos industriales de alimentos con gran valor económico, como es en la industria de los jugos frutales (94.3 mil millones de euros) (Skotnicki-Hoogland 2016), vinos (28.9 mil millones de euros) (Aurand 2016), y cerveza (89 mil millones de euros) (Institute of Alcohol Studies, 2016). Su principal uso es debido a su habilidad para potenciar la clarificación de la cerveza, el vino y las infusiones de té (Govindarajan et al. 2016). El uso de tanasas en la elaboración de infusiones de té reduce la formación de crema de té, previene la turbidez y aumenta la estabilidad en el almacenamiento a bajas temperaturas (Li et al. 2017). En el caso del té oolong se ha reportado que el tratamiento enzimático con tanasas aumenta el rendimiento de la extracción 2.1 veces y promueve el desarrollo del regusto dulce en las infusiones de té (Shao et al. 2020). Las tanasas también son utilizadas en procesos de detanificación de harina de sorgo donde el contenido de taninos y compuestos fenólicos se pueden reducir en un 50 y 12%; esto permite que el sorgo sea utilizado como alimento para rumiantes

(Morganna et al. 2020). El ácido gálico es de interés en la industria farmacéutica para la síntesis de trimetoprim, y también es utilizado como antioxidante en aceites y bebidas (Govindarajan et al. 2016).

A pesar de ser enzimas con diversas aplicaciones, la producción industrial de tanasas está limitada por factores como los elevados costos de producción y el escaso conocimiento respecto al comportamiento de la enzima. Por ello casi no se encuentran tanasas disponibles en el mercado. Las tanasas se comercializan principalmente en Asia, por compañías como Sunson, Xi'an Ski Biological Technology Co., Hunan Insen Biotech Co., por mencionar algunas; las cuales distribuyen la tanasa en presentación de polvos con una concentración de 300 a 500 U/g de polvo. También son producidas por Biocon y Kikkoman, las cuales se producen mediante fermentación en estado sólido (Aguilar et al. 2007).

2.2.2. Fuentes de tanasas

Las tanasas pueden ser extraídas de fuentes animales y plantas como las vainas de *Caesalpinia coriaria*, frutos de *Terminalia chebula*, en hojas de *Anogeissus latifolia*, *Cassia fistula*, *Acacia arabica* y *Cassia auriculata* (Natarajan 2009). También se pueden obtener de diversas fuentes microbianas, como las expuestas en la Tabla 1 (Aguilar et al. 2007). No obstante, para procesos de escalamiento industrial, es conveniente utilizar tanasas de origen microbiano porque los procesos en biorreactor tienen la capacidad de producir mayor cantidad de producto y son fácilmente controlables (Lekha y Lonsane 1997).

Tabla 1. Fuentes microbianas de tanasas (Aguilar et al. 2007).

Bacteria	Levaduras	Hongos
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Candida</i> sp.	<i>Penicillium digitatum</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Penicillium acrellanum</i>
<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Mycotorula japónica</i>	<i>Penicillium carylophilum</i>
<i>Corynebacterium</i> sp	<i>Pichia</i> spp.	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Penicillium charlessi</i>
<i>Klebisella planticola</i>	Hongos	<i>Penicillium variable</i>
<i>Klebisella pneumoniae</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium glaucum</i>
<i>Pseudomonas solanaceanum</i>	<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Penicillium crustosum</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Aspergillus gallonyces</i>	<i>Penicillium restrictum</i>
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Penicillium glabrum</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Trichoderma hamatum</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Aspergillus caespitosum</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>Lactobacillus animalis</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Fusarium oxysporium</i>
<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Mucor</i> sp.
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus aureus</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>
<i>Weissella paramesenteroides</i>	<i>Aspergillus fischeri</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Leuconostoc fallax</i>	<i>Aspergillus rugulosus</i>	<i>Cryphonectria parasitica</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Heliocostylum</i> sp.
<i>Pediococcus acdilactici</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>	<i>Cunninghamella</i> sp.
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Penicillium notatum</i>	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Penicillium islandicum</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>Selenomonas ruminantium</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	

2.2.3. Actividad específica y su importancia

La actividad de una enzima se mide en unidades (U) de actividad enzimática. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 μmol de producto por minuto (o consumo de 1 μmol de sustrato por minuto) a las condiciones de la realización del ensayo enzimático. En el caso de las tanasas, la actividad enzimática se determina comúnmente mediante el método de Sharma et al. (1999), el cual se fundamenta en medir el ácido gálico liberado durante la reacción de la enzima con el metilgalato como sustrato. El ácido gálico liberado se determina mediante una reacción colorimétrica con la 2-tio-4-cetotiazolidina (también conocida como rodanina), midiendo la absorción de luz visible a 520 nm. Por otro lado, la actividad específica de una enzima es una relación de la actividad catalítica de la enzima, expresada en unidades de actividad enzimática, por unidad de masa de enzima, expresada en miligramos de proteína (Mckee y Mckee 2013).

La actividad específica de una enzima es una propiedad intrínseca de la enzima y debe ser determinada a partir de una muestra de la enzima purificada.

Cabe mencionar que, para establecer la actividad específica de una enzima, además de la actividad enzimática de una fracción de enzima con alta pureza, se debe conocer la cantidad total de proteínas en la fracción purificada. Los métodos comúnmente utilizados para la determinación de la concentración de proteínas son los métodos de Bradford, Lowry, y el método que emplea el ácido bicinconínico (bicinchoninic acid, BCA). El método de Bradford es el método colorimétrico por elección, por ser de alta sensibilidad y rapidez de análisis. Este método consiste en la interacción de residuos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina) con el reactivo azul brillante de Coomassie (CBB) en una matriz ácida. La unión del CBB con las proteínas resulta un complejo de color azul (Bradford 1976). Mientras tanto, el método de Lowry se fundamenta en dos etapas en condiciones alcalinas: 1) la reacción de Biuret, que consiste en la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+} el cual posteriormente se une a la proteína formando un complejo; 2) la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu por parte del complejo péptido- Cu^{+} . La desventaja de este método es que la presencia de polifenoles puede dar falsos positivos. (Lowry et al. 1951). El método que utiliza el ácido bicinconínico (BCA) es similar al método de Lowry, en que depende de la conversión de Cu^{+2} a Cu^{+1} bajo condiciones alcalinas. Tiene la ventaja que generalmente es más tolerante a la presencia de interferencias, que el método de Lowry. El Cu^{+} se cuantifica por la reacción con BCA produciendo un color púrpura intenso con absorción a 562 nm (Smith et al. 1985).

La actividad específica de una enzima es una magnitud que se utiliza para supervisar el proceso de purificación de una enzima, ya que este valor va aumentando conforme aumenta la pureza de la enzima llegando a un valor máximo. Por ello, el valor de la actividad específica de una enzima en su mayor grado de pureza es el mismo sin importar cómo se produjo, y por lo tanto es una propiedad intrínseca de la enzima. Por otro lado, la actividad específica de una enzima es directamente proporcional a la actividad enzimática por molécula de enzima o número de recambio, el cual es una medida de la eficiencia de la enzima. Por lo tanto, este parámetro puede servir para comparar la actividad enzimática por molécula de enzima o eficiencia entre dos enzimas de pesos moleculares y constantes

de Michaelis similares. Además, si dos enzimas de pesos moleculares similares se producen como recombinantes en un sistema que no causen toxicidad, se obtendrá prácticamente la misma cantidad en términos de masa de cada una de ellas, mientras que se obtendrá una mayor cantidad de unidades enzimáticas de la enzima que tenga mayor actividad específica. Al momento de comercializar una enzima, su precio se fija en unidades enzimáticas y no en unidades de masa, por lo que la mayor producción de unidades enzimáticas aumenta la rentabilidad del proceso de producción de la enzima (Copelan 2000, Woodley 2013).

2.2.4. Tanasas microbianas de mayor actividad específica

De acuerdo con la base de datos de enzimas BRENDA, las tanasas de mayor actividad específica reportadas son las producidas por *Paecilomyces variotii*, actividad específica de 49,333 U/mg de proteína (Mahendran et al. 2006) y *Aspergillus awamori* BTMFW032, con actividad específica de 2,761.89 U/mg de proteína (Beena et al 2010). Sin embargo, estas tanasas no han sido caracterizadas a nivel de su secuencia aminoacídica, por lo que no pueden ser utilizadas, de manera inmediata, para ser producidas como recombinantes o bien para ser rediseñadas por Ingeniería de Proteínas. La tercer tanasa de mayor actividad específica reportada en BRENDA es la tanasa de *Aspergillus niger* GH1, la cual presenta valores una actividad específica de 264.45 U/mg proteína al producirse en fermentación sumergida (Renovato et al. 2011). La secuencia aminoacídica completa de esta tanasa está disponible, además hay reportes de la producción de esta tanasa como proteína recombinante en *P. pastoris* (Fuentes-Garibay et al. 2015).

2.3. *Pichia pastoris*

2.3.1. Características generales

Uno de los modelos biológicos con gran potencial para la producción de proteínas recombinantes es la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (*Komagataella* spp.). Esta levadura ha sido utilizada para la producción de más de 500 proteínas recombinantes,

algunas de las cuales ya son de uso comercial (Sphoner et al. 2015). El método más utilizado para la transformación de *P. pastoris* es a través de la inserción del gen de interés en el genoma de la levadura bajo el control del promotor de la alcohol oxidasa 1 (P_{AOX1}), el cual es un promotor fuerte e inducible bajo la presencia de metanol como única fuente de carbono (Cereghino y Cregg 2000).

Se conocen tres fenotipos correlacionados con la habilidad de *P. pastoris* para metabolizar metanol. El fenotipo de utilización de metanol positivo Mut^+ , el cual crece en metanol a la misma velocidad que las cepas silvestres; el fenotipo de utilización lenta Mut^S , que crece en metanol lentamente, y el fenotipo de utilización negativa Mut^- , que no puede metabolizar metanol (Cereghino y Cregg 2000).

2.3.2. Ventajas en proteínas recombinantes

Uno de los atractivos de la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* se debe a que es eficiente en procesos a gran escala. Tiene la capacidad de producir grandes cantidades de proteína intracelular y extracelular cuando se realiza el cultivo en un biorreactor, además que alcanza altos niveles de densidad celular (130 g/L de biomasa seca) y una producción de proteína recombinante de hasta 20 g/L (Sphoner et al. 2015).

La producción de proteínas en *P. pastoris* presenta ventajas sobre la producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, porque tiene la facilidad de integrar el gen heterólogo en su genoma, y con ello se obtiene un microorganismo recombinante con mayor estabilidad génica respecto al gen heterólogo (Cereghino y Cregg 2000). Otra ventaja que ofrece *P. pastoris* sobre *E. coli* es que puede realizar modificaciones post-traduccionales como glicosilación, formación de puentes disulfuro y procesamiento proteolítico, que ayudan al correcto plegamiento de las proteínas recombinantes de origen eucariótico, lo cual está limitado en hospederos procariontes (Ahmad et al. 2014).

2.3.3. Características de cultivo

El cultivo en biorreactor de *P. pastoris* para producir proteínas recombinantes utilizando el promotor *AOXI* se basa en tres etapas principales. La primera es el crecimiento de la cepa en un cultivo en lote (batch) utilizando una fuente de carbono no fermentable como glicerol o glucosa. La segunda etapa es la etapa de transición, donde las células se preparan para la etapa de inducción del gen heterólogo ya que se inicia la desrepresión de P_{AOXI} . Esta etapa se realiza mediante un cultivo en lote alimentado (fed-batch) con glicerol a concentraciones limitantes para el crecimiento, aumentando así la concentración de biomasa (densidad celular). La tercera etapa es la de inducción del gen heterólogo, lo cual se logra al añadir metanol en un proceso de lote alimentado (D'Anjou y Dauglulis, 2000; Cereghino et al. 2002).

Aunque se conocen las condiciones de cultivo que requiere *P. pastoris* para crecer, las condiciones óptimas para la mayor producción de proteínas recombinantes varían de proteína a proteína. En la producción de glicerol quinasa recombinante se obtuvo la mayor acumulación de biomasa y actividad específica al utilizar un medio de cultivo con 1% de glicerol y 1% de metanol (Aizemberg et al. 2011), mientras que la producción de β -xilosidasa recombinante proveniente de *Selenomonas ruminantium* se dio después de 72 h de inducción con metanol al 1% en condiciones de pH 5 y temperatura de 20°C (Dehnavi et al. 2016). Para la producción de un anticuerpo de una cadena (scFv) se reportó que las condiciones óptimas de pH son entre 7.5 y 8. Por otro lado, se observó que al utilizarse una temperatura de 30°C durante la fase de crecimiento de biomasa y de 15°C en la fase de inducción con metanol se propicia una mayor recuperación de scFv (Shi et al. 2003). En el caso de la hemoglobina recombinante de *Vitreoscilla*, se aumenta la producción cuando se cultiva a bajas temperaturas de 23°C (Wu et al. 2012). Por otro lado, la lactona estearasa recombinante de *Starmerella bombicola* requiere condiciones de pH 6 y temperatura de 16°C para aumentar la producción en *P. pastoris* (De Waele et al. 2018). La temperatura óptima para producir proteínas anticongelantes provenientes del arenque atlántico (*Clupea harengus harengus*) es de 23°C (Li et al. 2001). Con la lipasa de *Rhizopus oryzae* utilizando temperatura de 22°C se aumenta la producción de biomasa (Berrios et al. 2017). La expresión de mini-proinsulina recombinante es mayor cuando la

fase de inducción se lleva a cabo en pH 6.3 y temperatura de 22°C (País-Chanfraud et al. 2004).

2.4. Tanasas recombinantes en *Pichia pastoris*

Actualmente se ha explorado la opción de producir tanasas recombinantes en algunos modelos microbianos que garanticen la mayor producción de la enzima y en los cuales durante su proceso de producción se puede potenciar la purificación (Rosano y Ceccarelli 2014). Uno de estos modelos microbianos es *P. pastoris*, en el cual hay reportes de producción de enzimas recombinantes de uso en la industria de alimentos, entre ellas, algunas tanasas provenientes de *A. niger* y *Aspergillus oryzae* (Spohner et al. 2015). Sin embargo, la actividad específica no sobrepasa la obtenida con la enzima nativa, a pesar de que la secuencia aminoacídica se mantiene, por lo que se debe investigar más sobre como inducir a que las modificaciones post-traduccionales de la enzima propicien una mayor actividad específica.

2.4.1. Tanasa recombinante de *Aspergillus niger* GH1

Nuestro grupo de trabajo produjo en *P. pastoris* la tanasa de *A. niger* GH1 (Fuentes-Garibay et al. 2015). Los niveles de producción fueron de 0.57 U/mL después de 48 h de inducción con metanol en cultivos en matraz. Esta tanasa mostró un pH y temperatura óptima de actividad de 5 y 20°C, respectivamente, lo cual se diferencia de la tanasa nativa en cuanto a su perfil de actividad respecto a la temperatura. Además, la actividad específica de un extracto semipurificado de la tanasa recombinante fue de sólo de 50 U/mg de proteínas (pH 5, 20°C), lo cual es mucho menor que la actividad específica reportada para la tanasa nativa (264 U/mg de proteínas [pH 7, 30°C], Renovato et al., 2011). Los análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS mostraron que la tanasa recombinante de *A. niger* GH1 está formada por dos subunidades unidas por puentes disulfuro generadas por la proteasa Kex2 de *P. pastoris*, mientras que la tanasa nativa está constituida en una única cadena polipeptídica estabilizada por puentes disulfuro (Renovato et al., 2011). De acuerdo con la literatura, se reportó que la delección de los

sitios de reconocimiento de Kex2 en la tanasa recombinante de *A. oryzae* TH generó una tanasa de una cadena polipeptídica que mostró el mismo pH óptimo de actividad, pero diferente perfil de actividad respecto a la temperatura, y aumentó su actividad específica (Koseki et al. 2017).

2.4.2. Sitios de reconocimiento de la proteasa Kex2

Una de las modificaciones post-traduccionales que pueden ocurrir para que se lleve a cabo la maduración de una proteína es un corte proteolítico, ya sea para remover un péptido señal, o para activar una proproteína. Kex2 es una serín-proteasa dependiente de Ca^{+2} involucrada en la activación de proproteínas, por lo que pertenece a la familia de las Protein Convertasas. Esta proteasa realiza el corte proteolítico en el lado carboxílico de pares de residuos básicos como Lys-Arg, Arg-Arg (Rockwell et al. 2002). Levaduras como *Sacharomyces cerevisiae* y *P. pastoris* sintetizan esta proteasa como parte de su metabolismo normal y en muchas ocasiones participa en la maduración de las proteínas nativas de la levadura (Sreenivas et al. 2014).

En el caso de las proteínas recombinantes producidas de forma extracelular en *P. pastoris*, generalmente se sintetizan como una proteína de fusión entre el péptido maduro de interés con la región pre-pro el factor alfa de *S. cerevisiae*. Esta región consiste en un péptido señal de 19 residuos de aminoácidos (región-pre), seguido de 66 residuos (región-pro) que finaliza con una secuencia dibásica (Lys-Arg). Durante la ruta de secreción de la proteína heteróloga ocurren dos procesamientos proteolíticos, el primero para una remoción de la región pre por acción de una signal-peptidasa, y posteriormente, una remoción de la región pro por acción de la proteasa Kex2 que reconoce la secuencia dibásica ubicada en la unión de la región pro con el inicio del péptido maduro. Sin embargo, la presencia de un sitio de reconocimiento de la proteasa Kex2 (secuencia dibásica) en la secuencia del péptido maduro, puede no ser deseable, debido a que el corte proteolítico puede escindir una región del péptido maduro, o bien, si los dos fragmentos quedan unidos por un puente disulfuro, puede haber un cambio conformacional de la proteína que pudiera afectar su actividad biológica. Este podría ser el caso de la tanasa recombinante proveniente de *A. niger* GH1 producida en *P. pastoris*, en la cual se identificaron dos sitios de

reconocimiento de Kex2 (Lys309-Arg310 y Lys347-Arg348) en la secuencia del péptido maduro. Mediante un modelo tridimensional de la proteína madura, se pudo concluir que el primer sitio Kex2 probablemente se encuentra expuesto en la superficie de la proteína recombinante, mientras que el segundo sitio Kex2 está oculto en el interior de la proteína, lo cual ocasiona la ruptura en el lado carboxílico de Arg310 por parte de Kex2, generando una proteína con dos subunidades polipeptídicas unidas por un puente disulfuro (Fuentes-Garibay et al. 2015). Esto discrepa de la estructura de una cadena polipeptídica que presenta la proteína nativa de *A. niger* GH1, y por consecuencia podría ser la causa de la diferencia en las propiedades intrínsecas entre la tanasa nativa y recombinante, y generar una disminución de la actividad específica en la tanasa recombinante (Renovato et al. 2011; Fuentes-Garibay et al. 2015).

2.5. Estrategias de ingeniería de proteínas

La modificación de proteínas para buscar potenciar alguna característica de interés puede efectuarse mediante estrategias de ingeniería de proteínas. Existen tres tipos: el diseño racional, la evolución molecular dirigida y el diseño por secuencias consenso. En el diseño racional se requiere conocimiento de la estructura tridimensional de la proteína a modificar y el mecanismo molecular que explique la función biológica o la propiedad estudiada, para así identificar los aminoácidos candidatos a sustituir mediante mutagénesis sitio dirigido. Esta estrategia se ha utilizado para aumentar actividad enzimática, modificar la especificidad de enzimas o aumentar la termoestabilidad (Díaz et al. 2016). De acuerdo con Koseki et al. (2017) con el diseño racional aumentaron la actividad específica de la tanasa de *A. oryzae* TH recombinante producida en *P. pastoris*. Por otro lado, la evolución molecular dirigida consiste en simular un proceso de evolución darwiniana de manera acelerada, mediante la creación de bibliotecas de secuencias nucleotídicas mutadas y la evaluación de éstas, con el objetivo de identificar las variantes proteicas que poseen las características de interés (Díaz et al. 2016). La tercera estrategia es el diseño por secuencias consenso, para la cual se requieren secuencias aminoacídicas de bases de datos e identificar aminoácidos conservado entre las secuencias de proteínas homólogas. Por lo que, si un aminoácido está conservado en posiciones equivalentes en la mayoría de las

secuencias evaluadas, pero es distinto en la secuencia de la proteína inicial, esta estrategia afirma que el aminoácido de la secuencia original debe ser sustituido por el aminoácido compartido por la mayoría de las secuencias de proteínas homólogas. Con esta estrategia se ha conseguido principalmente aumentar la termoestabilidad de enzimas (Lehmann et al. 2000).

2.5.1. Mutagénesis sitio dirigida

La mutagénesis sitio dirigida fue desarrollada por primera vez por Michael Smith en 1978 (Hutchison et al. 1978). En la mutagénesis sitio dirigida se pueden introducir deleciones, inserciones o mutaciones puntuales en lugares específicos de una secuencia nucleotídica, con el fin de cambiar alguna característica intrínseca de las proteínas. Una opción para realizar este procedimiento es mediante la técnica de extensión por PCR de fragmentos superpuestos (SOEing por sus siglas en inglés), en la cual se utilizan dos pares de oligonucleótidos. El primer par (P1 y P2) amplifica un fragmento desde el extremo 5' de la cadena líder (P1) hacia el sitio donde se desea realizar la mutación (P2). Mientras que el segundo par (P3 y P4) amplifica desde un fragmento que va del sitio de la mutación (P3) hacia el extremo 3' de la cadena líder (P4). Cabe mencionar que los oligonucleótidos P2 y P3 son los que generan la mutación, por lo que deben estar diseñados de manera que no contengan la secuencia a deletar, que incluyan la secuencia a insertar o bien, incluyan en la secuencia los cambios de la mutación puntual, según sea el tipo de mutación que se requiera. Además, estos oligonucleótidos (P2 y P3) deben tener en el extremo 3' una secuencia complementaria entre ellos, de mínimo 10-15 nucleótidos (McPherson y Moller 2000).

Para llevar a cabo este procedimiento se realizan dos amplificaciones separadas (Figura 2), que se conocen como las PCR primarias, de las cuales se obtendrán dos fragmentos: uno correspondiente a los oligonucleótidos P1 y P2, y el segundo, generado por los oligonucleótidos P3 y P4. Posteriormente, ambos fragmentos sintetizados se mezclan y se espera que se unan debido a las secuencias complementarias presentes en los oligonucleótidos P2 y P3. Finalmente se lleva a cabo la siguiente amplificación, conocida como PCR secundaria, en donde participan la mezcla de los fragmentos obtenidos en las

PCR primarias, y los oligonucleótidos P1 y P4. En la PCR secundaria se sintetiza el resto de la cadena para obtener la nueva cadena con la mutación (Heckman y Pease 2007).

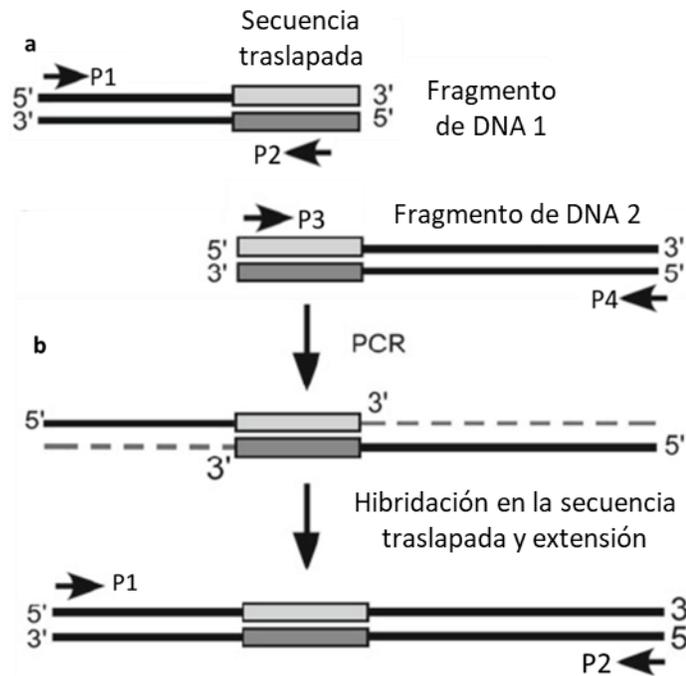


Figura 2. Estrategia de mutagénesis dirigida por PCR de los fragmentos superpuestos, las flechas P1, P2, P3 y P4 corresponden a los oligonucleótidos. a) Fragmentos de DNA obtenidos durante la PCR primaria. b) Fragmentos de DNA obtenidos durante la PCR secundaria (imagen tomada de Cha-aim et al. 2012).

Para el caso de las mutaciones puntuales, existen dos métodos: One side-SOEing y Two Side-SOEing. El primer método consiste en introducir la mutación deseada únicamente en el primer P2. Con ello el fragmento que resulte de los oligonucleótidos P1 y P2, además de contener la mutación, funcionará como “megaoligonucleótido” en la PCR secundaria para sintetizar la cadena completa mutada (Urban et al. 1997). El método Two Side-SOEing es el más utilizado por su alta eficiencia y porque no deja lugar a que se formen fragmentos no mutados. Consiste en introducir la mutación en los oligonucleótidos P2 y P3, con ello ambos fragmentos sintetizados en las PCR primarias contendrán la mutación. Posteriormente se mezclan para que las colas complementarias de los oligonucleótidos P2 y P3 se unan y se sintetice la cadena completa durante la PCR secundaria (McPherson y Moller 2000).

2.6. Herramientas bioinformáticas para el análisis de los modelos moleculares de proteínas

El modelo molecular puede ser determinado experimentalmente por cristalografía de rayos X y en algunos casos por espectroscopía de resonancia magnética nuclear o microscopía electrónica. Estas estructuras tridimensionales están disponibles a través de la base de datos denominada Protein Data Bank, la cual además de información de los autores, secuencia de la proteína, referencia bibliográfica, técnica de resolución de la estructura, pruebas de validación de la estructura tridimensional e información del cristal, contiene archivos de texto con las coordenadas en el espacio de los átomos que componen la proteína, excepto los hidrógenos (archivos pdb). Si la estructura tridimensional de la proteína de interés no se encuentra en el Protein Data Bank y no estamos en la capacidad de hacer una determinación experimental de esta estructura tridimensional, entonces el modelo molecular de la proteína puede ser simulado con herramientas bioinformáticas mediante estrategias de modelaje por homología, threading o reconocimiento de plegamiento (fold recognition), o bien predicción *ab initio*. La predicción de la estructura de proteínas mediante modelaje por homología se basa en la comparación de la secuencia de la proteína de interés con una gran base de datos de secuencias de proteínas con estructuras tridimensionales conocidas (Protein Data Bank) para poder seleccionar una estructura tridimensional como plantilla para la predicción del modelo molecular, siendo esta estrategia de modelaje la que realiza un modelo molecular más confiable. Sin embargo, cuando el porcentaje de identidad entre la secuencia de la proteína de interés y las secuencias de las proteínas depositadas en el Protein Data Bank es menor al 30%, la estrategia de modelaje por homología no conduce a modelos confiables, pero el modelaje se puede mejorar al incluir información estructural de otras proteínas, lo cual es la idea de la estrategia de threading (Kelley et al. 2015). Los modelos moleculares de proteínas pueden visualizarse para un mejor estudio mediante visualizadores de estructura tridimensional como UCSF Chimera, e incluso hacer cálculos de distancias entre átomos, comparación de estructuras tridimensionales mediante una superposición de las mismas, etc.

Para el caso de moléculas pequeñas no proteicas, se puede obtener su estructura tridimensional en un archivo en formato pdb en bases de datos específicas. Una de las más usadas es PubChem, la cual es un repositorio mayoritariamente de moléculas químicas pequeñas que se encuentra disponible para uso en general, donde además de obtener el archivo de la estructura tridimensional se puede acceder a información de las propiedades fisicoquímicas, actividad biológica, asociación con ligandos y características generales derivadas de investigación (Wang et al. 2009).

Durante el modelaje de los modelos moleculares pueden ocurrir distorsiones estructurales, interacciones desfavorables o introducción de choques, por lo que para optimizar la estructura tridimensional es recomendable realizar una minimización de la energía (Waterhouse et al. 2018). La minimización de la energía se lleva a cabo para optimizar la red de unión de los hidrógenos y reacomodar la posición de los residuos de aminoácidos en una orientación que genere la menor energía posible en el sistema (Land & Svedendahl 2018).

Una vez obtenidos los modelos moleculares de la proteína y de una molécula pequeña que en el caso de una enzima podría ser su sustrato, y habiendo realizado la minimización de energía, se pueden utilizar métodos de acoplamiento molecular para obtener un modelo tridimensional de la interacción enzima-sustrato basado en los elementos geométricos y la complementariedad fisicoquímica de la interacción de las moléculas (Waterhouse et al. 2018). Los análisis de acoplamiento molecular se utilizan ampliamente para predecir complejos biomoleculares basados en un análisis del diseño funcional, estructural y molecular. Tiene como objetivo lograr la conformación y orientación optimizada para la interacción entre la proteína y el sustrato a manera de minimizar la energía libre del sistema general (Morris et al. 2007).

2.7. Etapas de downstream en tanasas

Para llevar a cabo la purificación de proteínas generalmente se sigue una estrategia que consiste en cuatro etapas: 1) preparación, extracción y clarificación, 2) captura, 3) purificación intermedia y 4) pulido. La primera etapa consiste en preparar un extracto

clarificado del material a purificar. En el caso de la producción extracelular de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, este punto consiste en obtener el medio de cultivo con proteínas libre de células, generalmente por centrifugación y microfiltración. Posteriormente en la etapa de captura se aísla, concentra y estabiliza el producto de interés en un ambiente que permita conservar su actividad. Esta etapa se puede llevar a cabo combinando una etapa de ultrafiltración con una diafiltración realizando un cambio de solución amortiguadora y eliminando moléculas de bajo peso molecular. En la etapa de purificación intermedia se busca remover las impurezas mayoritarias como otras proteínas u otras moléculas de alto peso molecular. Esta etapa se suele realizar mediante cromatografía de intercambio iónico, ya sea aniónica o catiónica. En la etapa final de pulido se eliminan algunas trazas de impurezas que hayan quedado, por lo que después de esta etapa la proteína de interés puede ser transferida a condiciones adecuadas de almacenamiento (Healthcare, 2010; Saraswat et al. 2013).

En los procesos biotecnológicos industriales se identifican tres etapas principales: upstream, midstream y downstream. La etapa de upstream involucra actividades como la obtención y preparación de la materia prima y el sistema biológico a utilizar. Mientras que el midstream involucra el proceso de transformación de materia prima en producto a través del sistema biológico, así como las condiciones en que se lleva a cabo. Finalmente, la etapa de downstream involucra las operaciones unitarias necesarias para la purificación y obtención del producto terminado en su presentación comercial. Esta última etapa es un aspecto importante en la producción industrial de tanasas debido al poco conocimiento y la falta de estrategias de bajo costo.

En el caso de la producción de tanasas recombinantes por *P. pastoris* se tiene la ventaja que el sistema de secreción de proteínas heterólogas permite la fácil recuperación, por lo que solo se debe procurar la separación de las células y el medio de cultivo con proteínas. Sin embargo, en las proteínas que se secretan al caldo de cultivo, el agua es el principal contaminante por lo que la etapa de concentración es el primer paso en la purificación de proteínas. La concentración de tanasas se ha realizado por precipitación con sulfato de amonio (Battestin y Macedo 2007) y acetona (Lekha et al. 1994). Por otro lado, se ha realizado la concentración de tanasa con polietilenglicol (Sharma et al. 1999), pero este

proceso dificulta el escalamiento. Un método más eficiente por ser rápido y con mayor porcentaje de recuperación de tanasa es la ultrafiltración, que logra purificar hasta 5.2 veces más con rendimiento de recuperación del 97% (Sharma et al., 2008). Finalmente, para la etapa de purificación de tanasa se ha incursionado en el uso de protocolos de cromatografía de intercambio iónico o filtración en gel utilizando columnas de Sephadex G-150 (Sharma et al. 1999). En el caso de proteínas recombinantes en *P. pastoris* se ha utilizado protocolos de ultrafiltración seguido de cromatografía de intercambio iónico (Zhong et al. 2004).

3. JUSTIFICACIÓN

Las tanasas son enzimas que degradan compuestos no deseados en bebidas derivadas de frutas, como los jugos frutales, vino, cerveza y té. Esta propiedad las hace de interés para la industria. Sin embargo, a pesar de que hay un mercado potencial para ellas, son pocas las empresas que han lanzado tanasas a la venta. La razón es porque la producción de la enzima es de alto costo y hay poca información sobre los procesos para producirla a gran escala.

Una alternativa que lleva a aumentar la producción de enzimas, y con ello disminuir costos de producción es el uso de tecnología recombinante. Actualmente se ha explorado la opción de producir tanasas recombinantes en *P. pastoris*. Sin embargo, las tanasas producidas en *P. pastoris* tienen baja actividad específica, lo cual no es atractivo para su uso en procesos industriales. Actualmente, no existen tanasas recombinantes que posean mayor actividad específica que las no recombinantes.

Con este proyecto se buscó desarrollar un proceso para producir en *P. pastoris* una tanasa recombinante de una cadena polipeptídica que sea atractiva para la industria. Para ello, se utilizaron estrategias de ingeniería de proteínas enfocadas en aumentar la actividad específica de la enzima. También, se emplearon herramientas bioinformáticas para realizar un análisis estructural de la tanasa recombinante de una y dos cadenas que permitió explicar a nivel molecular la diferencia en la actividad específica de las dos tanasas.

Además, para evaluar si la enzima pudiera ser atractiva para la industria se estimó el costo de producción de un producto prototipo en polvo.

4. HIPÓTESIS

La tanasa de *A. niger* GH1 modificada en los sitios de reconocimiento de Kex2 y producida en *P. pastoris* como una proteína de una cadena polipeptídica permitirá el desarrollo de un proceso para la producción de una tanasa con alta actividad específica que la hará atractiva para la industria de alimentos.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

Objetivo general

Desarrollar un proceso de producción en *Pichia pastoris* de una tanasa recombinante de una cadena polipeptídica con alta actividad específica atractiva para la industria de alimentos.

Objetivos específicos

1. Construir un gen sintético que codifique para la tanasa de *A. niger* GH1 con una modificación en uno de los sitios de reconocimiento de la proteasa Kex2.
2. Construir cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del gen sintético capaces de producir y secretar la tanasa de *A. niger* GH1 modificada.
3. Seleccionar una cepa de *P. pastoris* sobreproductora y producir la tanasa de *A. niger* GH1 modificada.
4. Realizar una caracterización bioquímica de la tanasa de *A. niger* GH1 modificada.
5. Diseñar un proceso de recuperación y formulación de la tanasa recombinante.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Materiales y equipos

Los materiales y equipos utilizados para el presente trabajo se mencionan a continuación: una campana microbiológica de flujo laminar (Labconco Co. Inc.), potenciómetro (Beckman), balanza granataria (WM Ainsworth And Sons Inc.), balanza analítica (METTLER TOLEDO AG285), vortex Maxi-Mix II M37615 (Thermolyne), centrífuga J2-21 M (Beckman), agitador magnético (PC103 Corning), gradillas (Glasser), olla a presión 21 litros (Presto), autoclave 510 (Yamato), termociclador para reacción en cadena de la polimerasa (LABNET), campana para PCR (P-048-202-XL, CBS Scientific Co.), refrigeradores y congelador -20°C (Torrey), cámara de electroforesis horizontal y fuente de poder (494 ISCO), cámara de electroforesis vertical (Termo EC), cristales de 10 x 10 cm, fuente de poder (Termo EC570-90), incubadora con agitación (Lab-Line Instruments Inc.), placa de calentamiento II (VWR Scientific products), columna de intercambio aniónico 1 mL HiTrap Q FF (GE Healthcare Bio-Sciences Corp), sistema de cromatografía (Bio-Rad), micropipetas (Labnet Co.), nano espectrofotómetro P-300 (IMPLEN), biorreactor de mesa de 7 litros interconectado con el biocontrol ez-Control (Applikon Biotechnology), bomba de alimentación programable (Masterflex L/S DIGITALTIC Dispensing System), controlador y monitor de la concentración de metanol en gas (PTI Instruments).

Las bases de datos y programas computacionales fueron: GenBank del NCBI (National Center of Biotechnology Information, Bethesda MD, USA), BioEdit, NEBCutter, BRENDA, AmplifX, Blast, Clustal Omega, SWISS-MODEL, Avogadro, YASARA, AutoDock Tools 1.5.6, Chimera 1.15rc, Oracle VM Virtual Box con el sistema operativo Ubuntu 64 bits, el programa BioExpert lite (Applikon Biotechnology BV), NB208 software (PTI Instruments).

Para el procesamiento de datos y esquemas gráficos se empleó una computadora HP Pavillon (Windows 10, Microsoft Corporation), procesador de texto Microsoft Word Professional Plus 365 (Microsoft Corporation), procesador de gráficos Microsoft Excel Professional Plus 365 (Microsoft Corporation), procesador de presentación de diapositivas Microsoft PowerPoint Professional Plus 365 (Microsoft Corporation).

6.2. Material biológico y medios de cultivo

Las cepas de *P. pastoris* KM71 Mut^S (*his4*) y el vector pPIC9 fueron obtenidos de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). El vector pPIC9ANT fue previamente construido en nuestro laboratorio (Fuentes-Garibay et al. 2015). La endonucleasa de restricción *SalI* y el vector pGEM-T fueron de Promega (Madison, WI). La glicosidasa Endo H y la DNA polimerasa de alta fidelidad Q5 Hot Start fueron de New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Todos los oligonucleótidos fueron de Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA, USA). La base de dextrosa regeneradora (RDB), el medio mínimo amortiguado adicionado con glicerol (BMG), el medio mínimo amortiguado adicionado con metanol (BMM con 0.75% (v/v) metanol) y la solución de trazas de metales 1 para *P. pastoris* (PTM1) fueron preparados de acuerdo con las instrucciones para el kit de expresión de *P. pastoris* (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) o Productos Químicos Monterrey (Monterrey, Nuevo León, México).

6.3. Estrategia general

Para desarrollar una tanasa recombinante con alta actividad específica y características atractivas para la industria alimentaria, se plantearon 5 etapas experimentales (Figura 3). La primera consistió en la construcción de la secuencia nucleotídica que codifique para la tanasa de *A. niger* GH1 con modificación en uno de los sitios de reconocimiento de la proteasa Kex2 (K309-R310). Para ello se partió de la secuencia nucleotídica que codifica para la tanasa recombinante originaria de *A. niger* GH1 con codones preferenciales de *P. pastoris* (ANT), y se modificó el codón del aminoácido arginina por un codón de alanina por mutagénesis sitio dirigida mediante extensión por PCR de fragmentos superpuestos. Se verificó la presencia de la mutación deseada y ausencia de otras mutaciones mediante secuenciación de la secuencia nucleotídica resultante.

En la segunda etapa se llevó a cabo la construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras de la secuencia nucleotídica capaces de producir y secretar la tanasa de *A. niger* GH1 modificada (*TanM*). Se verificó que la secuencia nucleotídica modificada fue la

deseada. Posteriormente, se procedió a transformar células de *P. pastoris* KM71 mediante electroporación con el plásmido linealizado que contiene la secuencia nucleotídica modificada. Se seleccionaron y verificaron las células transformadas para continuar a la siguiente etapa. En la tercera etapa se seleccionó una clona de *P. pastoris* sobreproductora de la tanasa M. Para ello se realizaron cultivos de las 84 clonas obtenidas en la transformación de *P. pastoris*. En los cultivos se llevó a cabo una etapa de reactivación de la clona, crecimiento con glicerol y una etapa de inducción con metanol para la producción de la proteína heteróloga. Se evaluó el rendimiento de proteínas extracelulares/biomasa de cada cultivo y se seleccionaron las 5 clonas con mayor rendimiento. A las clonas seleccionadas se les evaluó la actividad volumétrica de tanasa y se seleccionó la clona con mayor rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$). La clona seleccionada se caracterizó en cuanto a su producción en matraz mediante cultivos con adición de metanol cada 12 h y 24 h; además de cultivos con medio BMM-alanina a pH 5.0. y se comparó con la cepa KM71ANT. Posteriormente, la clona sobreproductora se llevó a producción a nivel de biorreactor. El cultivo en biorreactor se realizó en tres etapas: 1) lote (batch) de glicerol (50 g/L), 2) lote alimentado (feed-batch) con glicerol y 3) lote alimentado (feed-batch) de metanol. Las condiciones de la etapa de inducción con metanol fueron pH 5.0, temperatura 24°C, densidad celular al inicio de 50 g de células secas/L y concentración de metanol constante de 1 g/L. La etapa de inducción duró 74 h y se calcularon parámetros de crecimiento celular y producción de la proteína recombinante como la velocidad específica de crecimiento (μ), el rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$), rendimiento producto/sustrato ($Y_{p/s}$), velocidad de consumo de sustrato (q_s) y velocidad de producción de tanasa (q_p).

En la cuarta etapa, se realizó la caracterización bioquímica de la enzima obtenida en los cultivos en matraz y a nivel de biorreactor. Para ello se purificó la proteína producida por cromatografía de intercambio aniónico y se evaluó la actividad específica y los parámetros cinéticos de la enzima. La actividad específica se comparó con la de la tanasa recombinante de *A. niger* GH1 de doble cadena (Fuentes-Garibay et al., 2015). Se analizaron por SDS-PAGE las fracciones de la purificación que presentaron actividad enzimática y se evaluó el efecto del pH (2.5-9.0), y la temperatura (10-70°C) en la actividad enzimática de tanasa, así como la actividad residual al almacenar la enzima a 4

y 30°C. Por otro lado, se obtuvieron los modelos moleculares *in silico* de la tanasa de una cadena (tanasa M) y la tanasa de dos cadenas (tanasa ANT). Se realizó el análisis por acoplamiento molecular utilizando al galato de metilo como sustrato, y se realizó la superposición de los modelos moleculares para poder explicar a nivel estructural la diferencia en actividad específica y parámetros cinéticos de las tanasas recombinantes de una y dos cadenas.

Finalmente, en la quinta etapa se diseñó un proceso de recuperación y formulación de la tanasa recombinante. Para ello se estableció un proceso que consiste en centrifugación del sobrenadante en biorreactor, seguido de microfiltración, ultrafiltración y el proceso de secado por aspersión (spray-drier) con un polisacárido como coadyuvante para obtener el formulado de la enzima recombinante en polvo. A partir de los rendimientos obtenidos en biorreactor, se realizó el análisis tecno-económico para estimar el probable precio de venta del formulado en polvo de la tanasa mutada y compararlo con las tanasas disponibles en el mercado.

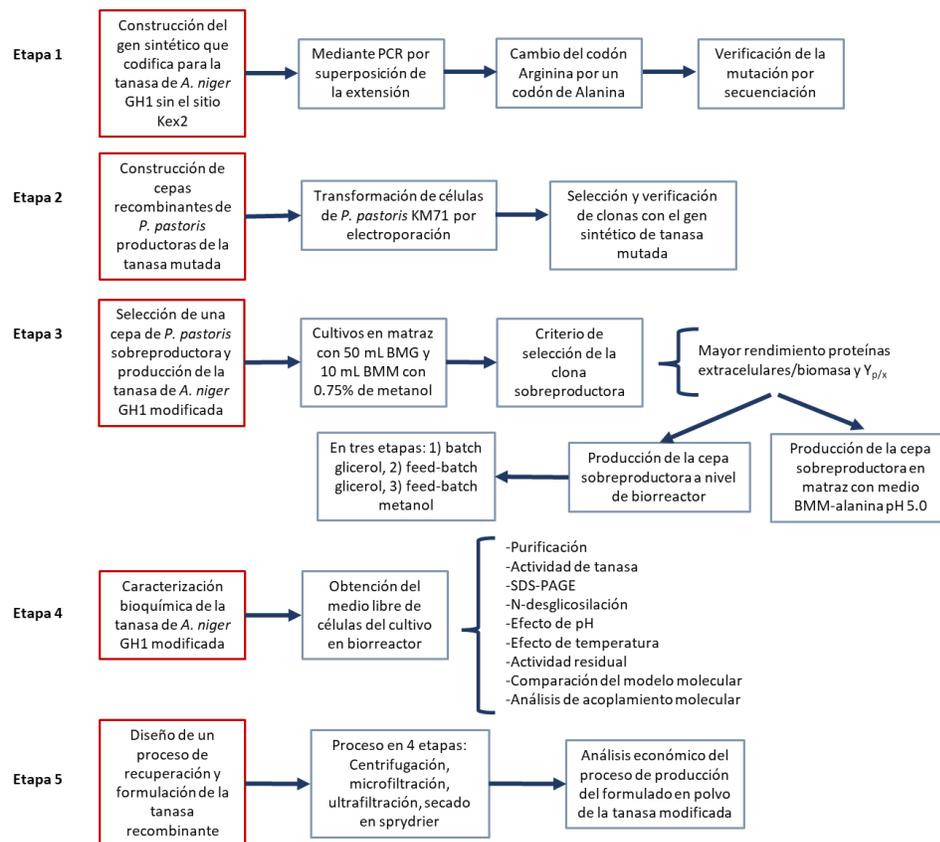


Figura 3. Estrategia general que se empleó.

6.4. Construcción de una secuencia nucleotídica que codifique para la tanasa de *A. niger* GH1 con modificación de uno de los sitios de reconocimiento de la proteasa Kex2

6.4.1. Diseño de oligonucleótidos para mutagénesis mediante extensión por PCR de fragmentos superpuestos

A partir de la secuencia nucleotídica que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 (*ANT*) se diseñaron 4 oligonucleótidos para llevar a cabo la mutagénesis en un sitio de reconocimiento de la proteasa Kex2; cuyas secuencias se muestran en la tabla 2. El primer par de primers se tomaron de las secuencias extremas de la secuencia nucleotídica *ANT*. En el extremo 5' se mantuvo el sitio de restricción para *Xho* I que ya se encontraba en la secuencia *ANT* (5'TanX). Pero al extremo 3' se le agregó el sitio de restricción para *Not* I (3'TanNot). Por otro lado, los oligonucleótidos mutagénicos, se localizaron en los codones que codifican para el sitio de reconocimiento de Kex2; los cuales corresponden a los nucleótidos 868-870 y 871-873. Para eliminar el sitio de la proteasa Kex2 se consideró que solo es necesario cambiar uno de los aminoácidos. Lo anterior, debido a que la proteasa Kex2 es altamente específica a los sitios de reconocimiento Lys-Arg y Arg-Arg. Por lo consiguiente, se cambió el codón correspondiente a Arginina (871-873) por un codón preferencial de *P. pastoris* a Alanina. El nuevo codón se ubicó en el centro del oligonucleótido mutagénico líder y se tomaron 10 pb rio arriba y 10 pb rio abajo del codón modificado (5'TanMut). Mientras que el oligonucleótido mutagénico reverso (3'TanMut) se diseñó siendo totalmente complementario al oligonucleótido mutagénico líder. Lo anterior, permitió que, en el proceso final de la extensión por PCR de fragmentos superpuestos, los oligonucleótidos se pudieran empalmar generando la nueva secuencia nucleotídica mutada (*TanM*).

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos para mutagénesis

ID	Secuencia
5'TanX	5'-CTC GAG AAG AGA ACT TCT TT-3'
3'TanMut	5'-AAC CCT CAG CAG CCT TAG AGA AA-3'
5'TanMut	5'-TTT CTC TAA GGC TGC TGA GGG TT-3'
3'TanNot	5'-GTA GCG GCC GCT TAG AAA ACT GGC ATC-3'

6.4.2. Obtención de la secuencia nucleotídica de la tanasa de *A. niger* GH1 con codones preferenciales para *P. pastoris* a partir del plásmido pPIC9ANT

La secuencia nucleotídica que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 con codones preferenciales de *P. pastoris* se obtuvo a partir del plásmido pPIC9ANT (Fuentes-Garibay et al. 2015); el cual se encontraba almacenado en una cepa de *E. coli* JM109. Por ello, en primer lugar, se reactivó la cepa de *E. coli* JM109 con el plásmido pPIC9ANT. Se tomaron 100 µL de la conserva con glicerol absoluto al 1:1 que se encontraba almacenada a -20°C y se inocularon en tubos Corning de 15 mL con 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL). Los tubos inoculados se dejaron incubando durante 16-18 h a 37°C y 250 rpm.

Posteriormente, se recuperó el paquete celular de la cepa reactivada y se extrajo DNA plasmídico utilizando el Wizzard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Se cuantificó la concentración de DNA utilizando el nanofotómetro P-360 (Implen) y se verificó la integridad del plásmido mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. Se analizaron alícuotas de 4 µL con GelRed para pre-tinción. El gel se observó en transiluminador de UV.

Para confirmar la presencia de la secuencia nucleotídica (*ANT*), se llevó a cabo la reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos 5'TANGSA (5'-TGG CCT AGG TTA GAA AAC TG-3') y 3'ALFAGSB (5'-GAA GGA TCC AAA CGA TGA GA-3'), los cuales son específicos para dicho gen. Además, se preparó un control negativo (agua) y un control positivo (pGEMANT). El DNA plasmídico extraído previamente se realizó una dilución 1:100 para utilizarlo como molde. En la reacción de PCR se utilizó GoTaq Flexi DNA polimerasa (Promega) y se preparó como se indica en la Tabla 3. Por otro lado, las condiciones de la reacción de PCR se realizaron como se describe en la Tabla 4.

Tabla 3. Volumen y concentración final de los reactivos utilizados en la PCR para caracterizar el plásmido pPIC9ANT.

Reactivos	Volumen (μL)	Concentración Final
Green Buffer (5X)	5	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	0.2 mM
Oligo5'ALFAGSB (5 μM)	2.5	0.5 μM
Oligo 3'TANGSA (5 μM)	2.5	0.5 μM
Go Taq Flexi DNA pol (5U/ μL)	0.2 1	0.03 U/ μL 0.03-0.06 ng/ μL
DNA molde (dilución 1:100)	13.3	---
Agua ultrapura		
Volumen Final	25	

Tabla 4. Condiciones de la PCR para verificar la presencia del gen *ANT* en el plásmido pPIC9ANT con Flexi Taq DNA polimerasa.

Etapas	Evento	Ciclos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo
1	Desnaturalización	1	94	2 min
2	Desnaturalización	30	94	1 min
	Hibridación		50	1 min
	Extensión		72	4 min
3	Extensión Final	1	72	10 min
4	Refrigeración Final	1	4	Indefinido

Al finalizar la reacción de PCR se analizó una alícuota de 5 μL de la reacción y sus respectivos controles mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en buffer de Tris-boratos-EDTA (TBE 1X, Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM). El gel fue teñido posteriormente con GelRed Nucleic Acid Stain (concentración final de 100X diluido en NaCl 100 mM) y se observó en transiluminador de UV.

6.4.3. Preparación de soluciones de trabajo de oligonucleótidos para la mutagénesis mediante extensión por PCR de fragmentos superpuestos

Los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis mediante extensión por PCR de fragmentos superpuestos fueron sintetizados por IDT Technologies. Los oligonucleótidos liofilizados se disolvieron en 1 mL de agua MilliQ estéril y se dejaron toda la noche en

agitación. Posteriormente, se realizaron las soluciones de trabajo como se indica la Tabla 5, de forma que la concentración final fue de 5 μM .

Tabla 2. Volúmenes para la preparación de soluciones de trabajo de los oligonucleótidos.

ID	[Inicial] μM	[Final] μM	Vol. Final (μL)	Vol. Oligo (μL)	Vol. Agua (μL)
5'TanX	33.4	5	100	15	85
3'TanMut	23.4	5	100	21.4	78.6
5'TanMut	32.4	5	100	14.4	84.6
3TanNot	36	5	100	13.9	86.1

6.4.4. Síntesis de los fragmentos primarios de la mutagénesis mediante extensión por PCR de fragmentos superpuestos

Para llevar a cabo la mutagénesis sitio dirigida mediante extensión por PCR de fragmentos superpuestos se requirió de dos fragmentos primarios, los cuales fueron complementarios en el extremo mutagénico de las secuencias. Uno de los fragmentos primarios abarcó desde el extremo 5' de la secuencia nucleotídica *ANT* al sitio de la mutación, como se muestra en la figura 4. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos 5'TanX y 3'TanMut.

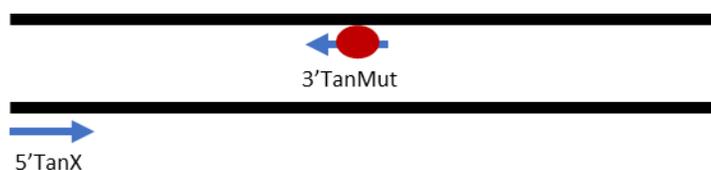


Figura 4. Lugar de hibridación de los oligonucleótidos 5'TanX y 3'TanMut en la secuencia nucleotídica *ANT*.

Mientras que el segundo fragmento primario abarcó desde sitio de la mutación hacia el extremo 3' de la secuencia nucleotídica *ANT*, como se muestra en la figura 5. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos 5'TanMut y 3'TanNot.

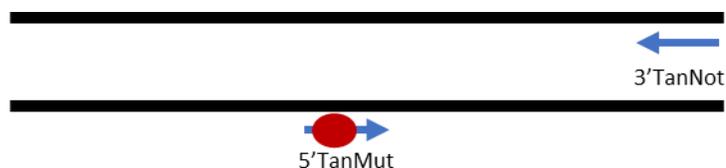


Figura 5. Lugar de hibridación de los oligonucleótidos 5'TanMut y 3'TanNot en la secuencia nucleotídica ANT.

En las reacciones de PCR de cada uno de los fragmentos primarios se utilizó la enzima de alta fidelidad Q5 Hot Start DNA Polimerasa (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante. Además, se utilizó la preparación de DNA plasmídico pPIC9ANT obtenido en la sección 6.4.2. Los volúmenes de la reacción se describen en la Tabla 6 y 8, tomando en cuenta la preparación de un control negativo (agua). Las condiciones de la reacción (Tabla 7 y 9) se determinaron siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tabla 3. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR para el fragmento primario 5'TanX→3'TanMut.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración Final
Q5 Buffer (5X)	5	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	0.2 mM
Oligo 5'TanX (5 μM)	2.5	0.5 μM
Oligo 3'TanMut (5 μM)	2.5	0.5 μM
Q5 DNA Polimerasa (5 U/μL)	0.2	0.02 U/μL
DNA molde (65 ng/μL)	0.4	10 pg/μL
Agua ultrapura	13.9	-----
Volumen Final	25	-----

Tabla 4. Condiciones de la reacción de PCR para obtener el fragmento primario 5'TanX→3'TanMut.

Etapas	Evento	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización	1	98	30 s
2	Desnaturalización	30	98	10 s
	Hibridación		56	30 s
	Extensión		72	30 s
3	Extensión Final	1	72	2 min
4	Refrigeración Final	1	4	Indefinido

Tabla 5. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR para el fragmento primario 5'TanMut→3'TanNot.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración Final
Q5 Buffer (5X)	5	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	0.2 mM
Oligo 5'TanMut (5 μM)	2.5	0.5 μM
Oligo 3'TanNot (5 μM)	2.5	0.5 μM
Q5 DNA Polimerasa (5 U/μL)	0.2	0.02 U/μL
DNA molde (65 ng/μL)	0.4	10 pg/μL
Agua ultrapura	13.9	-----
Volumen Final	25	-----

Tabla 6. Condiciones de la reacción de PCR para obtener el fragmento primario 5'TanMut→3'TanNot.

Etapa	Evento	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización	1	98	30 s
2	Desnaturalización	30	98	10 s
	Hibridación		50	30 s
	Extensión		72	30 s
3	Extensión Final	1	72	2 min
4	Refrigeración Final	1	4	Indefinido

Al finalizar las reacciones de PCR de los fragmentos primarios se analizó una alícuota de 2 μL de cada reacción y cada control negativo mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en buffer de Tris-boratos-EDTA (TBE 1X, Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Los geles fueron teñidos posteriormente durante 30 min en agitación con GelRed Nucleic Acid Stain (concentración final de 100X diluido en NaCl 100 mM) y se observaron en transiluminador de UV. El tamaño del fragmento es un punto crítico para continuar con la PCR secundaria, debido a que un tamaño distinto indicaría la incorrecta amplificación del fragmento.

6.4.5. Purificación de los fragmentos primarios

Una vez obtenidos ambos fragmentos primarios es crítica la purificación de estos para poder utilizarlos como DNA molde en la PCR secundaria, por lo que se procedió a purificarlos utilizando el Wizzard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega) a partir de gel de agarosa. Previo al proceso de purificación se sumergió la cámara de

electroforesis, moldes, peines y gomas en SDS 0.1% durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se desechó el SDS y se enjuagó, de tres a cinco veces, la cámara de electroforesis y sus accesorios con agua ultrapura estéril hasta retirar por completo los restos de SDS. Posteriormente se preparó agarosa al 0.8% con TBE 1X estéril y se utilizó para realizar la electroforesis. En los pocillos se colocó todo el producto de las reacciones de PCR con buffer de carga y GelRed para pre-tinción dejando un pocillo de separación entre las muestras. La electroforesis se realizó durante 45 min aproximadamente, cuidando que la muestra no saliera del gel. Al finalizar se colocó el gel sobre una película de parafilm en el transiluminador de UV, el cual se limpió previamente con SDS 0.1%, y se observó en la intensidad UV de bajo daño al DNA (365 nm) durante unos segundos, solo para ubicar la posición de las bandas en el gel. En seguida, utilizando una navaja de bisturí estéril se cortó la sección de las bandas quitando la mayor cantidad de agarosa posible y los fragmentos se colocaron en tubos de 2 mL nuevos, estériles y previamente pesados. Se pesaron los tubos con agarosa y se restó el peso inicial para conocer la cantidad de agarosa contenida en el tubo. Utilizando esta información se procedió a la purificación siguiendo el protocolo del fabricante.

La cuantificación de los fragmentos purificados se realizó en el nanofotómetro P-360 (Implen) y se analizó la integridad de los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. Finalmente, los fragmentos purificados se almacenaron a -20°C hasta su uso en la PCR secundaria.

6.4.6. Síntesis del fragmento TanM a partir de los fragmentos primarios

La PCR secundaria consiste en el uso de los fragmentos primarios para sintetizar la secuencia nucleotídica de la tanasa con la mutación añadida (*TanM*). Para ello, se requiere tener a los fragmentos primarios en concentraciones iguales (40 ng totales de cada fragmento) y que estos sean complementarios en sus extremos mutagénicos para que funcionen como cebadores para la DNA polimerasa. Finalmente, la enzima se encarga de completar la secuencia del gen como se muestra en la figura 6. Además, se añadieron los oligonucleótidos 5'TanX y 3'TanNot correspondientes a los extremos no mutagénicos.

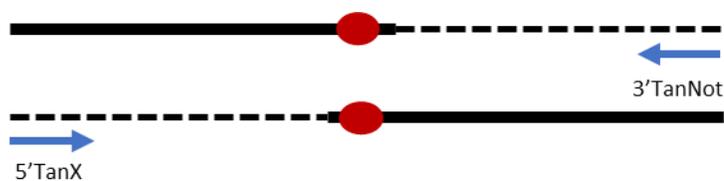


Figura 6. Superposición de los fragmentos primarios para la síntesis del fragmento secundario de PCR.

Para la PCR se utilizó la enzima Q5 Hot Start DNA polimerasa (Promega), utilizando los volúmenes descritos en la Tabla 10 y además se añadió un control negativo (agua). Para establecer las condiciones de la reacción (Tabla 11) se siguieron las recomendaciones del fabricante de la enzima.

Tabla 7. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR secundaria.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración Final
Q5 Buffer (5X)	5	1 X
dNTP's (10 mM)	0.5	200 μM
Oligo 5'TanX (5 μM)	2.5	0.5 μM
Oligo 3'TanMut (5 μM)	2.5	0.5 μM
Q5 DNA Polimerasa (5 U/ μL)	0.2	0.02 U/ μL
Fragmento DNA 5'TanX \rightarrow 3TanMut (12.5 ng/ μL)	3.2	40 ng
Fragmento DNA 5'TanMut \rightarrow 3TanNot (8 ng/ μL)	5	40 ng
Agua ultrapura	6.1	-----
Volumen Final	25	-----

Tabla 8. Condiciones de la reacción de PCR para obtener el fragmento de la PCR secundaria (*TanM*).

Etapas	Evento	Ciclos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo
1	Desnaturalización	1	98	30 s
2	Desnaturalización	30	98	10 s
	Hibridación		55	30 s
	Extensión		72	1 min
3	Extensión Final	1	72	2 min
4	Refrigeración Final	1	4	Indefinido

Al finalizar la reacción de PCR se analizó una alícuota de 2 μ L de la reacción y el control negativo mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. El gel fue teñido posteriormente durante 30 min en agitación con GelRed y se observó en transiluminador de UV. El tamaño es un punto crítico para conocer si el acoplamiento de los fragmentos primarios fue el correcto. A continuación, se purificó el producto amplificado con el Wizzard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega) partiendo directamente de la mezcla de la reacción de PCR. El procedimiento fue de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Al finalizar se cuantificó el fragmento purificado mediante el nanofotómetro P-360 (Implen) y se almacenó a -20°C hasta su posterior adenilación y ligación.

6.4.7. Preparación de células de *E. coli* JM109 calcio-competentes

Se reactivó la cepa de *E. coli* JM109, la cual se encontraba almacenada en glicerol al 50% a -20°C. Para ello se tomaron 100 μ L de la conserva para inocular 5 mL de medio LB y se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 24 h. Una vez reactivada la cepa, se tomaron 500 μ L de este cultivo para inocular 40 mL de medio LB y se dejó incubando a 37°C y 250 rpm aproximadamente 2 h hasta alcanzar DO₆₀₀ de 0.3-0.5. El medio con células se transfirió a un tubo nuevo estéril de 50 mL y se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente se centrifugó 5 min a 4,500 rpm y 4°C. El paquete celular obtenido se resuspendió suavemente en 20 mL de CaCl₂ 100 mM frío, utilizando puntillas de micropipeta frías. Se centrifugó nuevamente 5 min a 4,500 rpm y 4°C; en seguida se resuspendió suavemente utilizando puntas de micropipeta frías, en 1 mL de CaCl₂ 100 mM frío. Finalmente, se incubó durante toda la noche en hielo a 4°C para evitar que se derritiera rápidamente. Al siguiente día se añadieron 250 μ L de glicerol absoluto estéril y se prepararon alícuotas de 50 μ L, las cuales se almacenaron a -70°C hasta su uso.

6.4.8. Adenilación del fragmento TanM

El fragmento *TanM* se ligó en el vector pGEM-T (Promega) a partir de del vector linearizado que posee timinas en sus extremos. Peviamente se añadieron deoxinucleótidos

de adeninas (dATP) al fragmento purificado *TanM* en sus extremos. La reacción de adenilación se llevó a cabo con la GoTaq Flexi DNA polimerasa (Promega), utilizando las concentraciones y volúmenes descritos en la Tabla 12. La reacción se incubó a 72°C durante 1 h en termociclador.

Tabla 9. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción de adenilación del fragmento *TanM*.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración Final
Buffer Colorless (5X)	2	1X
dATP (10 mM)	0.2	0.2 mM
GoTaq Flexi DNA Pol (5 U/μL)	1	0.5 U/μL
MgCl ₂ (25 mM)	0.8	2 mM
Agua ultrapura	0	-----
ADN (45 ng/ μL)	6	27 ng/μL
Volumen Final	10	-----

6.4.9. Ligación del fragmento *TanM* con el vector pGEM-T

En primer lugar, se calculó la cantidad en nanogramos del fragmento *TanM* (inserto) de 1,712 pb ya que para una óptima ligación se requiere tener una relación molar vector:inserto de 1:3. Considerando que el vector de pGEM-T es de 3,000 pb, se utilizó la ecuación 1.

$$\text{Cantidad de inserto (ng)} = \frac{\text{Cantidad de vector (ng)} \times \text{Tamaño de inserto (kb)}}{\text{Tamaño de vector (kb)}} \times \text{Relación molar} \left(\frac{\text{inserto}}{\text{vector}} \right)$$

Ec 1. Cálculo de la cantidad de inserto (ng) requerida para ligar el vector pGEM-T

La ecuación 1 reveló que se requerían 85 ng del inserto, los cuales se tomaron de la mezcla de la reacción de adenilación (sección 6.4.8). La reacción de ligación se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante del sistema pGEM-T, y los volúmenes utilizados se describen de manera detallada en la Tabla 13. Se prepararon tres reacciones de ligación:

el vector con el inserto *TanM*, un control negativo (sin inserto) y un control positivo (inserto del fabricante), las cuales se incubaron toda la noche a 4°C.

Tabla 10. Volúmenes de los reactivos utilizados en la reacción de ligación del fragmento *TanM* con el vector pGEM-T.

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer de ligación rápida (2X)	5
pGEM-T vector (50 ng/ μL)	1
Mezcla de la reacción de adenilación (27 ng/ μL)	3.2
DNA T4 ligasa (3 U/μL)	1
Agua ultrapura	
Volumen Final	10

6.4.10. Transformación de *E. coli* JM109 calcio competente con el fragmento TanM

El producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* JM109 calcio competentes previamente preparadas como se describe en la sección 6.4.7. Para ello, a una alícuota de 50 μL de células calcio competentes, se le agregaron 2 μL de la reacción de ligación y se incubaron en hielo durante 10 min. Posteriormente, se llevó a choque térmico de 42°C por 45 s. En seguida, se regresó al hielo durante 2 min. Después del choque térmico, se agregaron 250 μL de medio LB. Se dejó incubar 1 h a 37°C y 250 rpm. Finalmente, se sembraron 100 μL de la suspensión celular en placas con LB y ampicilina (100 μg/mL). A las placas se les agregó previamente 100 μL de IPTG 10 mM y 40 μL de Xgal 50 mg/mL para la selección de clonas transformadas con el plásmido pGEMTanM bajo el criterio de clonas azules y blancas. Las colonias blancas fueron aquellas que contenían el plásmido con el inserto y las colonias azules las que contenían el plásmido sin inserto. Las placas se dejaron en incubadora estática a 37°C durante toda la noche.

6.4.11. Caracterización de las cepas de *E. coli* pGEMTanM

Al final de la incubación, se aislaron las colonias blancas tomando una muestra para inocular en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 μg/mL). Se dejaron incubar a 37°C y

250 rpm. Se recuperó el paquete celular de las colonias propagadas, centrifugando a 8,000 rpm durante 1 min. Posteriormente, se extrajo DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina, el cual consiste en resuspender el paquete celular en amortiguador de lisis (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM). Después de 5 min a temperatura ambiente, se agregó 400 μ L de una solución alcalina (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló de 3 a 6 veces por inversión y se colocó el tubo en hielo durante 5 min. En seguida, se añadió 300 μ L de acetato de amonio 7.5 M pH 7.8 y se mezcló suavemente por inversión durante unos segundos. Se mantuvo la suspensión a 0°C durante 10 min para permitir que precipitaran las proteínas y DNA de alto peso molecular. Para continuar, se centrifugó 9 min a 14,000 rpm a una temperatura de 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, donde se agregaron 650 μ L de isopropanol y se dejó incubar a temperatura ambiente por 20 min. De nuevo se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 μ L de etanol al 70%, para luego centrifugar 3 min a 14,000 rpm. Finalmente se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla durante 15 min con los tubos invertidos sobre papel secante. Una vez seca la pastilla, se resuspendió en 50 μ L de TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8) y se calentó a 65°C durante 20 min para eliminar la presencia de nucleasas.

Para la caracterización por PCR del plásmido pGEMTanM se utilizaron los oligonucleótidos 5'TanX y 3'TanNot, además de la enzima GoTaq Flexi DNA Polimerasa (Promega) y como DNA molde, diluciones 1:100 del DNA plasmídico extraído de las colonias aisladas. La reacción de PCR para las clonas aisladas y un control negativo (agua), se preparó con los volúmenes indicados en la Tabla 14 y siguiendo las condiciones de reacción descritos en la Tabla 15.

Tabla 11. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR para caracterizar el plásmido pGEMTanM.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración Final
Green Buffer (5X)	5	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	200 μM
Oligo 5'TanX (5 μM)	2.5	0.5 μM
Oligo 3'TanNot (5 μM)	2.5	0.5 μM
MgCl ₂ (25 mM)	2	2 mM
GoTaq Flexi Pol (5 U/ μL)	0.2	0.02 U/ μL
DNA molde	1	-----
Agua ultrapura	11.3	-----
Volumen Final	25	-----

Tabla 12. Condiciones de la reacción de PCR para caracterizar el plásmido pGEMTanM.

Etapa	Evento	Ciclos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo
1	Desnaturalización	1	95	2 min
2	Desnaturalización	30	95	1 min
	Hibridación		55	1 min
	Extensión		72	2 min
3	Extensión Final	1	72	5 min
4	Refrigeración Final	1	4	Indefinido

Al finalizar la reacción de PCR se analizó una alícuota de 2 μL de los productos y el control negativo mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. El gel fue teñido posteriormente durante 30 min en agitación con GelRed y se observó en transiluminador de UV. Las cepas que presentaron el fragmento deseado se conservaron con glicerol absoluto estéril 1:1 y se eligieron dos para enviar a secuenciar.

El plásmido pGEMTanM se envió a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular (UNAM). Esto para verificar que posee la mutación deseada (el cambio del codón de Arginina por Alanina) y que además no ocurrieron mutaciones no deseadas generadas por errores de la DNA polimerasa. Las muestras de plásmidos enviadas se prepararon de la siguiente manera: en primer lugar, se propagaron las dos colonias seleccionadas, inoculando 50 μL de las conservas en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se dejó incubando a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 250 rpm durante 16-18 h. Posteriormente se recuperó el paquete celular centrifugando a 8000 rpm durante 5 min y la extracción de DNA plasmídico se efectuó

con el Wizzard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Al finalizar se cuantificó la concentración de DNA mediante el nanofotómetro P-360 (Implen). La concentración de DNA se ajustó a un rango de 150-200 ng/ μ L debido a los requerimientos solicitados por el Instituto de Fisiología Celular (UNAM). Se concentró utilizando el Centrivap Concentrator a temperatura de 40°C hasta alcanzar la concentración deseada. Además, se verificó la integridad del plásmido mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. Se analizaron alícuotas de 1 μ L con GelRed para pre-tinción. El gel se observó en transiluminador de UV

Además, debido a la longitud del fragmento *TanM* fue necesario enviar oligonucleótidos complementarios a una parte interna del fragmento, por lo que se enviaron los oligos 5'TanCgs (5'-GCTGGTTACGACGCTTTCTC-3') y 3'TanCgs (5'-TCACCGTCAGACAACTCAGC-3'). Para la secuenciación también se utilizaron los oligonucleótidos universales SP6 y T7 proporcionados por el Instituto de Fisiología Celular (UNAM). Con los cuatro oligonucleótidos se obtuvieron 4 fragmentos secuenciados, a los cuales se ensamblaron con la herramienta Contig Assembly Program (CAP) del programa BioEdit para obtener la secuencia de los plásmidos construidos (figura 7). Posteriormente, dicha secuencia nucleotídica fue analizada mediante la herramienta BLASTx del NCBI para determinar el porcentaje de identidad de la secuencia aminoacídica teórica con la secuencia de la tanasa de *A. niger* GH1. Se verificó que la única diferencia con la secuencia aminoacídica de la tanasa de *A. niger* GH1 fuera en el aminoácido de arginina y que en su lugar se encontrara una Alanina.

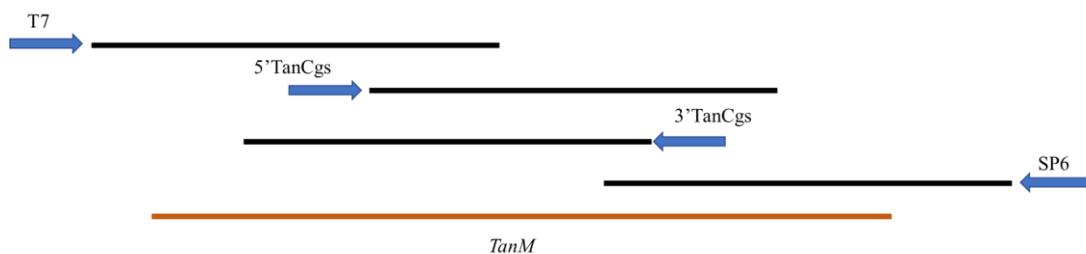


Figura 7. Esquema del traslape de los fragmentos secuenciados con los oligonucleótidos utilizados.

6.5. Construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras de la secuencia nucleotídica capaces de producir y secretar la tanasa de *A. niger* GH1 modificada

6.5.1. Estrategia de subclonación del fragmento TanM en el plásmido pPIC9TqQ

Después de confirmar que el fragmento *TanM* poseía la modificación del codón de arginina por alanina, y además no existían mutaciones no deseadas, se continuó a realizar la subclonación del fragmento *TanM* en el plásmido pPIC9. Para ello se obtuvo el plásmido pPIC9TgQ, previamente construido en el laboratorio (Fuentes-Garibay, 2011), y se digirió con las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI* para liberar el fragmento *TgQ*. Al mismo tiempo, el plásmido pGEMTanM fue digerido con las mismas enzimas para liberar el fragmento *TanM*. Posteriormente, el plásmido pPIC9 y el fragmento *TanM* se ligaron entre ellos para construir el plásmido pPIC9TanM.

6.5.2. Preparación de los plásmidos pPIC9TgQ y pGEMTanM

Se propagaron las cepas de *E. coli* JM109 portadora de pPIC9TgQ y *E. coli* JM109 que posee pGEMTanM en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL). Se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 16 h. Posteriormente, se obtuvo el paquete celular centrifugando a 12,000 rpm durante 5 min y se realizó la extracción de DNA plasmídico utilizando el Wizzard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Se cuantificó la concentración de DNA utilizando el nanofotómetro P-360 (Implen); además se verificó la integridad del plásmido mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. Se analizaron alícuotas de 4 µL con GelRed para pre-tinción. El gel se observó en transiluminador de UV. Finalmente, los plásmidos se calentaron a 65°C durante 20 min para eliminar nucleasas.

6.5.3. Digestión preparativa de los plásmidos pPIC9TgQ y pGEMTanM

La digestión preparativa de los plásmidos pPIC9TgQ y pGEMTanM se llevó a cabo con las enzimas de restricción *Xho* I y *Not* I (New England Biolabs) de manera consecutiva utilizando un buffer compatible para ambas enzimas. En primer lugar, se realizó la digestión con *Xho* I y posterior al tiempo de incubación y respectiva desactivación de la enzima, se llevó a cabo la digestión con *Not* I. Los volúmenes de la reacción de digestión se describen en la Tabla 16. La reacción se incubó a 37°C durante 1 h y las enzimas fueron desactivadas por calor a 65°C durante 20 min, en ambos casos.

Tabla 13. Volumen de las reacciones de digestión preparativa de los plásmidos pPIC9TgQ y pGEMTanM.

Reactivo	pGEMTanM (μ L)	pPIC9TgQ (μ L)
Buffer Cut Smart (10X)	4	4
BSA acetilada (100X)	0.4	0.4
pGEMTanM (94 ng/ μ L)	34.6	
pPIC9TgQ (75 ng/ μ L)		34.6
<i>Xho</i> I (20 U/ μ L)	1	1
<i>Not</i> I (10 U/ μ L)	1	1
Volumen Final	40	40

Entre cada digestión se verificó que los cortes fueran adecuados mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. El gel fue teñido posteriormente con GelRed y se observó en transiluminador de UV. Los tamaños de fragmentos esperados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 14. Tamaños de los fragmentos esperados después de la digestión de los plásmidos pPIC9TgQ y pGEMTanM con las enzimas de restricción *Xho*I y *Not*I.

pGEMTanM (pb)	pPIC9TgQ (pb)
3,014	7,733
1,712	1,004

Finalmente se llevó a cabo la purificación de los fragmentos para obtener el plásmido pPIC9 libre y el fragmento *TanM* libre para su posterior ligación. La purificación se realizó utilizando el Wizzard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega) a partir de gel de agarosa. Se siguió el procedimiento preparativo descrito en la sección 6.4.5 y las especificaciones del fabricante. Posteriormente se cuantificaron los fragmentos purificados en el nanofotómetro P-360 (Implen) y se analizó la integridad de los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. El gel fue teñido posteriormente durante 30 min en agitación con GelRed y se observó en transiluminador de UV.

6.5.4. Ligación del vector pPIC9 con el fragmento TanM

Se calculó la cantidad en nanogramos del fragmento *TanM* (inserto) de 1,712 pb que se requiere para tener una relación molar vector:inserto de 1:5. Considerando que el vector de pPIC9 es de 7,700 pb, se utilizó la ecuación 2.

$$\text{Cantidad de inserto (ng)} = \frac{\text{Cantidad de vector (ng)} \times \text{Tamaño de inserto (kb)}}{\text{Tamaño de vector (kb)}} \times \text{Relación molar} \left(\frac{\text{inserto}}{\text{vector}} \right)$$

Ec 2. Cálculo de la cantidad de inserto (ng) requerida para ligar con el vector pPIC9.

La ecuación 2 reveló que para 50 ng del vector se requerían 55.6 ng del inserto, los cuales se tomaron de las purificaciones realizadas en la sección 6.5.3. La reacción de ligación se preparó utilizando los volúmenes indicados en la Tabla 18. Además, se preparó un control sin ligasa y las reacciones se incubaron toda la noche a 4°C.

Tabla 15. Volúmenes de los reactivos utilizados en la reacción de ligación del fragmento *TanM* con el vector pPIC9.

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer de ligación rápida (2X)	5
Vector pPIC9 (50 ng/ μL)	1
Fragmento <i>TanM</i> (17 ng/ μL)	3
DNA T4 ligasa (3 U/ μL)	1
Volumen Final	10

Al finalizar el tiempo de incubación, se analizaron 4 μL de cada reacción por electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. El gel se tiñó en pre-tinción con GelRed y se observó en transiluminador de UV.

6.5.5. Transformación de células de *E. coli* JM109 calcio competentes con pPIC9TanM

El producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* JM109 calcio competentes previamente preparadas como se describe en la sección 6.4.7. Para ello, a una alícuota de 50 μL de células calcio competentes se le agregaron 6 μL de la reacción de ligación y se incubaron en hielo durante 10 min. Posteriormente, se llevó a choque térmico en baño de agua a temperatura de 42°C por 45 s y en seguida se regresó al hielo durante 2 min. Después del choque térmico, se agregaron 250 μL de medio LB y se incubó 1 h a 37°C y 250 rpm. Finalmente, se sembraron 100 μL de la suspensión celular en placas con LB y ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las placas se dejaron en incubadora estática a 37°C durante 14-16 h.

6.5.6. Caracterización de las cepas de *E. coli* pPIC9TanM

Al final de la incubación, se tomó muestra de las colonias resistentes a ampicilina para inocular en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se incubaron durante 16 h a 37°C y 250 rpm. Se recuperó el paquete celular de las colonias propagadas centrifugando

a 8,000 rpm durante 1 min. Posteriormente, se extrajo DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina como se describe en la sección 6.4.11.

Para la caracterización por PCR del plásmido pPIC9TanM se utilizaron los oligonucleótidos 5'AOX y 3'TanMut, y así confirmar la presencia del vector pPIC9 y el inserto TanM. Se utilizó la enzima GoTaq Flexi DNA Polimerasa (Promega) y como DNA molde diluciones 1:100 del DNA plasmídico extraído de las colonias aisladas. La reacción de PCR para las clonas asiladas y un control negativo (agua), se preparó con los volúmenes indicados en la Tabla 19 y siguiendo las condiciones de reacción descritos en la Tabla 20.

Tabla 19. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR para caracterizar el plásmido pPIC9TanM.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración Final
Green Buffer (5X)	5	1 X
dNTP's (10 mM)	0.5	200 μM
Oligo 5'AOX (5 μM)	2.5	0.5 μM
Oligo 3'TanMut (5 μM)	2.5	0.5 μM
MgCl ₂ (25 mM)	2	2 mM
Go Taq Flexi Pol (5 U/μL)	0.2	0.02 U/μL
DNA molde	1	-----
Agua ultrapura	11.3	-----
Volumen Final	25	-----

Tabla 20. Condiciones de la reacción de PCR para caracterizar el plásmido pPIC9TanM.

Etapa	Evento	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización	1	95	2 min
2	Desnaturalización	30	95	1 min
	Hibridación		57	1 min
	Extensión		72	1 min 15 s
3	Extensión Final	1	72	5 min
4	Refrigeración Final	1	4	Indefinido

Al finalizar la reacción de PCR se analizó una alícuota de 2 μL de los productos y el control negativo mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. El gel fue

teñido posteriormente durante 30 min en agitación con GelRed y se observó en transiluminador de UV. Las cepas que presentaron el fragmento deseado se conservaron con glicerol absoluto estéril 1:1 y se eligió una para enviar a secuenciar.

El plásmido pPIC9TanM se envió a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular (UNAM), para confirmar que se conservó el fragmento *TanM* correcto. La preparación de la muestra se realizó como se describió en la sección **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** con la diferencia que en esta ocasión se enviaron oligonucleótidos específicos del fragmento *TanM*, los cuales son 5'TanCgs, 3'TanCgs, 5'TanX y 3'TanNot. Con los cuatro oligonucleótidos se obtuvieron 4 fragmentos secuenciados los cuales se ensamblaron con la herramienta Contig Assembly Program (CAP) del programa BioEdit para obtener la secuencia *TanM* (figura 8). Posteriormente, dicha secuencia fue analizada mediante la herramienta BLASTx del NCBI para determinar el porcentaje de identidad de la secuencia aminoacídica teórica con la secuencia de la tanasa de *A. niger* GH1. Se verificó que la única diferencia con la secuencia aminoacídica de la tanasa de *A. niger* GH1 fuera en el aminoácido de arginina y que en su lugar se encontrara una Alanina.

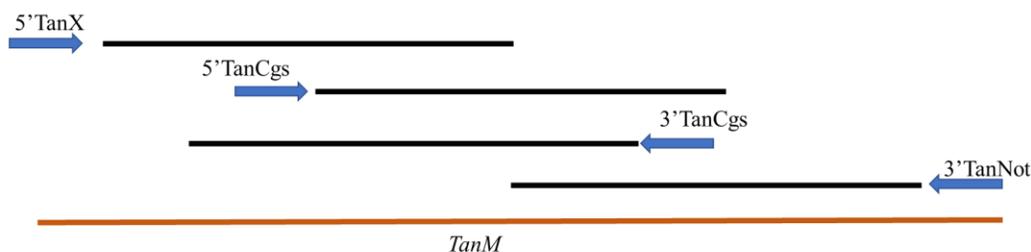


Figura8. Esquema del traslape de los fragmentos secuenciados con los oligonucleótidos utilizados.

6.5.7. Preparación a mediana escala del plásmido pPIC9TanM

Después de confirmar que el fragmento *TanM* es correcto y que además se encuentra ligado al vector pPIC9, se continuó a prepararlo en cultivo a mediana escala. Para ello se inocularon 500 μ L de la conserva en glicerol 1:1 de la cepa confirmada con el plásmido pPIC9TanM, en 50 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubó a 37°C y 250 rpm durante 16 h. Posteriormente se recuperó el medio con células en un tubo Corning

de 50 mL y se centrifugó a 4500 rpm durante 15 min. El paquete celular se resuspendió en 2 mL de amortiguador de lisis (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM). Después de incubar 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 4 mL de una solución alcalina (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló de 3 a 6 veces por inversión y se colocó el tubo en hielo durante 5 min. En seguida, se añadieron 3 mL de acetato de amonio 7.5 M pH 7.8 y se mezcló suavemente por inversión durante unos segundos. Se mantuvo la suspensión en hielo durante 10 min para permitir que las proteínas y DNA de alto peso molecular se precipitaran. Para continuar, se centrifugó por 20 min a 4,500 rpm a una temperatura de 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 15 mL limpio, donde se agregó 1 volumen de isopropanol y se dejó incubar a temperatura ambiente por 20 min. De nuevo se centrifugó a 4,500 rpm durante 15 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 5 mL de etanol al 70% para luego centrifugar 5 min a 4,500 rpm. Finalmente se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla durante 15 min con los tubos invertidos sobre papel secante. Una vez seca la pastilla, se resuspendió en 500 µL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8). Finalmente se agregó 1 µL de RNAsa (Promega) y se dejó incubar 3 h a 37°C para eliminar la presencia de RNA. Al finalizar el tiempo de incubación, se calentó la muestra a 65°C durante 20 min y se analizó una alícuota de 1 µL mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X en pre-tinción. Al confirmar que el RNA fue degradado por la enzima, se llevó la muestra a las unidades de filtración-concentración Microcon YM-3 (Millipore). Se vertió todo el volumen de la muestra en el filtro, el cual se colocó en un tubo colector de desechos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min hasta concentrar a un volumen de 100 µL. Posteriormente, se añadieron 200 µL de H₂O MilliQ libre de nucleasas y se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 10 min. Lo último se repitió dos veces. En seguida, se realizó un último lavado, agregando 100 µL de H₂O MilliQ libre de nucleasas y se centrifugó a 14,000 rpm durante 8 min hasta llegar al volumen de 100 µL. Finalmente, se invirtió la unidad de filtración-concentración en un tubo colector nuevo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min para recuperar la muestra de DNA pPIC9TanM. Se cuantificó la concentración de DNA en el nanofotómetro P-360 (Implen) y se analizó una alícuota de 1 µL mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X en pre-tinción para verificar la integridad del plásmido.

6.5.8. Linealización de pPIC9TanM con la enzima de restricción *SalI*

Para llevar a cabo la transformación en *P. pastoris* KM71 se realizó la linealización del vector pPIC9TanM mediante la digestión preparativa con *Sal I*. La reacción se preparó como se indica en la Tabla 21. Se digirieron 50 µg totales del DNA previamente tratado con las unidades de filtración-concentración YM-3 (sección 6.5.7). La reacción se incubó a 37°C durante 1 h. Al finalizar la incubación se preparó una dilución 1:5 y se analizó 1 µL de la dilución mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. El gel fue teñido posteriormente durante 20 min en agitación con GelRed y se observó en transiluminador de UV.

Tabla 16. Volúmenes de los reactivos utilizados en la reacción de linealización de pPIC9TanM con la enzima de restricción *SalI*.

Reactivo	Volumen (µL)
Agua ultrapura	3.6
Buffer (10X)	2.5
DNA pPIC9TanM (2.875 µg/µL)	17.4
<i>SalI</i> (50 U/µL)	1.5
Volumen Final	25

Una vez confirmada la linealización de pPIC9TanM se continuó al desalado y concentración para transformar la cepa de *P. pastoris* KM71. Para ello se colocó la mezcla de la reacción de digestión en la unidad de filtración-concentración Microcon YM-3 (Milipore), la cual se colocó dentro de un tubo colector de desecho. Se agregaron 400 µL de H₂O MilliQ libre de nucleasas y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min hasta llevar a un volumen de 100 µL. Posteriormente, se realizaron dos lavados añadiendo 200 µL de H₂O MilliQ libre de nucleasas y centrifugando a 14,000 rpm durante 10 min. En seguida, se realizó un último lavado con 100 µL de H₂O MilliQ libre de nucleasas y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min hasta llegar a un volumen entre 70-80 µL. Finalmente, se invirtió la unidad de filtración-concentración en un tubo colector nuevo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min para recuperar la muestra de DNA pPIC9TanM concentrada y desalada.

La muestra se llevó a concentrar en el Centrivap Concentrator a temperatura de 40°C hasta alcanzar un volumen de 10 µL. En seguida, se tomó 1 µL de la muestra para preparar una dilución 1:5. La dilución se utilizó para cuantificar la concentración de DNA en el nanofotómetro P-360 (Implen). Además, se analizó una alícuota de 1 µL de la dilución, mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X en pre-tinción.

6.5.9. Transformación de *P. pastoris* KM71 con el plásmido pPIC9TanM

Las alícuotas de 40 µL de *P. pastoris* KM71 competentes que estaban almacenadas a -70°C se dejaron descongelar lentamente en hielo. Se colocó la celda de electroporación (BioRad), nueva y estéril, en hielo durante 2 min. Una vez descongelada la alícuota de células competentes, se le agregaron 8 µL del plásmido pPIC9TanM (4.5 µg totales) previamente linealizado. Se ajustó el electroporador (Biorad Gene Pulser II) de acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla 22. En condiciones de esterilidad se colocó la mezcla de DNA-células en el fondo de la celda de electroporación y se cerró. En seguida se colocó la celda en el tren de carga del electroporador y se llevó a cabo la descarga. Posteriormente, en condiciones de esterilidad se agregó 1 mL de sorbitol 1 M frío a la celda de electroporación y a una alícuota de células competentes sin electroporar (control). Se homogenizó por inversión 10 veces. Se sembraron 10 µL de la mezcla de electroporación con extensión con asa en placas en medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%, agar 2%) del control sin electroporar y de la muestra electroporada, como control de viabilidad después de electroporar. Por otro lado, se sembraron 200 µL del control sin electroporar en una placa de RDB (sorbitol 1 M, dextrosa 2%, YNB 1.34%, biotina 4×10^{-5} %, aminoácidos 0.005%, agar 2%), como control para verificar la ausencia de plásmidos en las células competentes. Finalmente, en placas de RDB se sembró la muestra electroporada en placas con 100, 200, 300 y 400 µL de la muestra. Todas las placas se dejaron en incubadora estática a 30°C durante 96 h.

Tabla 17. Parámetros de electroporación utilizados para transformar células competentes de *P. pastoris*.

Celda (mm)	Volumen de células (μL)	Voltaje (V)	Capacitancia (μF)	Resistencia (Ω)	Campo de Fuerza (kV/cm)	Longitud de pulso (mseg)
2	40	1500	25	400	7500	8.66

6.5.10. Caracterización por PCR de células de *P. pastoris* KM71 transformadas con el plásmido pPIC9TanM

Las colonias de células transformadas que crecieron en las placas de RDB se consideraron como clonas con la inserción de la secuencia nucleotídica *TanM* en el genoma. Esto debido a la selección por prototofía a histidina. Las colonias se picaron con puntas de micropipeta estériles y se inocularon en 10 mL de medio líquido YPD en tubos Corning de 50 mL. Se dejaron incubar a 30°C con agitación de 250 rpm durante 16-18 horas hasta obtener una DO₆₀₀ entre 6-8. Los cultivos se almacenaron a 4°C mientras se realiza el proceso de selección de la clona sobreproductora.

Por otro lado, se tomaron 100 μL de algunas conservas elegidas al azar y se inocularon en 10 mL de medio líquido YPD en tubos Corning de 50 mL. Se dejaron incubar a 30°C con agitación de 250 rpm hasta obtener una DO₆₀₀ entre 6-8. Se tomaron 4 mL de cultivo para extraer DNA genómico mediante la técnica de TSNT. Para obtener el paquete celular se centrifugó en una centrifuga HERMLE Z326K GmbH a 14,000 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 200 μL solución de lisis TSNT (Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0). Se agitó por inversión 20 veces y en vortex 5 min. Después se agregaron 500 μL de fenol saturado con Tris-HCl pH 8.0 y se mezcló por inversión 20 veces. Además se agregaron 100 μL de SEVAG (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) y se mezcló en vórtex durante 5 min. En seguida se agregaron 200 μL de TE 1X pH 8.0 y se agitó por inversión 20 veces. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Al terminar, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y estéril. Se agregó 1 mL de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se dejó incubar durante 1 h a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min. Se realizó un lavado al pellet con 1 mL de etanol al 70% procurando despegar la pastilla y nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min. Se desechó

el sobrenadante y se dejó secar la pastilla, invirtiendo el tubo sobre papel secante. El pellet se resuspendió en 50 μL de TE 1X y se calentó a 65°C durante 20 min. Se analizaron 5 μL mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X para pre-tinción. Se observó en transiluminador de UV para verificar la correcta extracción del DNA genómico.

De la extracción de DNA genómico se preparó una dilución 1:10, la cual se utilizó como templado para realizar la caracterización por PCR. Las concentraciones de los reactivos de la PCR se describen en la Tabla 23 y las condiciones de la reacción se muestran en la tabla 24. Se utilizaron los oligonucleótidos 5'AOX y 3'TanCgs, con lo cual se esperaba un fragmento de 1,378 pb.

Tabla 18. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR para caracterizar clonas de *P. pastoris* KM71 transformadas con el plásmido pPIC9TanM.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración Final
Green Buffer (5X)	5	1 X
dNTP's (10 mM)	0.5	200 μM
Oligonucleótido 5'AOX (5 μM)	2.5	0.5 μM
Oligonucleótido 3'TanCgs (5 μM)	2.5	0.5 μM
MgCl ₂ (25 mM)	2	2 mM
GoTaq Flexi Pol (5 U/ μL)	0.2	0.02 U/ μL
DNA molde	1	-----
Agua ultrapura	11.3	-----
Volumen Final	25	-----

Tabla 19. Condiciones de la reacción de PCR para caracterizar clonas de *P. pastoris* KM71 transformadas con el plásmido pPIC9TanM.

Etapa	Evento	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización	1	95	2 min
2	Desnaturalización	30	95	1 min
	Hibridación		56	1 min
	Extensión		72	1 min 25 s
3	Extensión Final	1	72	5 min
4	Refrigeración Final	1	4	Indefinido

Se analizaron 2 μ L mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. El gel fue teñido posteriormente durante 30 min en agitación con GelRed y se observó en transiluminador de UV.

6.5.11. Reactivación de clonas de *P. pastoris* KM71ANT

Con el objetivo de comparar las características de la tanasa M con las de la tanasa de *A. niger* GH1 producida en *P. pastoris* sin la mutación, se procedió a la reactivación de la clona 1 y 2 de *P. pastoris* KM71ANT. Para ello se inocularon 100 μ L de la conserva en un tubo de 50 mL con 10 mL de YPD y se dejó incubar a 30°C y agitación de 250 rpm durante 96 h. Las clonas reactivadas se caracterizaron de la misma manera que las clonas de *P. pastoris* KM71TanM (ver sección 6.5.10).

6.6. Selección de una cepa de *P. pastoris* sobreproductora y producción de la tanasa de *A. niger* GH1 modificada

6.6.1. Cultivos de inducción en metanol

Para el cultivo se tomaron 100 μ L de las conservas de cada clona de *P. pastoris* KM71TanM y se inocularon en tubos de 50 mL conteniendo 10 mL de medio YPD; se dejaron incubar a 30°C y 250 rpm durante 16 h hasta alcanzar DO_{600} de 8-10. Posteriormente, el cultivo en tubo de 50 mL se utilizó como inóculo para un matraz de 500 mL conteniendo 50 mL de medio BMG (buffer fosfatos 100 mM, YNB 1.34%, glicerol 1%, biotina 4×10^{-5}). Se ajustó la DO_{600} inicial a 0.3 y se dejó incubar a 30°C y 250 rpm durante 12 h hasta alcanzar DO_{600} de 6-8. El cultivo se transfirió a un tubo Corning de 50 mL estéril y se centrifugó a 4500 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 10 mL de medio BMM (buffer de fosfatos 100 mM, YNB 1.34%, biotina 4×10^{-5}) ajustando la DO_{600} inicial de 25. La adición de metanol fue cada 12 h a concentración final de 0.75% hasta completar las 48 h de inducción. Al finalizar la inducción se centrifugó el medio con células en tubos Corning de 50 mL a 4,500 rpm durante 10 min. El sobrenadante libre de células se separó en

alícuotas de 1 mL y se almacenó a -20°C para su posterior determinación de la concentración de proteínas extracelulares y actividad de tanasa.

6.6.2. Determinación de la concentración de proteínas extracelulares por el método de Bradford y rendimiento proteínas extracelulares/biomasa

La determinación de la concentración de proteínas extracelulares se llevó a cabo por el método de Bradford, el cual se basa en la absorbancia a 595 nm, medida en un nanofotómetro (IMPLEN), presentada por presencia del color azul resultante de la interacción entre proteínas y el azul brillante de Coomassie (Sigma). Se realizó una recta de calibración utilizando como estándar albúmina sérica bovina (ASB). Se preparó una solución stock a 50 µg/mL de ABS a partir del cual se establecieron diluciones a concentraciones conocidas, como se muestra en la Tabla 25. Para la determinación de la concentración de proteínas en el sobrenadante, se tomaron 200 µL de muestra y se le agregaron 800 µL de reactivo de Bradford. La lectura se realizó a 595 nm en nanofotómetro.

Tabla 25. Volúmenes de reacción para la recta de calibración del método de Bradford.

Estándar (µg/mL)	ABS 50 µg/mL (µL)	Agua destilada (µL)
0	0	200
5	20	180
7.5	30	170
15	60	140
22.5	90	110
30	120	80
45	180	20

La concentración de proteínas extracelulares en el sobrenadante se obtuvo mediante la extrapolación matemática de la recta de calibración, como se indica en la ecuación 3.

$$\text{Concentración de proteínas extracelulares} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{AbsBradford} - b}{m}$$

Ec 3. Cálculo de la concentración de proteínas extracelulares.

Al sobrenadante obtenido a las 48 h de inducción de las 84 clonas evaluadas se determinó el rendimiento proteínas extracelulares/biomasa mediante la ecuación 4.

$$\text{Rendimiento} \frac{\text{proteinas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right)}{\text{biomasa}} = \frac{\text{Concentración de proteínas extracelulares}}{\text{Concentración de biomasa seca}}$$

Ec 4. Cálculo del rendimiento de proteínas extracelulares por g de biomasa seca.

Donde la concentración de biomasa seca (g/L) se obtuvo al multiplicar la DO_{600} a las 48 h de inducción por el factor 0.23. Se consideraron a las 5 clonas con mayor rendimiento proteína extracelular/biomasa como las cepas sobreproductoras.

6.6.3. Determinación de actividad enzimática de tanasa

La determinación de la actividad enzimática se realizó de acuerdo con el método descrito por Sharma et al. (2000), el cual consiste en la determinación de la cantidad de ácido gálico liberado durante la reacción enzimática. La medición del ácido gálico libre se realiza mediante espectrofotometría a 520 nm, debido a la formación de un cromóforo a partir de la interacción entre el ácido gálico y la 2-tio-4-cetotiazolidina (rodanina). El sustrato utilizado en la reacción enzimática fue el 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo (galato de metilo) (Sigma Aldrich, Cat 274194-5G, P.M. 184.15 g/mol), del cual se preparó un stock al 10 mM en buffer de citratos 50 mM pH 5.0. Se realizó una recta de calibración a partir de un stock de ácido gálico (Sigma Aldrich, Cas 149-91-7, P.M. 170.12 g/mol) 543.4 μM en buffer de citratos 50 mM pH 5.0; los volúmenes utilizados se muestran en la Tabla 26. Por otro lado, para cada uno de los ensayos se prepararon dos blancos, como se describe en la Tabla 27. El blanco de sustrato se utilizó para determinar si el sustrato (galato de metilo) no libera ácido gálico, o en caso de hacerlo, detectar la cantidad de ácido gálico que se liberó en ausencia de enzima. Mientras que el blanco de

la muestra determina la posible concentración de ácido gálico presente en la muestra en ausencia del sustrato (galato de metilo). La absorbancia de ambos blancos se considera en los cálculos de la actividad enzimática.

Tabla 26. Volúmenes de reacción para la recta de calibración de la determinación de actividad enzimática de tanasa.

Estándar (mM)	Ácido gálico 0.24 mM (μL)	Buffer de citratos 50 mM, pH 5.0 (μL)
0	0	125
0.08	41.6	83.4
0.16	83.3	41.7
0.24	125	0

Tabla 27. Mezcla de reacción para la determinación de actividad enzimática de tanasa.

Reactivos	Blanco de sustrato (μL)	Blanco de muestra (μL)	Muestra (μL)
Ácido gálico	0	0	0
Galato de metilo 10 mM	62.5	0	62.5
Buffer de citratos 50 mM, pH 5	62.5	62.5	0
Dilución de la muestra	0	62.5	62.5
Total	125	125	125

Todas las muestras se diluyeron en buffer de citratos 50 mM y pH 5.0 hasta que la concentración de proteínas se encontró entre 14-34 $\mu\text{g/L}$. Todas las soluciones y muestras utilizadas se dejaron incubando 10 min a 30°C antes de comenzar la reacción. La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: 1) las mezclas preparadas en la Tabla 27, se dejaron incubar durante 5 min a 30°C. 2) Se agregaron 75 μL de rodanina metanólica y se dejó incubar la reacción durante 5 min a 30°C. 3) Se agregaron 50 μL de KOH 0.5 N y se incubó la reacción durante 5 min a 30°C. 4) Finalmente se agregó 1 mL de agua destilada y se dejó incubar la reacción durante 10 min a 30°C. Al terminar la reacción se leyó en nanofotómetro (IMPLEN) a 520 nm.

Para calcular la concentración de ácido gálico liberado (AGL), primero se realizó el cálculo de la absorbancia del ácido gálico liberado (Abs_{AGL}) mediante la ecuación 5. Lo anterior consiste en restar las absorbancias del blanco de sustrato ($Abs_{BlancoSustrato}$) y el blanco de la muestra ($Abs_{BlancoMuestra}$) a la absorbancia de la muestra ($Abs_{Muestra}$). Posteriormente, mediante una extrapolación matemática en la recta de calibración con estándares de ácido gálico, se calculó la concentración de AGL (C_{AGL}), lo cual se muestra en la ecuación 6, donde m corresponde a la pendiente de la recta y b a la ordenada de origen de la recta de calibración.

$$Abs \text{ ácido gálico liberado} = Abs \text{ Muestra} - Abs \text{ Blanco sustrato} - Abs \text{ Blanco muestra}$$

Ec 5. Cálculo de la absorbancia de ácido gálico liberado.

$$Concentración \text{ ácido gálico liberado (mM)} = \frac{Abs \text{ ácido gálico liberado} - b}{m}$$

Ec 6. Cálculo de la concentración de ácido gálico.

La actividad enzimática volumétrica (AVT) expresada en U/mL se calculó como lo indica la ecuación 7. Para ello se consideró a una unidad de tanasa (U) como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de ácido gálico por min bajo las condiciones del ensayo (30°C pH 5).

$$AVT \left(\frac{U}{mL} \right) = 0.4 (\text{Concentración ácido gálico liberado})(FD)$$

Ec 7. Cálculo de la concentración de ácido gálico.

Donde C_{AGL} es la concentración de ácido gálico expresado en mM, FD es el factor de dilución de la muestra antes de hacer el ensayo y 0.4 es un factor que proviene del volumen de la reacción enzimática (125 μ L) entre el tiempo de reacción (5 min), entre el volumen

de la muestra (62.5 µL). Para el cálculo de la actividad específica se siguió lo indicado en la ecuación 8.

$$\text{Actividad específica } \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}}\right) = \frac{1000 \times \text{AVT}}{\text{Concentración proteínas extracelulares } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}$$

Ec 8. Cálculo de la actividad específica de tanasa.

6.6.4. Determinación del rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$)

Para la selección de la clona sobreproductora se consideraron las 5 clonas de mayor rendimiento proteínas extracelulares/biomasa para evaluar el rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$). Además, para conocer el comportamiento de la población en general, se eligió 1 clona de rendimiento proteínas extracelulares/biomasa medio y bajo. De las 7 clonas seleccionadas se repitieron cultivos de inducción como se describe en la sección 6.6.1. Se realizaron cinéticas de la concentración de proteínas extracelulares (ver sección 6.6.2) y actividad enzimática volumétrica de tanasa (ver sección 6.6.3) hasta las 48 h de inducción. El cálculo del rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$) se realizó como indica la ecuación 9. La cepa con mayor rendimiento proteínas/biomasa y mayor $Y_{p/x}$ fue seleccionada como la cepa sobreproductora.

$$Y_{p/x} \left(\frac{\text{U}}{\text{g}}\right) = \frac{(\text{AVT}) \times (1000)}{\text{Concentración de biomasa seca}}$$

Ec 9. Cálculo del rendimiento producto/biomasa $Y_{p/x}$.

6.6.5. Caracterización por PCR de la clona sobreproductora de *P. pastoris* KM71TanM

La clona de *P. pastoris* KM71TanM seleccionada como clona sobreproductora se caracterizó por PCR. Para ello se realizó la extracción de DNA genómico a partir de 4 mL de cultivo en YPD, mediante la técnica de TSNT como está descrito en la sección 6.5.10. De la extracción se preparó una dilución 1:10; la cual se utilizó como DNA molde para

realizar la caracterización por PCR como se describe en la sección 6.5.10. Las concentraciones de los reactivos de la PCR se describen en la Tabla 23 y las condiciones de la reacción se muestran en la Tabla 24.

6.6.6. Diferenciación por PCR de la clona sobreproductora de *P. pastoris* KM71TanM con la clona KM71ANT

De la extracción de DNA genómico de las cepas KM71TanM y KM71ANT se preparó una dilución 1:10; la cual se utilizó como templado para realizar la diferenciación por PCR de las cepas mencionadas. Las concentraciones de los reactivos de la PCR se describen en la tabla 28 y las condiciones de la reacción se muestran en la tabla 29. Las reacciones de PCR se prepararon de la siguiente manera: 2 controles negativos, uno con cada par de oligonucleótidos; 2 reacciones utilizando como templado la cepa KM71TanM, cada una con distinto par de oligonucleótidos; y 2 reacciones utilizando como templado la cepa KM71ANT, cada una con distinto par de oligonucleótidos. Un par de oligonucleótidos estaba conformado por 5'TanCgs y 3'TanNot; los cuales fungieron como control positivo debido a que amplifican para ambas cepas. El segundo par de oligonucleótidos se conformó por 5'TanCgs y 3'TANGSA (5'-TGG CCT AGG TTA GAA AAC TG-3'); los cuales fueron el diferenciador, debido a que estos no amplifican para la cepa de KM71TanM, pero sí amplifican un fragmento de 1,360 pb cuando se utilizan en la cepa KM71ANT.

Tabla 28. Volúmenes y concentración final de los reactivos utilizados en la reacción de PCR para diferenciar entre la cepa de *P. pastoris* KM71TanM y la cepa KM71ANT.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración Final
Green Buffer (5X)	5	1 X
dNTP's (10 mM)	0.5	200 μM
Oligonucleótido 1 (5 μM)	2.5	0.5 μM
Oligonucleótido 2 (5 μM)	2.5	0.5 μM
MgCl ₂ (25 mM)	2	2 mM
Go Taq Flexi Pol (5 U/μL)	0.2	0.02 U/μL
DNA molde	1	-----
Agua ultrapura	11.3	-----
Volumen Final	25	-----

Tabla 29. Condiciones de la reacción de PCR para diferenciar entre la cepa de *P. pastoris* KM71TanM y la cepa KM71ANT.

Etapa	Evento	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización	1	95	2 min
2	Desnaturalización	30	95	1 min
	Hibridación		58	1 min
	Extensión		72	1 min 25 s
3	Extensión Final	1	72	5 min
4	Refrigeración Final	1	4	Indefinido

Se analizaron 2 μ L mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. El gel fue teñido posteriormente durante 30 min en agitación con GelRed y se observó en transiluminador de UV.

6.6.7. Caracterización de la cepa sobreproductora de *P. pastoris* KM71TanM en cultivos en matraz con adición de metanol cada 12 y 24 h

De la clona de KM71TanM seleccionada como sobreproductora se evaluó el comportamiento en cultivos en matraz con adición de metanol cada 12 y 24 h. Los cultivos se realizaron como se describe en la sección 6.6.1. Se compararon los parámetros de crecimiento, producción de proteínas extracelulares, actividad enzimática volumétrica y $Y_{p/x}$.

6.6.8. Comparación de la clona sobreproductora de *P. pastoris* KM71TanM contra la clona KM71ANT

La clona sobreproductora de KM71TanM junto con la cepa de *P. pastoris* KM71ANT reactivada en la sección 6.5.11, se llevaron a cultivos en matraz como se describe en la sección 6.6.1. Con la diferencia que los cultivos se llevaron a las 72 h de inducción con adición de metanol cada 24 h. Se realizaron cinéticas del crecimiento celular, la producción de proteínas extracelulares (ver sección 6.6.2), actividad volumétrica de tanasa (ver sección 6.6.3) y se midió el pH en el sobrenadante con tiras reactivas.

6.6.9. Obtención del concentrado enzimático del sobrenadante libre de células de los cultivos de *P. pastoris* KM71TanM y KM71ANT

El sobrenadante de los cultivos de inducción del gen heterólogo a las 48 h de inducción se concentró en dispositivos de ultrafiltración Amincon Ultra 10 KDa (Cat. UFC801024). El sobrenadante de los cultivos de las dos cepas evaluadas (KM71TanM y KM71ANT) se llevaron de un volumen de 16 mL a 100 μ L. Los dispositivos de ultrafiltración utilizados se lavaron con agua bidestilada dos veces antes de añadir la muestra. Para ello se agregaron 4 mL de agua bidestilada y se centrifugaron a 4,500 rpm y 4°C durante 10 min. Posteriormente se añadió la muestra y se llevó a un volumen de 100 μ L con ciclos de centrifugación de 10 min a 4,500 rpm y 4°C, según fuera necesario para llegar al volumen. En seguida, se realizaron dos lavados con un volumen de agua bidestilada. Finalmente se recuperó el volumen del concentrado en tubos de 0.6 mL y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.6.10. Análisis del concentrado enzimático de los cultivos de *P. pastoris* KM71TanM y KM71ANT por SDS-PAGE

El concentrado enzimático se analizó por SDS-PAGE empleando un gel de poliacrilamida al 10% (Tabla 30). Se aplicaron 8 μ g totales de proteína de cada concentrado de sobrenadante de los cultivos con las cepas KM71TanM y KM71ANT, los cuales fueron previamente incubados con buffer de carga 2X (Sigma Cat. S3401-1VL) a 95°C durante 5 min. Las muestras se cargaron con un marcador de masa molecular de 14-67 kDa. Las condiciones del corrimiento fueron con una corriente eléctrica de 20 mA durante 2 h en frío. Al finalizar, se tiñó el gel con una solución colorante de Comassie (Azul brillante de Comassie 0.5% p/v, metanol 50% v/v, ácido acético 10% v/v, en agua ultrapura) durante toda la noche. Al siguiente día, el gel se colocó en una solución decolorante (metanol 5% v/v, ácido acético 7% v/v, en agua ultrapura) y se dejó durante 1 día hasta que se observaran bandas azules y el fondo claro.

Tabla 30. Volúmenes para elaborar los geles de poliacrilamida 10%.

Solución Stock	Gel concentrador (μL)	Gel separador (μL)
Agua destilada	3,050	3,650
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	600	2,650
Tris-HCl 2 M pH 6.8	250	---
Tris-HCl 2 M pH 8.8	---	1,500
SDS	40	80
PSA 10%	10	50
TEMED	5	10
Volumen Final	3,955	7,940

6.6.11. N-desglicosilación del concentrado enzimático del cultivo de la clona de *P. pastoris* KM71TanM sobreproductora y KM71ANT

Se determinó la concentración de proteínas extracelulares por el método de Bradford al concentrado enzimático del sobrenadante de KM71TanM y KM71ANT a las 24 y 48 h de inducción. A partir de ello se sometieron 16 μg de proteínas totales a tratamiento de N-desglicosilación con la desglicosidasa Endo H (New England Biolabs Cat. P0702S). Además, se prepararon dos controles del ensayo completando los volúmenes con agua ultrapura. Los controles fueron el concentrado enzimático sin tratamiento con la desglicosidasa Endo H y la desglicosidasa Endo H sin concentrado enzimático. Para el tratamiento con la Endo H se siguió el protocolo del fabricante y los volúmenes utilizados se muestran en la Tabla 31. Primero se desnaturizó la tanasa añadiendo buffer de desnaturización de glicoproteínas 10X y se incubó a 100°C durante 10 min. Posteriormente se añadió buffer de reacción G5 10X y la enzima Endo H. La reacción se incubó a 37°C durante 1 h.

Tabla 31. Volúmenes de la reacción de N-desglicosilación del concentrado enzimático de KM71TanM con Endo H.

Reactivos	Concentrado con EndoH (μL)	Concentrado sin EndoH (μL)	Endo H (μL)
Concentrado enzimático de KM71TanM (1.757 μg/mL)	9	9	---
Agua ultrapura	---	---	9
Buffer de desnaturalización (10X)	1	1	1
Volumen Total	10	10	10
Buffer de Reacción G5 (10X)	2	2	2
Agua ultrapura	7	8	7
Endo H (1000 U/μL)	1	---	1
Volumen Final	20	20	20

Al finalizar las reacciones, se añadió buffer de cargar 2X y se incubó a 95°C durante 5 min. La mezcla de las reacciones con buffer de carga se analizó por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% (Tabla 28) bajo las condiciones indicadas en la sección 6.6.9.

6.6.12. Cultivo en matraz con inducción en medio BMM-alanina de la clona de *P. pastoris* KM71TanM sobreproductora y de la cepa KM71ANT

Debido a la presencia de degradación aparente en los cultivos en matraz y que el aumento de la producción enzimática se relacionó con la disminución del pH a 5.0, se decidió realizar cultivos en matraz a pH 5.0 en la etapa de inducción con metanol. Por ello, la clona sobreproductora de KM71TanM junto con la cepa de *P. pastoris* KM71ANT reactivada en la sección 6.5.11, se llevaron a cultivos en matraz como se describe en la sección 6.6.1, con algunas modificaciones: 1) Durante el cambio de medio BMG a medio BMM-alanina pH 5.0, se realizaron dos lavados con el medio BMM-alanina antes de llevar a la concentración inicial de la etapa de inducción. 2) La etapa de inducción se realizó con medio BMM adicionado con L-alanina al 0.4% ajustado a pH 5.0. 3) La etapa de inducción se realizó por 72 h con adición de metanol cada 24 h. Se realizaron cinéticas del crecimiento celular, la producción de proteínas extracelulares (ver sección 6.6.2),

actividad volumétrica de tanasa (ver sección 6.6.3) y se monitoreo el pH en el sobrenadante con tiras reactivas. Del sobrenadante a las 72 h de inducción se obtuvieron alícuotas de 1 mL y se almacenaron a -20°C para realizar la caracterización bioquímica de la enzima.

6.6.13. Preparación de inóculo para el cultivo en biorreactor de la clona de *P. pastoris* KM71TanM sobreproductora

La clona de *P. pastoris* KM71TanM sobreproductora se llevó a cultivo en un biorreactor de 7 L interconectado con el biocontrol ez-Control y el programa BioExpert lite (Applikon Biotechnology BV, Schiedman, The Netherlands). En primer lugar, se reactivó la clona en 10 mL de medio YPD y se dejó incubar a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar DO₆₀₀ de 0.6-0.8. Posteriormente, se utilizó para inocular 200 mL de medio BMG, el cual se dejó incubar a 250 rpm y 30°C durante 20-24 h hasta alcanzar densidad celular de 20. Posteriormente, este cultivo se utilizó para inocular 1.8 L de medio BSG (por litro: 26.70 mL H₃PO₄ al 85%, 0.93 g CaSO₄·2H₂O, 4.16 g KOH, 14.90 g MgSO₄·7H₂O, 18.20 g K₂SO₄) con glicerol 10 g/L (12 mL/L biotina 0.02% y 12 mL/L PTM1) y obtener volumen total de 2 L. El biorreactor se dejó funcionando a condiciones de pH 5.0, temperatura 30°C y 1240 rpm durante 14 h hasta que se consumió toda la fuente de carbono. Al terminar el cultivo, se cosechó todo el medio de cultivo en esterilidad y se midió la densidad celular. Todo el medio de cultivo se centrifugó en tubos Corning de 50 mL a 4000 rpm durante 10 min. Los paquetes celulares se resuspendieron en medio de conserva (BMG con glicerol 30 g/L) y se llevaron a densidad celular final de 200. Se prepararon alícuotas de 13 mL en tubos Corning de 15 mL y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Finalmente, para verificar la viabilidad de los inóculos y la ausencia de contaminación por otros microorganismos, se realizó una cuenta viable de una de las alícuotas mediante el método de dilución y estriado en placa. Se prepararon 3 diluciones (10⁹, 10¹⁰ y 10¹¹) en buffer de fosfatos 100 mM pH 6.0, las cuales se estriaron en placas con medio YPD-agar y se dejaron en incubadora estática a 30°C durante 48 h. Al finalizar ese tiempo, se realizó el conteo de células viables para obtener las UFC en la dilución que presentara colonias lo suficientemente separadas para contarlas con facilidad.

6.6.14. Cultivo en biorreactor de la clona de *P. pastoris* KM71TanM sobreproductora

Se reactivó uno de los inóculos preparados de la clona sobreproductora de *P. pastoris* KM71TanM (sección 6.6.12). Para ello se agregaron los 13 mL del inóculo en 200 mL de medio BMG y se incubó con agitación de 250 rpm y 30°C durante 16 h. Lo anterior se utilizó para inocular el biorreactor conteniendo 1.8 L de medio BSG con 50 g/L de glicerol (12 mL/L biotina 0.02% y 12 mL/L PTM1) e iniciar el cultivo en biorreactor con un volumen total de 2 L. Antes de la inoculación, se agregaron 250 µL de antiespumante 289 (Sigma-Aldrich Co.) al medio de cultivo y se esterilizó junto con el biorreactor en autoclave. El cultivo en biorreactor consistió en tres etapas: lote de glicerol, lote alimentado con glicerol y lote alimentado con metanol. Para el comienzo de la primera etapa, después de la esterilización del vaso y medio de cultivo, y antes de la inoculación se ajustó la temperatura a 30°C y la aeración a 5 L/min (1.2-2.5 vvm). La agitación fue de 1500 rpm y la presión se mantuvo manualmente en 120 cmH₂O. Por otro lado, el pH del medio de cultivo se ajustó a 5.0 y se mantuvo durante todo el cultivo con una solución de NH₄OH al 28%, lo cual también se utilizó como la fuente de nitrógeno. Además, se agregaron al medio de cultivo 8.8 mL de biotina 0.02% y 8.8 mL PTM1 estériles. Posteriormente, se realizó la inoculación para comenzar la etapa de lote de glicerol, la cual continuó hasta que se agotó la fuente de carbono (20 h 30 min). La segunda etapa inició 45 min después de agotarse la fuente de carbono y se realizó hasta alcanzar la densidad celular de 50 g/L deseada para el inicio de la etapa de inducción (4 h 40 min), alimentando con glicerol 50% (12 mL/L biotina 0.02% y 12 mL/L de PTM1) a una velocidad que fue aumentando de forma exponencial, a través de una bomba de alimentación programable (Masterflex L/S DIGISTALTIC Dispensing System, Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, USA), para alcanzar una velocidad específica de crecimiento constante (μ) de 0.065 h⁻¹. Las condiciones de la segunda etapa fueron las mismas que la primera etapa (30°C, pH 5.0). Una vez alcanzada la densidad celular deseada, se detuvo la alimentación con glicerol y después de 45 min comenzó la tercera etapa. Las condiciones de la etapa de lote alimentado con metanol se llevaron a cabo a 24°C con alimentación de metanol al 100% (12 mL/L biotina 0.02% y 12 mL/L PTM1) utilizando un sistema de control de bucle cerrado con un controlador y monitor de la concentración de gas de metanol MC-

168 (PTI Instruments, Kathleen, GA, USA), el software NB2018 (PTI Instruments, Kathleen, GA, USA), y la bomba de alimentación programable Masterflex, para mantener una concentración constante de metanol de 1 g/L en el medio de cultivo. La etapa de lote alimentado con metanol comenzó con una alimentación de 5 mL de metanol 100% a un flujo constante durante 30 min, para dar tiempo a que el controlador de metanol se estabilizara. Posteriormente, la velocidad de adición de metanol fue controlado por el sensor/controlador de la concentración de metanol en el medio de cultivo por 74 h. Durante la etapa de lote alimentado con metanol, el oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20% de saturación con suplementación de mezclas de aire y oxígeno cada vez que el cultivo lo requería. Al final del cultivo, el medio libre de células se recuperó al centrifugar el medio de cultivo a 4,500 g durante 5 min a 4°C y se almacenó a -20°C hasta su uso.

El crecimiento celular se determinó por duplicado a partir de la densidad celular de células cosechadas del medio de cultivo en alícuotas de 2 mL, basado en que 1 g de células húmedas es aproximadamente igual a 0.25 g de células secas. La μ de la etapa de lote alimentado con metanol, se calculó como el coeficiente del exponente del ajuste matemático en una función exponencial del gráfico de la biomasa seca contra el tiempo. En cada punto de muestreo, el volumen del medio de cultivo se calculó con la suma del volumen inicial del medio de cultivo, el volumen de la solución del NH_4OH , el consumo de glicerol y la adición de metanol en ese tiempo, menos el volumen muestreado en el tiempo anterior. La producción de tanasa extracelular se calculó usando el cálculo de la actividad de tanasa descrita en la sección 6.6.3 en el cultivo libre de células y el volumen del medio de cultivo libre de células estimado con el volumen de celular por gramo células seca ($3.56 \cdot 10^{-3}$ L/g células secas). El rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$) se estimó con la pendiente lineal de la producción de tanasa extracelular en Unidades contra la biomasa seca en gramos. El rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$) se calculó con la pendiente lineal de la producción de biomasa seca contra la cantidad de metanol (g) añadido al medio de cultivo en el tiempo.

El rendimiento producto/sustrato ($Y_{p/s}$) se estimó con la pendiente de la cantidad de producto (U) contra la cantidad de metanol (g) añadido al medio de cultivo en el tiempo.

La velocidad de consumo de sustrato específica (q_s) y la velocidad de formación de producto específica (q_p) se calcularon mediante el cociente de la velocidad específica de crecimiento (μ) entre $Y_{x/s}$ y el producto de la velocidad específica de crecimiento (μ) por $Y_{p/x}$, respectivamente. Finalmente, la productividad del cultivo se estimó con la pendiente de la cantidad de producto (U) contra el tiempo (h) en la etapa de inducción, mientras que la productividad volumétrica a las 74 h de inducción se estimó con la pendiente de la producción volumétrica (U/L o mg/L) contra el tiempo (h).

6.7. Caracterización bioquímica de la tanasa de *A. niger* GH1 modificada

6.7.1. Purificación de la tanasa M y ANT producida en matraz con inducción en medio BMM-alanina

El medio libre de células obtenido a las 74 h de los cultivos en matraz con inducción en medio BMM-alanina de la clona sobreproductora KM71TanM y la cepa KM71ANT, se purificó para su posterior caracterización bioquímica. En primer lugar, se realizó el cambio de buffer a Tris-HCl 100 mM pH 7.0 (buffer A) utilizando dispositivos de ultrafiltración Amicon Ultra-4 10-kDa (Millipore). Posteriormente, se realizó un paso de purificación utilizando el sistema de cromatografía Biologic LP (BioRad) y una columna de intercambio aniónico 1 mL-HiTrap Q FF (GE Healthcare BioSciences Corp), la cual fue equilibrada con buffer A. Por otro lado, las proteínas se eluyeron con el buffer B (Tris-HCl 100 mM, 1.0 M NaCl, pH 7.0) utilizando un proceso de elución en gradiente (0-16 min, 100% buffer A; 17-22 min, 0.25% buffer B; 23-33 min, 17.5% buffer B; 34-42 min, 30% buffer B; 43-48 min, 50% buffer B; 49-57 min, 75% buffer B; and 58-68 min, 100% buffer B) con una velocidad de elución de 1 mL/min y detección UV a 280 nm. Se recolectaron las 4 fracciones detectadas por UV. De cada fracción se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (ver sección 6.6.2) y la actividad específica de tanasa se realizó como se describió anteriormente (ver sección 6.6.3). Finalmente, las fracciones con mayor actividad enzimática de tanasa, se evaluaron por SDS-PAGE y se sometieron a tratamiento de N-desglicosilación como se describió anteriormente (ver sección 6.6.9 y 6.6.10).

6.7.2. Actividad específica y constantes cinéticas de las tanasa M y ANT producidas en matraz con inducción en medio BMM-alanina

La fracción cromatográfica que presentó mayor actividad enzimática se tomó para determinar la actividad específica y las constantes cinéticas de ambas tanasas (M y ANT). Las constantes cinéticas se obtuvieron determinando la actividad enzimática como se describió anteriormente (ver sección 6.6.3), a pH 5.0 y temperatura de 30°C, utilizando galato de metilo como sustrato a concentraciones de 0.08, 0.35, 0.60, 1.32, 2.36 y 5.0 mM.

Los valores de actividad de tanasa se ajustaron mediante el método de mínimos cuadrados no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten utilizando un programa Python que emplea la función `curve_fit` de la biblioteca de código abierto SciPy (Virtanen et al. 2020). La constante de Michaelis (K_m) y la velocidad máxima alcanzada (V_{max}) para cada tanasa recombinante se obtuvieron directamente de la ecuación ajustada. El número de recambio (k_{cat}) y la actividad específica se calcularon a partir de la V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$) entre la concentración de enzima (μM o mg/L) utilizada en los ensayos.

6.7.3. Purificación de la tanasa M producida a nivel de biorreactor

El medio libre de células obtenido a las 74 h de la etapa de lote alimentado con metanol fue utilizado para realizar la purificación y caracterización de la tanasa M. La purificación se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente (ver sección 6.7.1). Se recolectaron las 4 fracciones detectadas y de cada fracción se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (ver sección 6.6.2) y la actividad específica de tanasa se realizó como se describió anteriormente (ver sección 6.6.3). Finalmente, las fracciones con mayor actividad enzimática de tanasa, se evaluaron por SDS-PAGE y se sometieron a tratamiento de N-desglicosilación como se describió anteriormente (ver sección 6.6.9 y 6.6.10).

6.7.4. Determinación de la relación entre la concentración de proteínas de tanasa por el método de Bradford y del ácido bicinónico (BCA)

La fracción 1 obtenida de la cromatografía de intercambio aniónico se utilizó para realizar la determinación de concentración de proteínas de tanasa por el método de Bradford y BCA. Para ello se prepararon 3 diluciones (FD 20, 30 y 40) y se determinó la concentración de proteínas por medio de ambos métodos con 3 repeticiones. La relación entre la concentración de proteínas de tanasa determinadas por un método y el otro, se estimó mediante la pendiente de graficar las determinaciones de BCA contra las determinaciones por Bradford.

La determinación de proteínas extracelulares mediante el método de BCA se realizó con el QuantiPro BCA assay kit (Sigma) siguiendo las especificaciones del fabricante. En primer lugar, se realizó una recta de calibración utilizando como estándar ASB, utilizando una solución stock a 50 µg/mL de ABS a partir del cual se establecieron estándares en un rango de concentraciones de 0-45 µg/mL. Para la determinación de la concentración de proteínas en el sobrenadante, se tomaron 150 µL de muestra y se le agregaron 150 µL de la solución Quanti-Pro mix, se incubó a 60 °C durante 60 minutos. Posteriormente, se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente y se realizó la lectura en nanofotómetro a 562 nm. La concentración de proteínas extracelulares en el sobrenadante se obtuvo mediante la extrapolación matemática de la recta de calibración, como se indica en la ecuación 10.

$$\text{Concentración de proteínas extracelulares } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{AbsBCA} - b}{m}$$

Ec 10. Cálculo de la concentración de proteínas extracelulares por el método de BCA.

6.7.5. Efecto del pH en la actividad enzimática de la tanasa M producida a nivel de biorreactor

La fracción con mayor actividad enzimática de tanasa se utilizó para medir el efecto del pH en la actividad enzimática. Para ello se utilizaron los buffers de glicina-HCl 250 mM (pH 2.5), citrato de sodio 50 mM (pH 4.0, 5.0 y 6.0), y Tris-HCl 100 mM (pH 7.0 y 9.0).

La incubación con la enzima se realizó a temperatura constante de 30°C y se determinó la actividad enzimática de tanasa como se describió anteriormente (ver sección 6.6.3).

6.7.6. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la tanasa M producida a nivel de biorreactor

La fracción con mayor actividad enzimática de tanasa se utilizó para medir el efecto de la temperatura en la actividad enzimática. Para ello se utilizó como pH constante, aquel que fue determinado como el óptimo en la sección 5.6.5 (pH 5.0). Las temperaturas evaluadas fueron 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70°C, siguiendo el procedimiento de determinación de actividad enzimática de tanasa antes descrito (ver sección 6.6.3).

6.7.7. Actividad residual de la tanasa M producida a nivel de biorreactor

La fracción con mayor actividad enzimática de tanasa se utilizó para medir la actividad residual de la tanasa M. Para ello se preparó una dilución en buffer de citratos 50 mM (pH 5.0) y se realizaron alícuotas de esta dilución. A continuación, se determinó la actividad enzimática de tanasa como se describió previamente (ver sección 6.6.3). Las alícuotas se guardaron a 30°C y 4°C durante 120 h y se fueron tomando alícuotas para determinar la actividad de tanasa cada 24 h de incubación. La actividad residual se calculó siguiendo la ecuación 11. Donde ART se refiere a la actividad residual expresada en porcentaje, la AVT_t (U/mL) es la actividad volumétrica de tanasa después de incubar a 4 ó 30°C y la AVT_0 (U/mL) es la actividad volumétrica de tanasa al inicio de la incubación.

$$ART = \frac{AVT_{final}}{AVT_{inicial}} \times 100$$

Ec 11. Cálculo de la actividad residual de tanasa.

6.7.8. Comparación del modelo molecular y análisis de acoplamiento molecular de las tanasas M y ANT

Los modelos moleculares de la tanasa M y la tanasa ANT se construyeron por modelaje por homología utilizando el servidor SWISS-MODEL (Waterhouse et al. 2018). La diferencia de residuos de aminoácidos entre ambas tanasas es de 1 residuo y, además, la tanasa M es de una cadena y la tanasa ANT es de dos cadenas. Sin embargo, el servidor SWISS-MODEL no realizó el corte proteolítico que ocurre en la tanasa ANT, por lo que se utilizó el programa Swiss Pdb Viewer 4.1 (Guex & Peitsch 1997) para simular el corte proteolítico (Arg310-Ala311) del primer sitio de reconocimiento de Kex2 y construir la tanasa de 2 cadenas. Posteriormente, los modelos moleculares fueron sometidos a refinamiento y minimización de la energía mediante el servidor YASARA (Krieger et al. 2009). Por otro lado, el modelo molecular del galato de metilo se obtuvo de la base de datos PubChem (Wang et al. 2009) (número ID 7428). Para utilizarlo como sustrato en los análisis de acoplamiento molecular se realizó la minimización de la energía del galato de metilo con el programa Avogadro 1.2.0 (Hanwell et al. 2012).

Los modelos moleculares de la tanasa M y la tanasa ANT fueron visualizados y superpuestos mediante ajuste de mínimos cuadrados utilizando el programa UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004), el cual se utilizó para la estimación de la desviación de la media cuadrática (RMSD) y las distancias atómicas. Los cálculos se realizaron para la comparación de la proteína completa, el dominio tapa y el dominio α/β hidrolasa, entre las tanasas de 1 y 2 cadenas. La conformación del bucle flexible se evaluó utilizando la interfaz UCSF Chimera para el programa Modeller 9.25 (Webb & Sali 2016).

El análisis de acoplamiento molecular de las tanasas se realizó con el programa AutoDock Tools 1.5.6 (Morris et al. 2009). En primer lugar, se realizó el análisis por AutoLigand para determinar la zona de acoplamiento del galato de metilo. Posteriormente, se realizó el análisis de acoplamiento, donde la caja del grid (40x40x40) se ubicó en la zona determinada por los resultados de AutoLigand (Harris et al. 2007). Previamente a los análisis, a los modelos moleculares de las tanasas se les añadieron átomos de hidrógeno polares en los residuos de aminoácidos, y se removieron átomos de hidrógeno no polares de la estructura del galato de metilo. Además, se asignaron cargas Kollman y Gasteiger a

todos los átomos de las enzimas y la estructura del galato de metilo, respectivamente. Los hidrógenos no polares se eliminaron y se fusionaron las cargas con los átomos de carbono. Las estructuras de tanasa fueron analizadas con asignación de residuos flexibles en el aminoácido Asp197; mientras que la estructura del galato de metilo fue rígida.

6.8. Diseño de un proceso de recuperación y formulación de la tanasa M

Se propuso un proceso de recuperación y formulación de la tanasa recombinante. Para ello se realizó una búsqueda de la presentación, concentración y precio de las tanasas disponibles en el mercado, como referencia del formulado final de tanasa que se desea obtener. Además, se estimó el costo de los reactivos utilizados durante el cultivo en biorreactor y los reactivos utilizados durante las etapas de downstream planteadas para la recuperación y formulación de la tanasa recombinante. A partir de los rendimientos obtenidos en biorreactor, se estimó el precio probable de venta del formulado final de la tanasa mutada considerando los costos de materia prima, el costo total de la producción de una proteína recombinante y la ganancia esperada del proceso. Finalmente, el precio de venta se comparó con las tanasas disponibles en el mercado.

7. RESULTADOS

7.1. Construcción de una secuencia nucleotídica que codifique para la tanasa de *A. niger* GH1 con una modificación de uno de los sitios de reconocimiento de la proteasa Kex2

7.1.1. Obtención de la secuencia nucleotídica de la tanasa de *A. niger* GH1 con codones preferenciales para *P. pastoris* a partir del plásmido pPIC9ANT

En la Figura 9A se muestra el gel de agarosa de la extracción del plásmido pPIC9ANT. La presencia de una banda superior a los 10,000 pb sin barrido confirmó la integridad del plásmido para realizar la caracterización y posterior mutagénesis. Por otro lado, en la Figura 9B se presenta el resultado de la reacción de PCR, donde los controles positivo y negativo fueron correctos. La amplificación de un fragmento de 1,961 pb confirmó la presencia del fragmento de DNA sintético *ANT*, correspondiente al fragmento de DNA sintético de la tanasa de *A. niger* GH1 con codones preferenciales de *P. pastoris*.

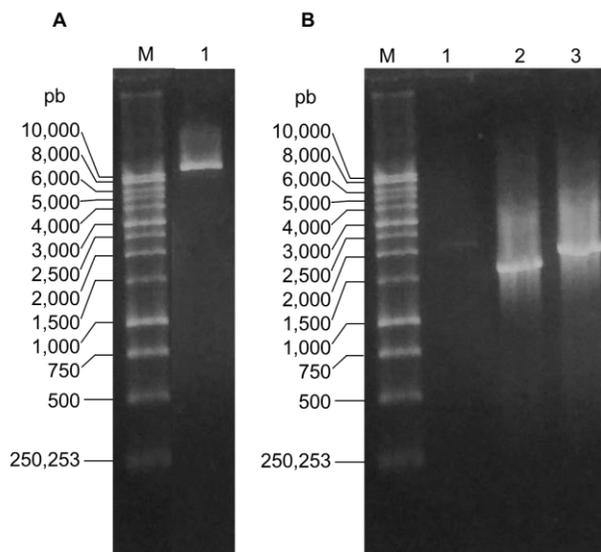


Figura 9. Geles de agarosa al 0.8% de A) la extracción de DNA plasmídico de *E. coli* JM109 pPIC9ANT. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: DNA plasmídico de *E. coli* JM109 pPIC9ANT. B) Reacción de PCR para caracterizar el plásmido pGEMANT. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo de PCR (agua), 2: Control positivo de PCR, 3: Muestra del plásmido pPIC9ANT

7.1.2. Síntesis del fragmento *TanM* mediante extensión por PCR de los fragmentos superpuestos

En la Figura 10 se muestra la presencia de los fragmentos primarios 5'TanX→3'TanMut y 5'TanMut→3'TanNot con bandas únicas de un tamaño de 895 y 840 pb, respectivamente. Después de la purificación, la cuantificación de la preparación de ambos fragmentos determinó que el fragmento 5'TanX→3'TanMut tuvo una concentración de 12.5 ng/μL, mientras que el fragmento 5'TanMut→3'TanNot estuvo a una concentración de 8 ng/μL. Conocer la concentración de los fragmentos primarios fue necesario para llevar a cabo la PCR secundaria, debido a que se utilizaron cantidades iguales de cada fragmento primario.

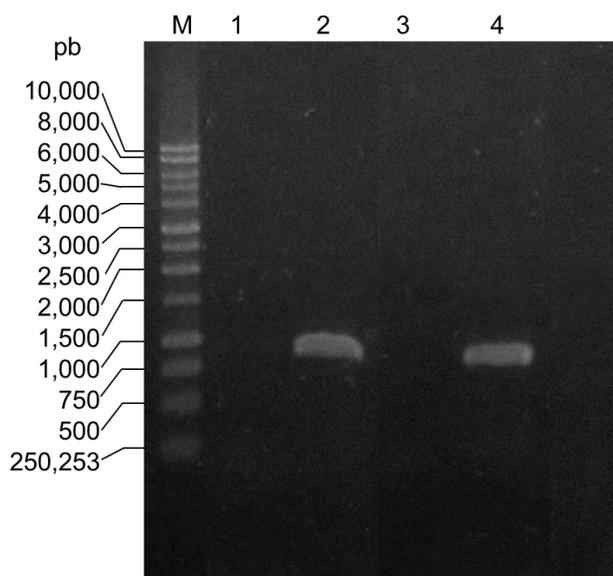


Figura 10. Gel de agarosa al 0.8% de la reacción de PCR para sintetizar los fragmentos primarios de la mutagénesis. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo de la PCR del fragmento 5'TanX→3'TanMut, 2: Fragmento 5'TanX→3'TanMut, 3: Control negativo de la PCR del fragmento 5'TanMut→3'TanNot, 4: Fragmento 5'TanMut→3'TanNot.

En la Figura 11 se muestra el producto amplificado de la PCR secundaria. En el gel de agarosa se observó el fragmento *TanM* de 1,712 pb. Después de la purificación, el fragmento *TanM* se obtuvo a concentración de 45 ng/μL. Por lo que el fragmento obtenido

mediante este proceso se consideró como el fragmento de DNA sintético que codifica para la tanasa con modificación en el sitio de reconocimiento de Kex2, y se continuó el proceso de ligación en el plásmido pGEM-T y posterior transformación en células de *E. coli* JM109 calcio competentes.

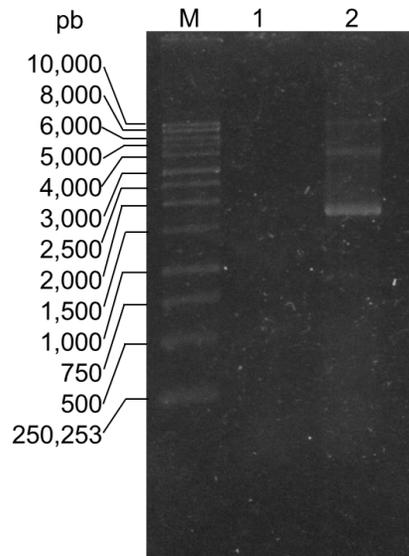


Figura 11. Gel de agarosa al 0.8% de la reacción de PCR para sintetizar el fragmento *TanM* a partir de los fragmentos primarios. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo de la PCR del fragmento *TanM*, 2: Fragmento *TanM*.

7.1.3. Construcción de la cepa de *E. coli* JM109 pGEMTanM

La Figura 12 muestra el gel de agarosa de la reacción de ligación entre el vector pGEM-T y el fragmento *TanM*. En el control negativo se obtuvo una única banda cerca de 3 kb correspondiente al tamaño del vector pGEM-T, lo que indica que estaba linealizado. Por otro lado, en la muestra de la reacción de ligación del vector con el fragmento *TanM* se observaron tres bandas correspondientes al vector (3 kb), el fragmento *TanM* (1712 pb) y el vector con el fragmento ligado (4.7 kb).

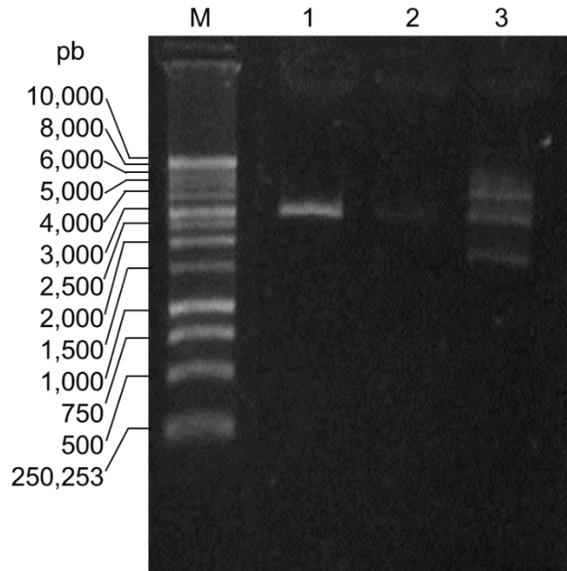


Figura 12. Gel de agarosa 0.8% de la reacción de ligación entre el vector pGEM-T y el fragmento *TanM*. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo de la ligación (sin inserto), 2: Ligación del vector pGEM-T y el fragmento *TanM*.

En la Figura 13 se muestran las placas de la transformación de *E. coli* JM109 con el vector pGEMTanM y sus respectivos controles. De la ligación del fragmento *TanM* con el vector pGEM-T se obtuvieron 12 colonias transformadas de *E. coli* JM109 con resistencia a ampicilina. De ellas, 6 colonias fueron blancas por lo que se seleccionaron por contener el plásmido pGEMTanM. Por otro lado, el control de viabilidad (Figura 13A) y el control negativo de resistencia a ampicilina (Figura 13B) determinaron que las células competentes utilizadas estaban activas y no eran resistentes al antibiótico antes de ser transformadas.

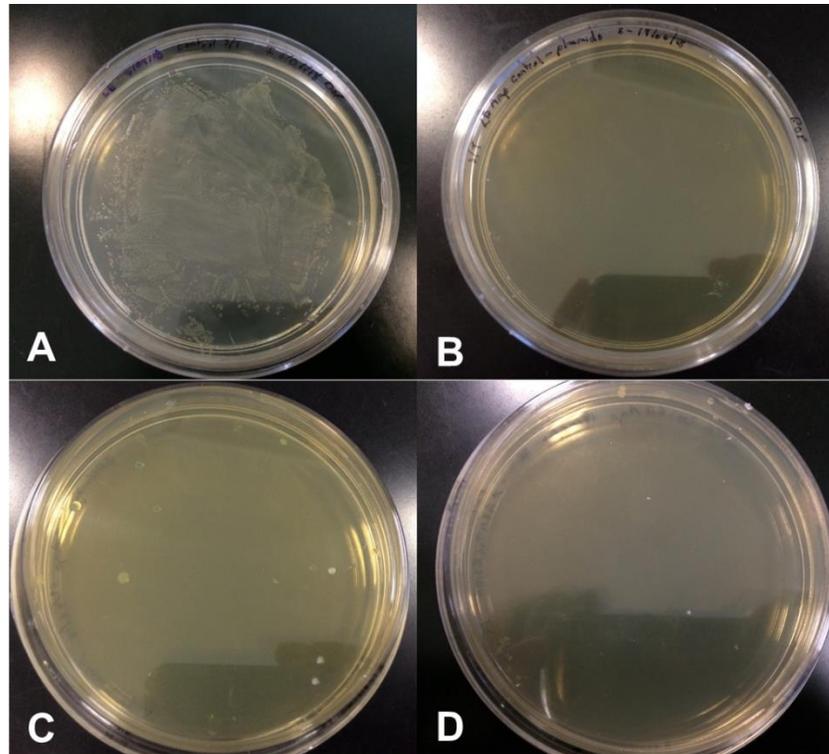


Figura 13. Placas sembradas con células de *E. coli* JM109 transformadas con el plásmido pGEMTanM. A) Control de viabilidad, B) control negativo de resistencia a ampicilina, C) placa con 4 colonias blancas, D) Placa con 2 colonias blancas.

7.1.4. Caracterización de la cepa de *E. coli* JM109 pGEMTanM

En la Figura 14A se muestra el gel de agarosa de la extracción del plásmido pGEMTanM a partir de las colonias blancas resultantes de la transformación de *E. coli* JM109. La presencia de una banda superior a los 10,000 pb sin barrido confirmó la integridad del plásmido. Por otro lado, en la caracterización por PCR específica de los plásmidos obtenidos, 3 de ellos amplificaron el fragmento esperado de 1,712 pb; confirmando la presencia del inserto correcto (Figura 14B). Los plásmidos confirmados por PCR y provenientes de dos colonias diferentes fueron seleccionadas para ser secuenciadas en el Instituto de Fisiología Celular (UNAM).

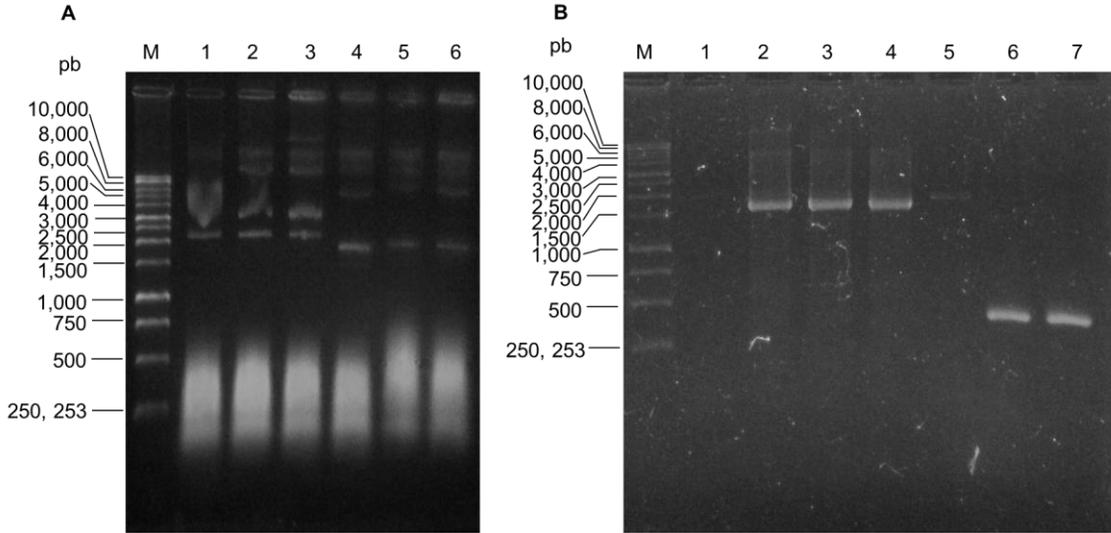


Figura 14. Geles de agarosa 0.8% de A) la extracción de DNA plasmídico de las clonas blancas de *E. coli* JM109 transformadas. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1-6: colonias blancas. B) La caracterización por PCR del plásmido pGEMTanM. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo de la reacción de PCR, 2-7: Colonias blancas.

En la Figura 15 se muestra el alineamiento de las secuencias obtenidas de la secuenciación del plásmido pGEMTanM y la secuencia consenso. La secuenciación demostró que una de las clonas poseía el plásmido con la secuencia correcta con la mutación en el codón de arginina. A su vez se comprobó la ausencia de mutaciones no deseadas.



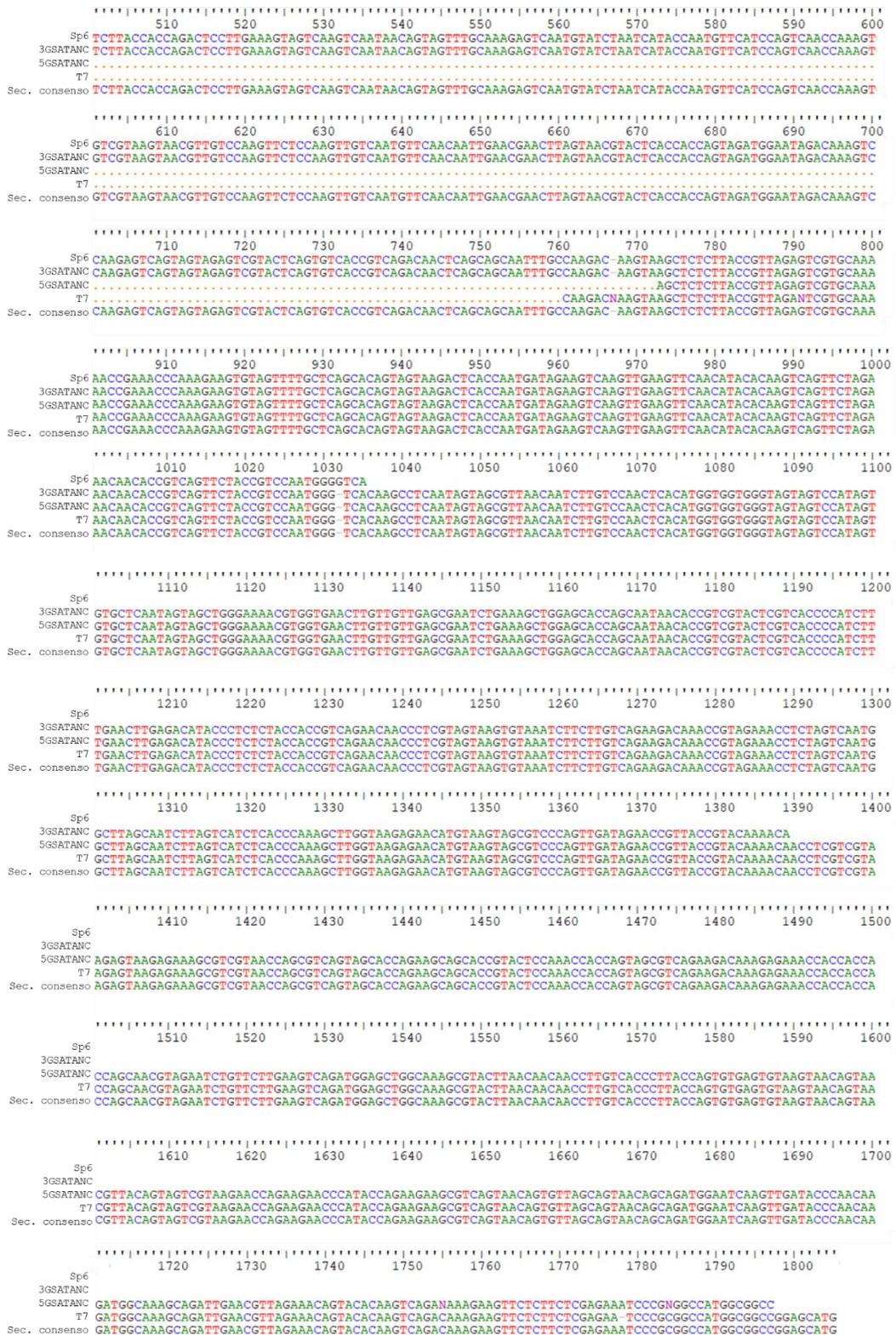


Figura 15. Alineamiento de las secuencias obtenidas por secuenciación y secuencia consenso obtenida con la herramienta CAP de BioEdit.

7.2. Construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras de la secuencia nucleotídica capaces de producir y secretar la tanasa de *A. niger* GH1 modificada

7.2.1. Digestión preparativa de los plásmidos pPIC9TgQ y pGEMTanM

En la Figura 16 se muestra la extracción de DNA plasmídico de pPIC9TgQ y pGEMTanM, los cuales se observan íntegros. El plásmido pPIC9TgQ se obtuvo a una concentración de 75 ng/μL y el plásmido pGEMTanM a 94 ng/μL, de acuerdo con la lectura del espectrofotómetro.

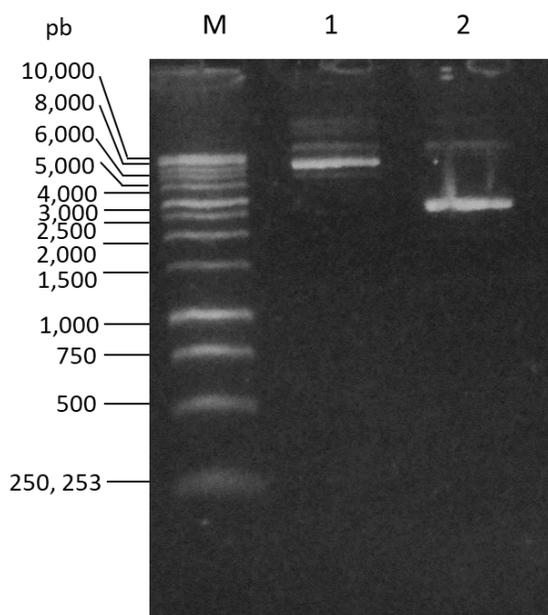


Figura 16. Gel de agarosa 0.8% de la extracción de DNA plasmídico de *E. coli* JM109 pPIC9TgQ y *E. coli* JM109 pGEMTanM. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: DNA plasmídico de *E. coli* JM109 pPIC9TgQ, 2: DNA plasmídico de *E. coli* JM109 pGEMTanM.

En la Figura 17A se presenta la linealización de ambos plásmidos con *Xho* I debido a que se obtuvieron bandas de 8,704 pb y 4,712 pb correspondientes a pPIC9TgQ y pGEMTanM, respectivamente. Por otro lado, en la Figura 17B se muestra el resultado de la segunda digestión con *Not* I. En la digestión del plásmido pPIC9TgQ se obtuvieron bandas de 7,700 y 1,004 pb correspondientes al vector pPIC9 y al inserto *TgQ*,

respectivamente. Mientras que en la digestión de pGEMTanM se obtuvieron bandas de 3,000 y 1,712 pb pertenecientes al vector pGEM y al inserto *TanM*, respectivamente. Además, en la Figura 18 se muestra la purificación exitosa de los fragmentos de interés, es decir el vector pPIC9 (7,700 pb) y el fragmento *TanM* (1,712 pb). La concentración del vector pPIC9 fue de 10 ng/μL y la del fragmento *TanM* de 6 ng/μL, de acuerdo con la lectura del nanofotómetro.

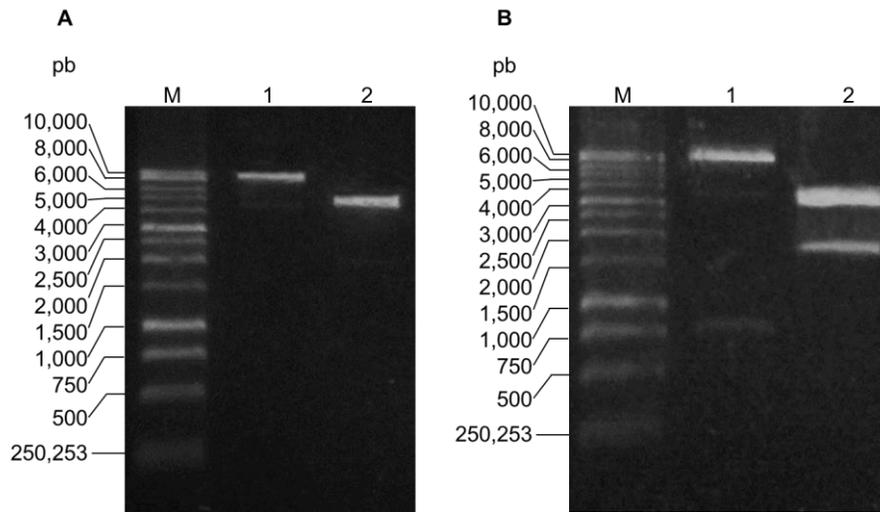


Figura 17. Geles de agarosa 0.8% de la reacción de digestión con A) *Xho* I. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Digestión de pPIC9TgQ, 2: Digestión de pGEMTanM. B) *Not* I. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Digestión de pPIC9TgQ, 2: Digestión de pGEMTanM.

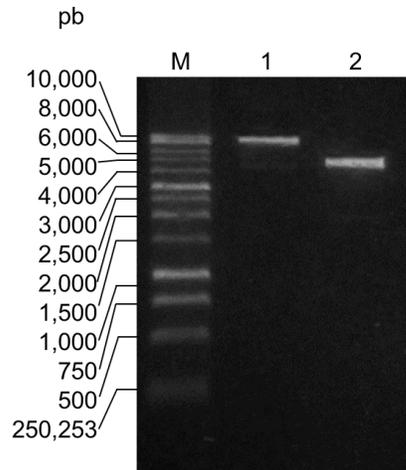


Figura 18. Gel de agarosa 0.8% de la purificación de los fragmentos pPIC9 y *TanM*. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: pPIC9, 2: *TanM*.

7.2.2. Construcción de la cepa de *E. coli* JM109 pPIC9TanM

La Figura 19 muestra el gel de agarosa de la reacción de ligación, con el cual se comprobó que la ligación ocurrió entre el vector pPIC9 y el fragmento *TanM*. En el carril del control negativo (sin ligasa) se observa que el vector y el inserto permanecieron íntegros. Posteriormente, en la reacción con ligasa se observa el cambio en la conformación del plásmido pPIC9TanM.

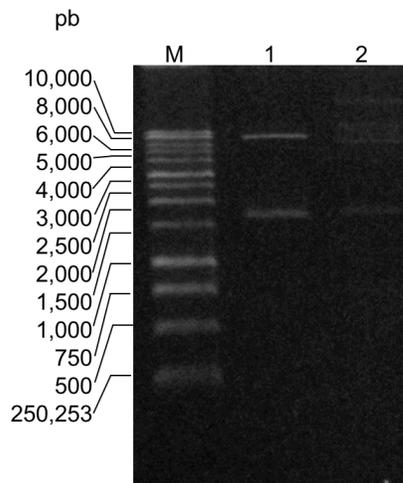


Figura 19. Gel de agarosa 0.8% de la reacción de ligación entre el vector pPIC9 y el fragmento *TanM*. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo de la ligación (sin ligasa), 2: Ligación del vector pPIC9 y el fragmento *TanM*.

En el ensayo de transformación de cepas de *E. coli* JM109 con el vector pPIC9TanM, se obtuvieron 63 colonias, las cuales al ser resistentes a ampicilina se consideró que poseían el plásmido pPIC9TanM (Figura 20C). El control de viabilidad (Figura 20A) determinó que las células competentes utilizadas estaban activas, mientras que el control de resistencia a ampicilina (Figura 20B) fue negativo, por lo que se confirmó que las células competentes utilizadas no tenían resistencia al antibiótico antes de ser transformadas.

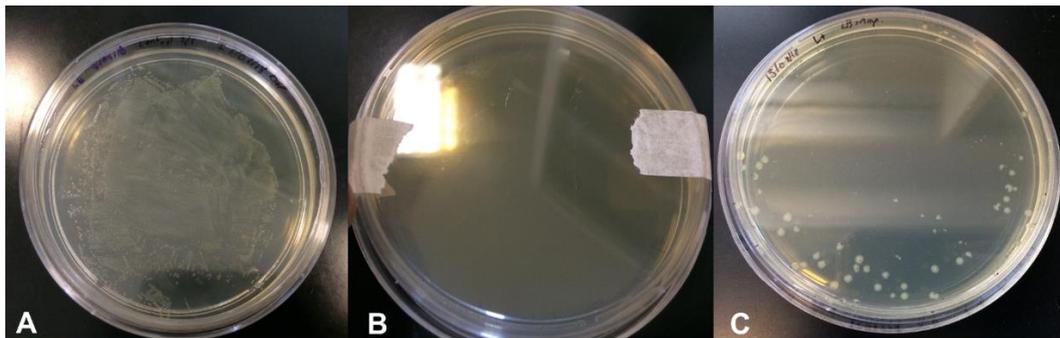


Figura 20. Placas de la transformación de células competentes de *E. coli* JM109 con el plásmido pPIC9TanM. A) Control de viabilidad B) Control negativo de resistencia a ampicilina, C) Células transformadas con la reacción de ligación (pPIC9TanM).

7.2.3. Caracterización de la cepa de *E. coli* JM109 pPIC9TanM

En la Figura 21 se muestra el gel de agarosa de la caracterización por PCR de 4 colonias de *E. coli* JM108 pPIC9TanM. Las 4 colonias presentaron una banda de 1,232 pb, correspondiente al plásmido pPIC9TanM, por lo que se confirmó su presencia en las colonias. Este fragmento corresponde a la secuencia pre-pro del factor alfa (225 pb), y fragmentos del promotor *AOX1* (94 pb) y del fragmento *TanM* (883 pb). Uno de los plásmidos de una de las colonias analizadas fue seleccionado para ser secuenciado en el Instituto de Fisiología Celular (UNAM).

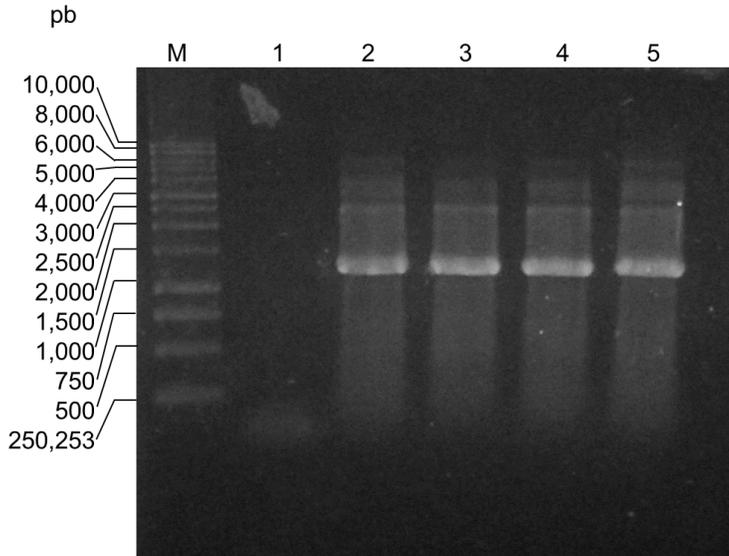


Figura 21. Gel de agarosa 0.8% de la PCR para confirmar la presencia del plásmido pPIC9TanM. M: Marcador de tamaño molecular 1 Kb, 1: Control negativo (agua), 2-5: Colonia 1-4.

En la Figura 22 se muestra el alineamiento de las secuencias obtenidas durante la secuenciación del plásmido pPIC9TanM y la secuencia consenso. La secuenciación demostró que el plásmido analizado poseía la secuencia correcta con la mutación en el codón de arginina. Además, se verificó que durante la construcción no se presentaron mutaciones no deseadas.



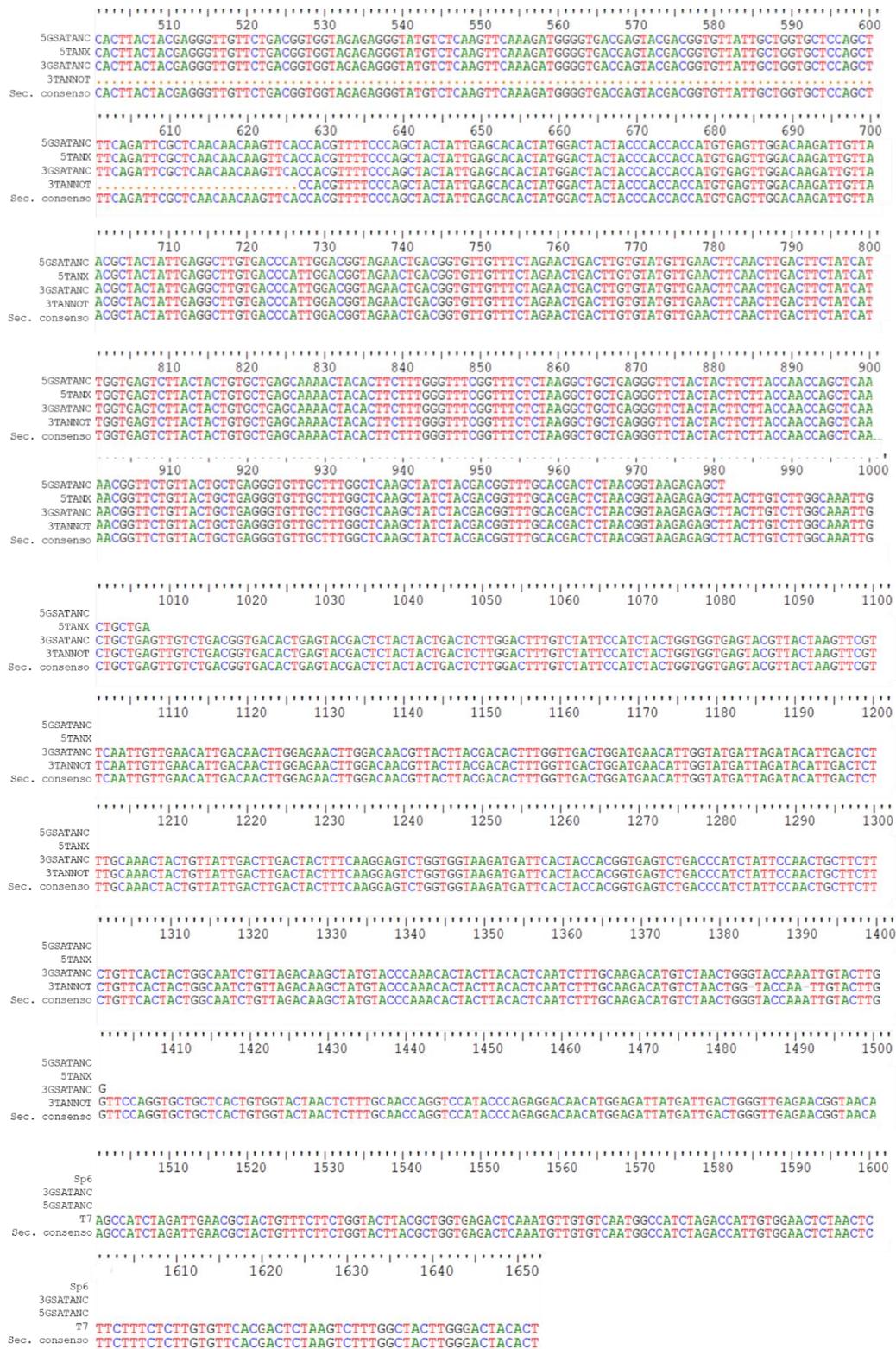


Figura 22. Alineamiento de las secuencias obtenidas por secuenciación y secuencia consenso obtenida con la herramienta CAP de BioEdit.

7.2.4. Construcción de la cepa de *P. pastoris* KM71TanM

En la Figura 23A se muestra el gel de agarosa de la extracción de DNA plasmídico a mediana escala, después de lavar y concentrar con el dispositivo concentrador YM3 Millipore. El plásmido concentrado se encontró en condiciones íntegras y se obtuvo en una concentración de 2.875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, lo cual permitió continuar con la linealización del plásmido. En la Figura 23B se observa la integridad del plásmido después de linealizar y concentrar. De la digestión con *Sal* I se obtuvo un fragmento de 9,400 pb, correspondiente al vector pPIC9TanM linealizado. Además, el plásmido linealizado se obtuvo a una concentración de 640 $\text{ng}/\mu\text{L}$, lo cual fue suficiente para realizar la transformación de células competentes de *P. pastoris* KM71.

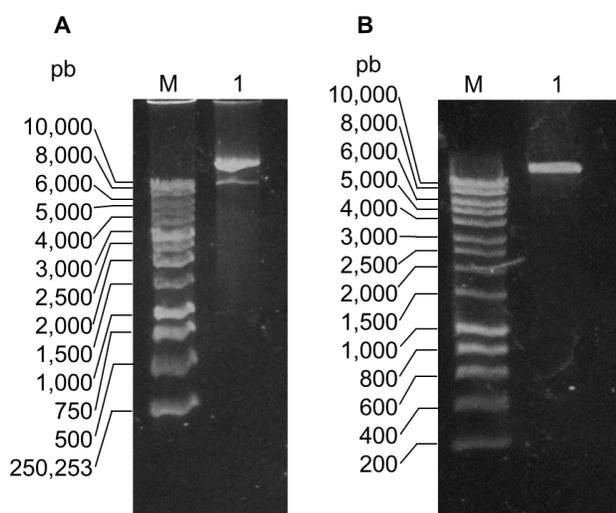


Figura 23. Geles de agarosa 0.8% del plásmido pPIC9TanM. A) Extracción de mediana escala, después de concentrar y filtrar en dispositivos concentradores YM3 Millipore. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 2: Plásmido pPIC9TanM. B) Linealización con *Sal* I, después de concentrar. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1: Plásmido pPIC9TanM linealizado.

En la Figura 24 se muestran los resultados de la transformación de *P. pastoris* KM71 con el plásmido pPIC9TanM. Los controles de viabilidad antes (Figura 24A) y después (Figura 24B) de electroporar presentaron crecimiento de colonias, indicando que las células competentes estaban activas. Por otro lado, el control negativo de la transformación (Figura 24C) no presentó crecimiento, con lo cual se confirmó que las

células competentes no tenían plásmidos integrados. La transformación de células de *P. pastoris* generó 84 clonas seleccionadas por prototrofia a histidina. Las clonas se distribuyeron en dos placas, una inoculada con volumen de 200 μ L (Figura 24D) que presentó 21 colonias y otra inoculada con volumen de 300 μ L (Figura 24E) que presentó 63 colonias. Cabe mencionar que se perdieron dos placas: una inoculada con 100 μ L (Figura 24F), debido a presencia de contaminación y una inoculada con 400 μ L (Figura 24G), debido a que la acumulación de colonias fue demasiado alta y no se obtuvieron colonias separadas.

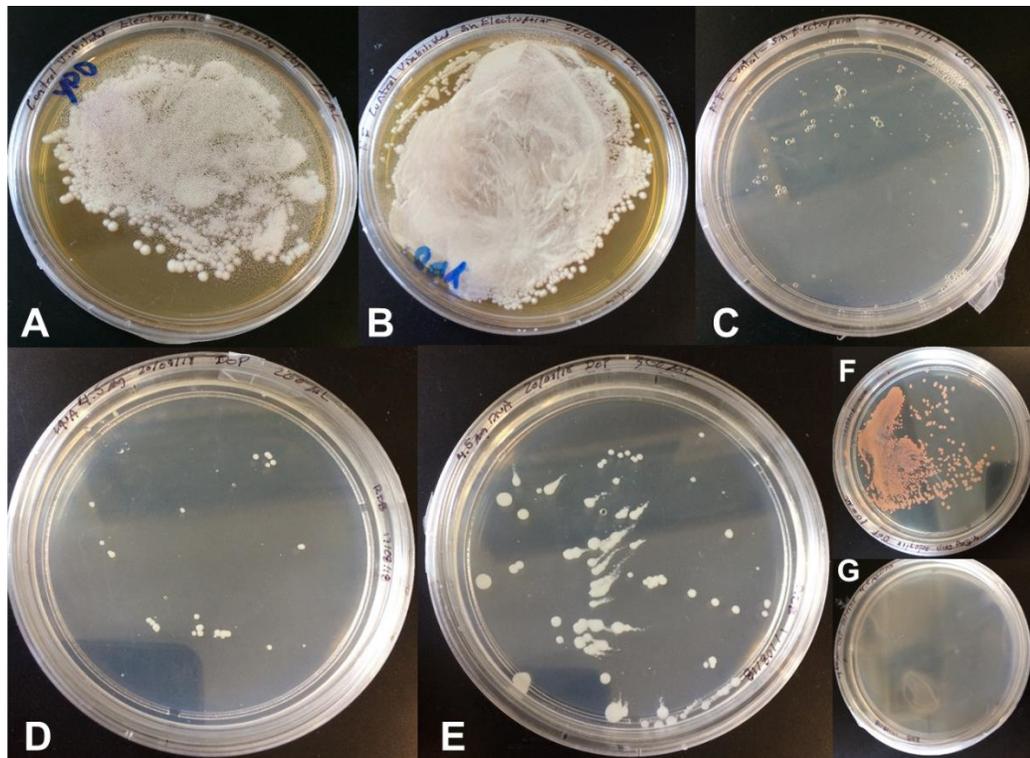


Figura 24. Placas de la transformación de células electrocompetentes de *P. pastoris* KM71 con el plásmido pPIC9TanM. A) Control de viabilidad antes de electroporar, B) control de viabilidad después de electroporar, C) control negativo de la transformación, D) células transformadas (200 μ L), E) Células transformadas (300 μ L), F) Células transformadas (100 μ L), G) Células transformadas (400 μ L).

7.2.5. Caracterización de la cepa de *P. pastoris* KM71TanM y KM71ANT

Dos colonias seleccionadas al azar (clona 57 y 59) resultantes de la transformación de *P. pastoris* con el plásmido pPIC9TanM, y las clonas 1 y 2 de *P. pastoris* KM71ANT se seleccionaron para realizar la caracterización por PCR.

En la Figura 25A se muestra el gel de agarosa de la extracción de DNA genómico de dos colonias seleccionadas al azar (clona 57 y 59) resultantes de la transformación de *P. pastoris* con el plásmido pPIC9TanM, y las clonas 1 y 2 de *P. pastoris* KM71ANT. La banda única mayor a 10,000 pb sin barrido indicó la integridad del DNA genómico para ser utilizado en la caracterización por PCR específico. Los DNAs de 4 clonas amplificaron por PCR específico un fragmento de 1,378 pb que confirmó la integración del cassette de expresión en el genoma de ambas levaduras (Figura 25B). Debido a que la diferencia entre ambas cepas es el cambio de un codón de arginina por uno de alanina, el tamaño de las secuencias de los fragmentos *TanM* y *ANT* es el mismo. Por ello, ambos fragmentos de 1,378 pb corresponden a la secuencia pre-pro del factor alfa (225 pb), y fragmentos de la secuencia del promotor *AOX1* (94 pb) y del fragmento *TanM* o *ANT* según corresponda (1,031 pb).

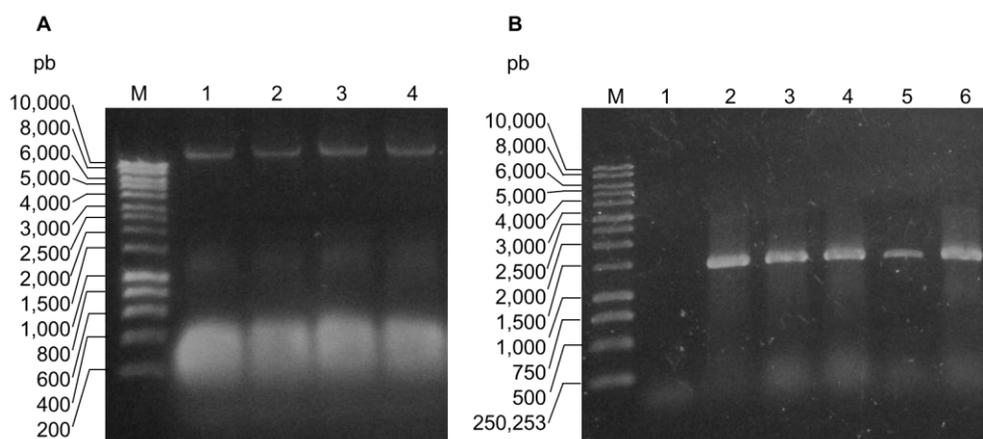


Figura 25. Geles de agarosa 0.8% de A) la extracción de DNA genómico de clonas de *P. pastoris* KM71TanM y KM71ANT. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1-2: KM71TanM clona 57 y 59, 3-4: KM71ANT clona 1 y 2. B) Caracterización por PCR de clonas de *P. pastoris* KM71TanM y KM71ANT. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1: Control negativo (agua), 2: Control positivo (pPIC9TanM), 3-4: KM71TanM clona 57 y 59, 5-6: KM71ANT clona 1 y 2.

7.3. Selección de una cepa de *P. pastoris* sobreproductora y producción de la tanasa de *A. niger* GH1 modificada

7.3.1. Determinación del rendimiento proteínas extracelulares/biomasa de clonas de *P. pastoris* KM71TanM

En la Figura 26 se muestra el crecimiento celular (DO_{600}) de las 84 clonas evaluadas de *P. pastoris* KM71TanM durante la etapa de inducción en metanol. El crecimiento de la población de clonas fue similar y no se observaron afecciones por la preparación de medios y condiciones de los cultivos a lo largo del tiempo que duró la evaluación de todas clonas. La población de clonas presentó una densidad celular inicial de 5.7 ± 0.27 y una densidad celular final de 9.57 ± 0.51 g de células secas/L.

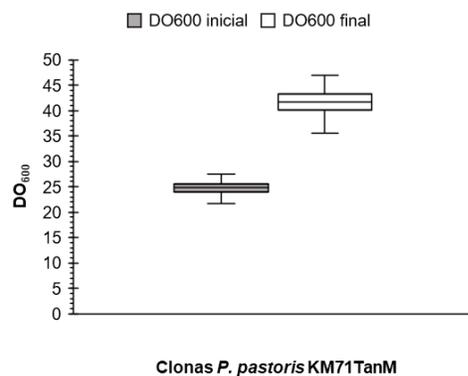


Figura 26. Crecimiento celular (DO_{600}) de las 84 clonas de *P. pastoris* KM71TanM durante la etapa de inducción en metanol.

La Figura 27 muestra la producción volumétrica de proteínas extracelulares de las 84 clonas de *P. pastoris* KM71TanM. El sobrenadante de los cultivos a las 48 h de inducción mostró concentraciones de proteínas extracelulares en un rango de 3.4 a 41.4 mg/L; lo que corresponde a un incremento de la producción volumétrica de 12.2 veces más de la clona de menor producción a la clona de mayor producción. Las 5 clonas de mayor producción volumétrica de proteínas extracelulares fueron la clona 83 (41.4 mg/L), la clona 4 (30.3 mg/L), la clona 18 (29.3 mg/L), la clona 22 (29.3 mg/L) y la clona 26 (27.7 mg/L). Por

otro lado, las clonas de menor producción de proteínas extracelulares fueron la clona 32 (7.6 mg/L) y la clona 31 (3.4 mg/L).

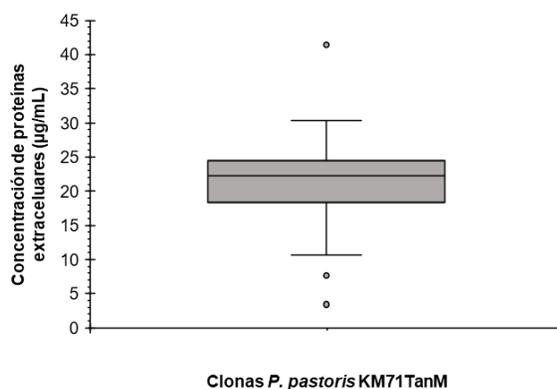


Figura 27. Concentración de proteínas extracelulares de las 84 clonas de *P. pastoris* KM71TanM a las 48 h de inducción del gen heterólogo.

La selección de la clona sobreproductora se determinó por el rendimiento de proteínas extracelulares/biomasa debido a que este parámetro permite visualizar la eficiencia de las células. En la Figura 28 se muestra el rendimiento proteínas extracelulares/biomasa de las 84 clonas de *P. pastoris* KM71TanM. Dicho rendimiento abarcó un rango de 0.4 a 4.3 mg de proteína/g de biomasa seca, lo que corresponde a un incremento de 10.8 veces más de la clona de menor producción a la clona de mayor producción. Además, 83 clonas (98.8%) de las 84 clonas evaluadas presentaron rendimiento proteína extracelular/biomasa menor que el 75% del valor de la clona con el mayor rendimiento. Las clonas de mayor rendimiento fueron la clona 83 (4.25 mg/g), la clona 54 (2.94 mg/g), la clona 70 (2.91 mg/g), la clona 4 (2.90 mg/g) y la clona 26 (2.89 mg/g). Por otro lado, las clonas de menor rendimiento fueron la clona 56 (1.19 mg/g), la clona 32 (0.84 mg/g) y la clona 31 (0.40 mg/g). Las primeras fueron seleccionadas para realizar cinéticas de producción de la tanasa recombinante a través de la determinación de la AVT a lo largo del tiempo de cultivo y la determinación del $Y_{p/x}$.

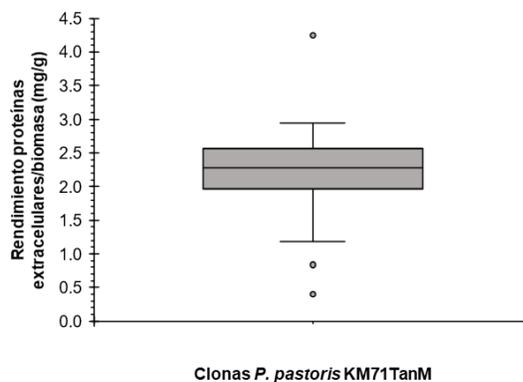


Figura 28. Rendimiento proteínas extracelulares/biomasa de las 84 clonas de *P. pastoris* KM71TanM a las 48 h de inducción del gen heterólogo

7.3.2. Determinación del rendimiento producto/biomasa ($Y_{x/p}$)

Las clonas seleccionadas de mayor rendimiento proteínas extracelulares/biomasa fueron las clonas 83, 54, 70, 4 y 26. Además se seleccionó una clona considerada como de rendimiento intermedio, que fue la clona 57 (2.31 mg/g), y una clona de bajo rendimiento, la clona 56 (1.19 mg/g). El crecimiento celular (Figura 29) de las 7 clonas mencionadas repitió el comportamiento observado durante los cultivos de selección de las 84 clonas. Las 7 clonas crecieron de manera uniforme, presentando una densidad celular inicial de 5.7 ± 0.13 y una densidad celular final de 9.8 ± 0.30 g de células secas/L.

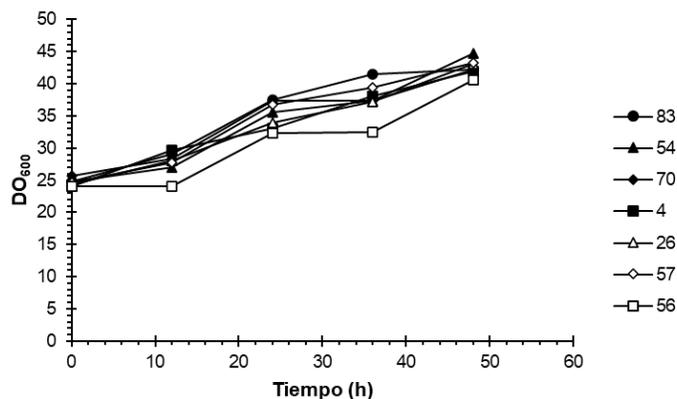


Figura 29. Crecimiento celular de las clonas de *P. pastoris* KM71TanM seleccionadas como de mayor, medio y menor rendimiento proteínas extracelulares /biomasa.

Los rendimientos proteínas extracelulares/biomasa de las 7 clonas fueron similares a los obtenidos anteriormente. La clona de mayor rendimiento continuó siendo la clona 83 (4.17 mg/g); mientras que el resto de las clonas 83, 54, 70, 4, 26, 57 y 56 obtuvieron rendimientos de 2.99, 2.82, 2.81, 2.80, 2.35 y 1.46 mg/g, respectivamente. Por otro lado, en la Figura 30 se muestra la cinética de producción de tanasa evaluada a través de la actividad enzimática volumétrica de tanasa a lo largo del cultivo de las 7 clonas. La actividad volumétrica de tanasa disminuyó conforme avanzó el tiempo de inducción con metanol. Sin embargo, la mayor actividad volumétrica se presentó a las 12 h de inducción, hasta llegar a cero a las 48 h de inducción con metanol.

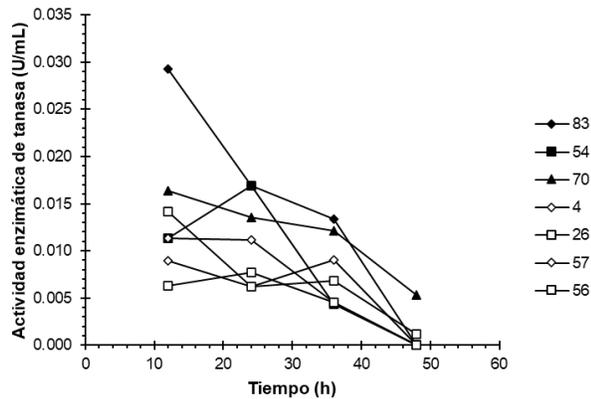


Figura 30. Cinética de actividad volumétrica de tanasa de las clonas de *P. pastoris* KM71TanM seleccionadas como de mayor, medio y menor rendimiento proteínas extracelulares /biomasa.

Debido a que la actividad volumétrica disminuyó conforme al tiempo de inducción con metanol, se consideró el cálculo del rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$) a las 12 h de inducción con metanol. La Figura 31 muestra el $Y_{p/x}$ a las 12 h de inducción con metanol. Este parámetro junto con el rendimiento proteínas extracelulares/biomasa a las 48 h de inducción fueron los determinantes para elegir la clona sobreproductora. Por lo que la clona seleccionada fue la 83, debido a que presentó el mayor rendimiento proteínas extracelulares/biomasa (4.17 mg/g) y mayor $Y_{p/x}$ (3.39 U/g).

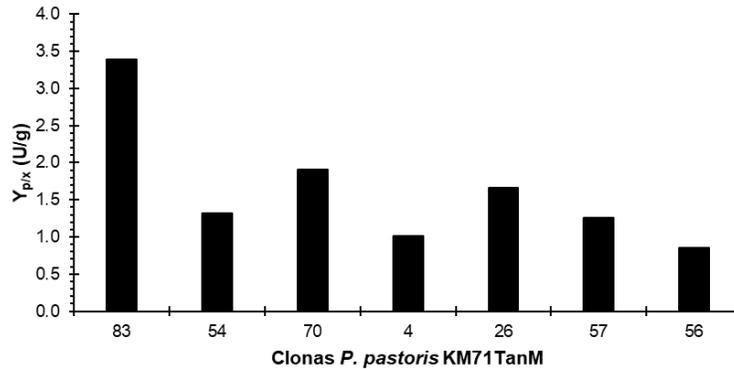


Figura 31. Rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$) a las 12 h de inducción de las clonas de *P. pastoris* KM71TanM seleccionadas como de mayor, medio y menor rendimiento proteínas extracelulares/biomasa.

7.3.3. Caracterización por PCR de la clona sobreproductora de *P. pastoris* KM71TanM

En la Figura 32A se muestra la extracción de DNA genómico de la clona sobreproductora de *P. pastoris* KM71TanM. El DNA genómico obtenido estaba en condiciones para ser utilizado en la caracterización por PCR. Posteriormente, en la Figura 32B se muestra que la clona 83 tiene el plásmido pPIC9TanM integrado en el genoma de la levadura. De la PCR se obtuvo una banda de 1,378 pb, la cual corresponde a la secuencia pre-pro del factor alfa (225 pb), y fragmentos de la secuencia del promotor *AOX1* (94 pb) y del fragmento *TanM* (1,031 pb).

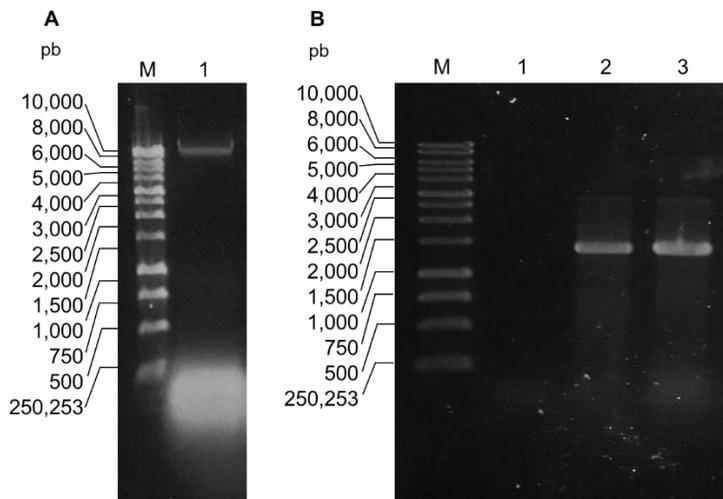


Figura 32. Geles de agarosa 0.8% de A) la extracción de DNA genómico de la cepa sobreproductora *P. pastoris* KM71TanM-83. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1: KM71TanM clona 83. B) Caracterización por PCR de la cepa sobreproductora *P. pastoris* KM71TanM-83. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1: Control negativo (agua), 2: Control positivo (pPIC9TanM), 3: KM71TanM clona 83.

7.3.4. Diferenciación por PCR de la clona sobreproductora de *P. pastoris* KM71TanM con la clona KM71ANT

En la Figura 33 se muestra el gel de agarosa resultante de la diferenciación entre la cepa de *P. pastoris* KM71TanM y KM71ANT. Los oligonucleótidos del control positivo (5'TanCgs y 3' TanNot) presentaron la banda de 1,360 pb para ambas clonas (carriles 2 y 3). Mientras que al utilizarse los oligonucleótidos diferenciadores (5'TanCgs y 3'TANGSA) se presentaron diferentes resultados. La cepa KM71TanM no presentó la banda de 1,360 pb (carril 5), en cambio la cepa KM71ANT sí presentó dicha banda (carril 6). Con estos resultados se confirma que durante el proceso de construcción de la cepa KM71TanM no hubo mezcla con la cepa KM71ANT.

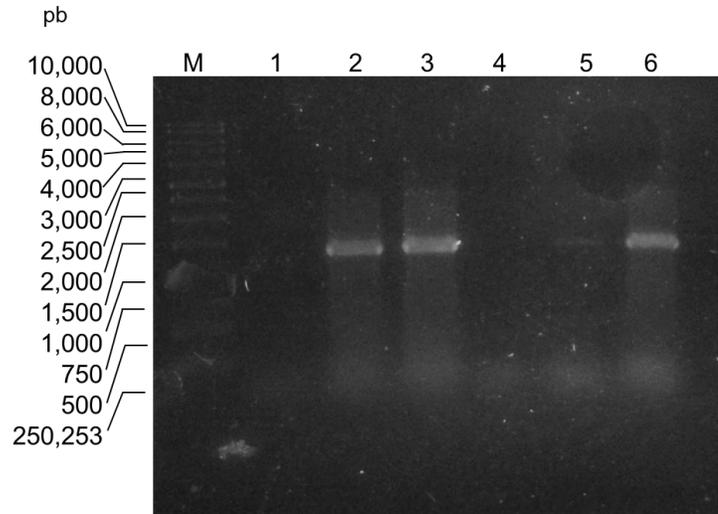


Figura 33. Gel de agarosa 0.8% de la PCR para diferenciar entre la clona KM71TanM de la clona KM71ANT. M: Marcador de tamaño molecular 1 kb, 1: Control negativo (agua) con los oligonucleótidos 5'TanCgs y 3'TanNot, 2: KM71TanM, 3: KM71ANT, 4: Control negativo (agua) con los oligonucleótidos 5'TanCgs y 3'TANGSA, 5: KM71TanM, 6: KM71ANT.

7.3.5. Caracterización de la cepa sobreproductora de *P. pastoris* KM71TanM en cultivos en matraz con adición de metanol cada 12 y 24 h

El crecimiento celular de la clona KM71TanM-83 fue mayor cuando se realizó la adición de metanol cada 12 h (Figura 34). Sin embargo, la producción de proteínas extracelulares fue mayor cuando se añadió metanol cada 24 h (Figura 34). Por esta razón el rendimiento proteínas extracelulares/biomasa fue mayor (5.18 mg/g) al añadir metanol cada 24 h que cuando se añadió metanol cada 12 h (3.94 mg/g).

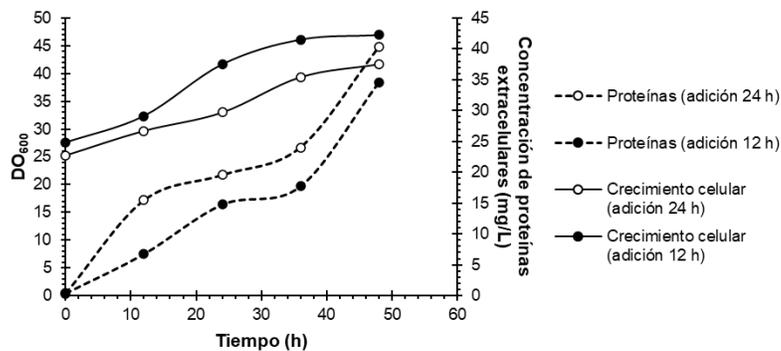


Figura 34. Cinética de crecimiento y concentración de proteínas extracelulares de la clona KM71TanM-83 con adición de metanol cada 12 y 24 h.

Además, a las 24 h de inducción, la actividad volumétrica aumentó de 0.017 a 3.6 U/mL y el $Y_{p/x}$ aumentó de 1.96 a 570.6 U/g cuando la adición de metanol se realizó cada 24 h. Debido a que los rendimientos proteínas extracelulares/biomasa y producto/biomasa, aumentaron con la adición de metanol cada 24 h, se decidió continuar evaluando la cepa sobreproductora bajo estas condiciones.

7.3.6. Comparación de la clona sobreproductora de *P. pastoris* KM71TanM contra la clona KM71ANT

El crecimiento celular de las clonas KM71TanM y KM71ANT fueron similares (Figura 35). Ambas clonas llevaron su crecimiento de una DO_{600} inicial de 25 a una DO_{600} final de 34-36. Por otro lado, se observaron diferencias en la producción de proteínas extracelulares (Figura 35). La clona KM71ANT obtuvo mayor producción de proteínas a las 72 h (47.59 mg/L) que la clona KM71TanM (30.82 mg/L).

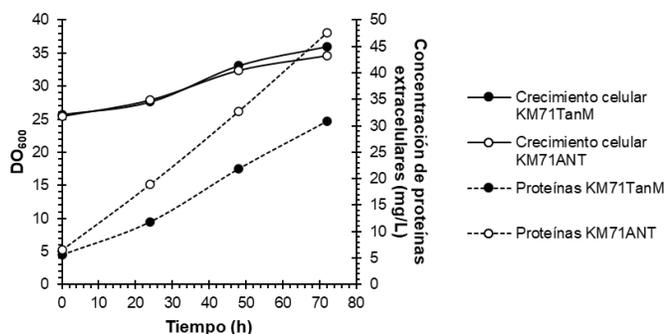


Figura 35. Cinética de crecimiento y producción de proteínas de las cepas KM71TanM y KM71ANT.

En la Figura 36 se muestra la cinética de actividad volumétrica de las clonas de KM71TanM y KM71ANT; ambas clonas presentaron un comportamiento de oscilación en la actividad volumétrica. El cultivo de la clona KM71TanM disminuyó la actividad volumétrica de las 24 h a las 48 h de inducción y aumentó a las 72 h. Sin embargo, el cultivo de la clona KM71ANT aumentó la actividad volumétrica de las 24 h a las 48 h, y disminuyó a las 72 h. Este comportamiento indicó una posible degradación de la enzima

a lo largo del cultivo. Por otro lado, el pH del medio de cultivo disminuyó de 6.0 a 5.0 durante las 72 h de inducción con metanol. La disminución del pH se correlacionó con el aumento de la actividad volumétrica, por lo que podría ser un factor que inhiba la posible degradación de la tanasa producida.

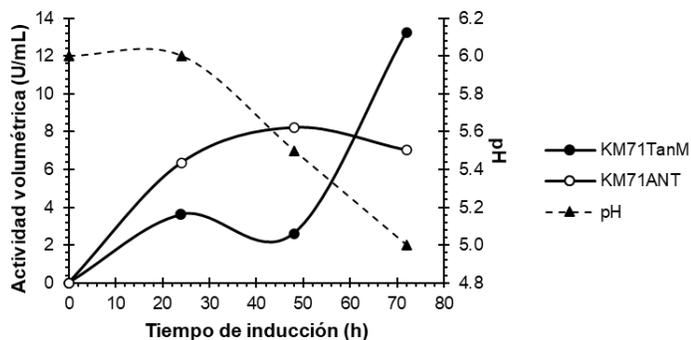


Figura 36. Cinética de actividad volumétrica y pH de los cultivos de las cepas KM71TanM y ANT

7.3.7. Análisis SDS-PAGE y N-desglicosilación del concentrado enzimático del cultivo de la clona de *P. pastoris* KM71TanM sobreproductora y KM71ANT

En la Figura 37 se muestra el análisis por SDS-PAGE y el tratamiento de N-desglicosilación con Endo H de las proteínas extracelulares de cepas KM71TanM y KM71ANT a las 24 y 48 h de inducción con metanol. El análisis de la tanasa M a las 24 h de inducción (Figura 37A) reveló una banda de 80.8 kDa como la proteína extracelular de mayor concentración, la cual se desplazó a una masa molecular aparente de 65.4 kDa, después del tratamiento de N-desglicosilación. Dicho valor es muy cercano al tamaño molecular teórico de la tanasa M de 61.3 kDa. Con este resultado se confirmó la remoción del sitio de reconocimiento de la proteasa Kex2. Sin embargo, también se observaron bandas adicionales a la tanasa M, con masas moleculares de 71.6, 55.1, 48.8 y 40.7 que migraron a masas moleculares de 54.0, 32.7 y 24.1 kDa después de la N-desglicosilación. Por otro lado, el análisis de la tanasa ANT a las 24 h de inducción mostró que la enzima se corta en el sitio de reconocimiento de Kex2, por lo que se obtuvieron dos bandas de

45.5 y 39.0 kDa que migraron a proteínas de tamaño molecular aparente de 31.5 y 24.0 kDa después de la N-desglicosilación.

En el análisis a las 48 h (Figura 37B) se observó que la banda de la tanasa M y las bandas adicionales se mantuvieron. En cambio, para la tanasa ANT se agregó una banda adicional a las 48 h de inducción de 34.2 kDa que migró a una masa molecular aparente de 22.8 kDa después de la N-desglicosilación. La presencia de las bandas adicionales, agregado al incremento del número de bandas de las 24 h a 48 h de inducción, sugirió la degradación de las proteínas extracelulares en el cultivo en matraz.

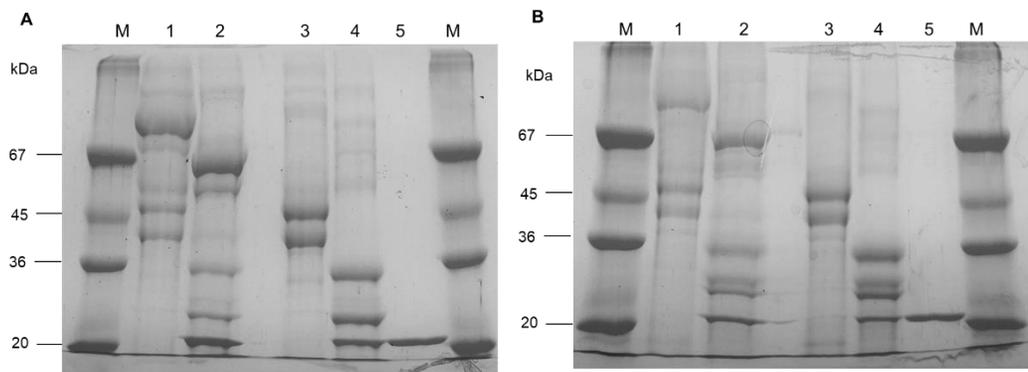


Figura 37. Geles de poliacrilamida al 10% de los tratamientos de N-desglicosilación de los cultivos de KM71TanM y KM71ANT a las A) 24 h y B) 48 h de inducción. M: Marcador de masa molecular, 1: Tanasa M sin desglicosilar, 2: Tanasa M desglicosilada, 3: Tanasa ANT sin desglicosilar, 4: Tanasa ANT desglicosilada, 5: EndoH.

7.3.8. Cultivo en matraz con inducción en medio BMM-alanina de la clona de *P. pastoris* KM71TanM sobreproductora

Los cultivos en medio BMM-alanina de las cepas de *P. pastoris* KM71TanM sobreproductora y KM71ANT mostraron un incremento en la concentración de proteína extracelular de 2.82 ± 0.32 a 42.01 ± 1.02 mg/L y desde 3.60 ± 0.15 a 65.06 ± 2.67 mg/L, respectivamente. Además, la actividad volumétrica de tanasa mostró un incremento durante toda la etapa de inducción hasta alcanzar 9.75 ± 0.40 U/mL y 1.99 ± 0.87 U/ml

para la cepa de KM71TanM y KM71ANT, respectivamente. El pH del medio BMM-alanina se mantuvo cercano a pH 5.0 durante las 72 h de inducción.

El análisis SDS-PAGE del sobrenadante de los cultivos a las 72 h de inducción tratado con y sin desglucosidasa Endo H, mostró resultados parecidos a los cultivos con BMM sin alanina a pH 6.0 (Figura 38), con la diferencia que las bandas de menor masa molecular que la de la proteína recombinante se presentaron en menor intensidad, lo cual ocurrió para ambas tanasas.

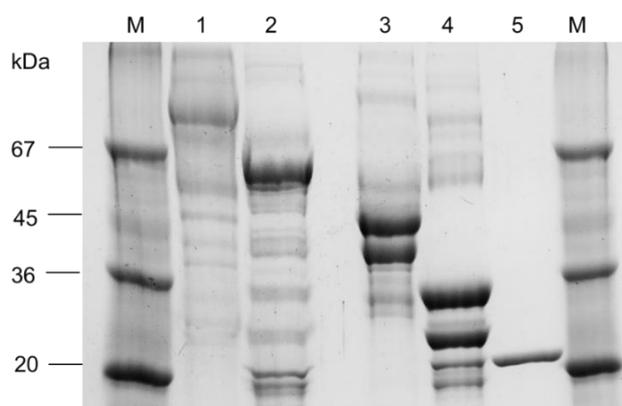


Figura 38. Gel de poliacrilamida al 10% del tratamiento de N-desglucosilación de los cultivos de KM71TanM y KM71ANT en medio BMM-alanina a pH 5.0 a las 72 h de inducción. M: Marcador de masa molecular, 1: Tanasa M sin desglucosilar, 2: Tanasa M desglucosilada, 3: Tanasa ANT sin desglucosilar, 4: Tanasa ANT desglucosilada, 5: EndoH.

7.3.9. Cultivo en biorreactor de la clona de *P. pastoris* KM71TanM sobreproductora

Debido a la degradación de las proteínas extracelulares observada en los cultivos en matraz, se decidió realizar los cultivos en biorreactor para tener mayor control de las condiciones de cultivo, en especial en el biorreactor se mantuvo el pH a un valor constante de 5.0. Al final de la etapa de lote alimentado con glicerol se alcanzó una densidad celular (DC) de 49.3 g/L. Posteriormente, en la etapa de inducción, la biomasa incrementó exponencialmente ($r^2=0.993$) con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.020 h^{-1} , alcanzando una concentración de biomasa de 128.7 g/L (Figura 39). El cultivo se llevó

a cabo en condiciones no limitantes de fuente de carbono, por lo que el consumo de metanol en la etapa de inducción aumentó según un polinomio de segundo orden ($r^2=0.993$). Por otro lado, la producción de tanasa extracelular también aumentó siguiendo un polinomio de segundo orden ($r^2=0.998$) sin una disminución de la actividad de tanasa a lo largo de la etapa de inducción. A las 74 h de inducción se obtuvieron 591,380.8 U de tanasa total y se alcanzó una producción volumétrica de 172,527 U/L o 424.46 mg/L en el medio de cultivo (Figura 39). Los valores de $Y_{x/s}$, $Y_{p/x}$ y $Y_{p/s}$ durante la etapa de inducción fueron de 0.334 g células secas/g metanol, 4.12 mg tanasa/g célula seca y 1.38 mg tanasa/g metanol, respectivamente. Además, los valores de q_s y q_p obtenidos fueron de 0.0607 g/g h y 0.084 mg/g h, respectivamente. Finalmente, la productividad del cultivo fue de 18.6 mg/h y la productividad volumétrica fue de 2800.5 U/L h o 6.89 mg/L h.

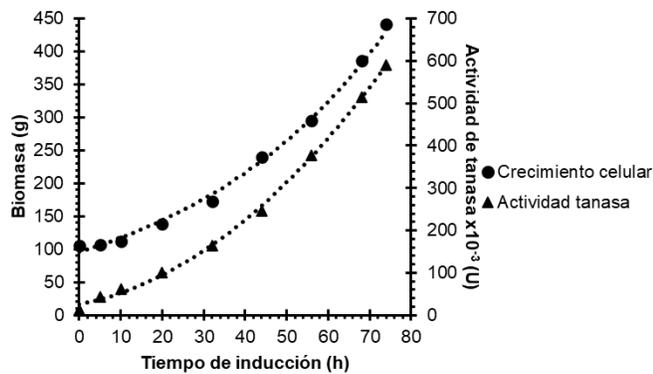


Figura 39. Cinética de crecimiento celular y actividad de tanasa extracelular del cultivo en biorreactor de la clona sobreproductora de *P. pastoris* KM71TanM.

Por otro lado, el análisis SDS-PAGE del sobrenadante a las 74 h de inducción, tratado con y sin desglucosidasa Endo H mostró solo una banda de 80.8 kDa, la cual migró a una masa molecular aparente de 65 kDa después de la N-desglucosilación (Figura 40). No se observaron bandas de menor masa molecular como ocurrió en los cultivos en matraz.

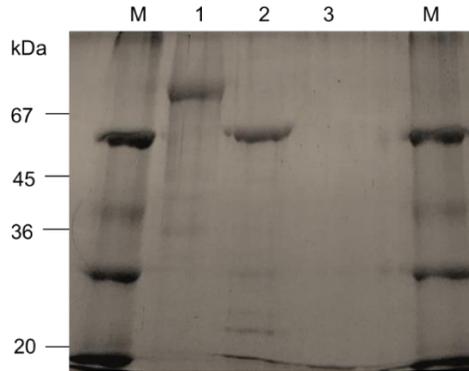


Figura 40. Gel de poliacrilamida al 10% del tratamiento de N-desglicosilación del sobrenadante a las 74 h de inducción del cultivo en biorreactor de la cepa KM71TanM. M: Marcador de masa molecular, 1: Tanasa M sin desglicosilar, 2: Tanasa M desglicosilada, 3: Endo H.

7.4. Caracterización bioquímica de la tanasa de *A. niger* GH1 modificada

7.4.1. Purificación de la tanasa M y ANT producida en matraz con inducción en medio BMM-alanina

En la tabla 32 y 33 se muestran la concentración de proteínas, porcentaje de recuperación y las actividades específicas de las etapas de purificación del sobrenadante del cultivo matraz con inducción en medio BMM-alanina a las 74 h de inducción de la cepa KM71TanM y KM71ANT, respectivamente. Las fracciones 3 y 4 de ambos cultivos no fueron detectables para concentración de proteínas, por lo que no se realizó la determinación de actividad de tanasa. Por otro lado, las fracciones 1 y 2 de ambos cultivos si presentaron actividad de tanasa.

Tabla 32. Concentración de proteínas, porcentaje de recuperación y actividad específica (AE) de las etapas de purificación del sobrenadante a las 74 h de inducción del cultivo en matraz con medio BMM-alanina de la cepa KM71TanM.

Etapa	Concentración de proteínas (mg/L)	% de recuperación	AE a 30°C pH 5.0 (U/mL)
Sobrenadante	36.25	100	132.9
Concentrado	576.68	72.9	203
Cromatografía de intercambio aniónico			
Fracción 1	97.03	129.1	512.9
Fracción 2	17.54	2.64	145.2

Tabla 33. Concentración de proteínas, porcentaje de recuperación y actividad específica (AE) de las etapas de purificación del sobrenadante a las 74 h de inducción del cultivo en matraz con medio BMM-alanina de la cepa KM71ANT.

Etapa	Concentración de proteínas (mg/L)	% de recuperación	AE a 30°C pH 5.0 (U/mL)
Sobrenadante	57.67	100	53.7
Concentrado	2857.86	106.7	77.1
Cromatografía de intercambio aniónico			
Fracción 1	83.92	24.4	32.8
Fracción 2	31.50	0.7	5.8

Los cromatogramas de intercambio aniónico para las dos preparaciones de tanasa obtenidas de los cultivos en medio BMM-alanina mostraron cuatro picos con actividad de tanasa; los cuales eluyeron a 0.18, 0.30, 0.50 y 0.75 M NaCl, respectivamente (Figura 41). En ambos casos, la primera fracción presentó mayor actividad de tanasa. Además, el análisis de SDS-PAGE de dichas fracciones mostró bandas correspondientes a la proteína mutada de cadena sencilla y a la proteína no mutada como una proteína de doble cadena (Figura 42).

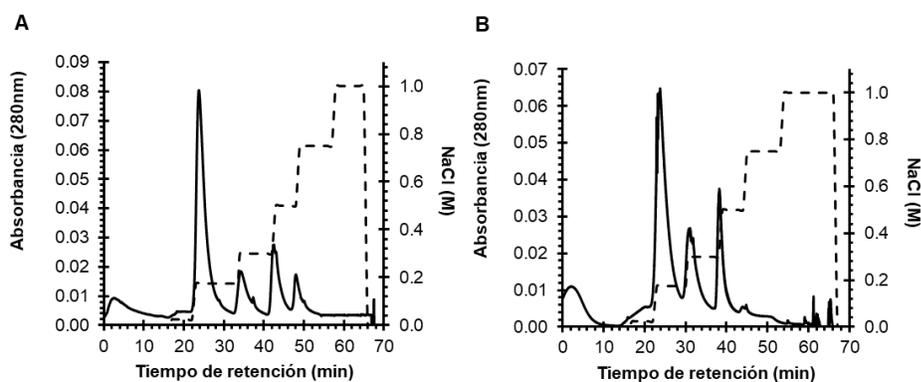


Figura 41. Cromatogramas de la purificación por cromatografía de intercambio aniónico del sobrenadante de los cultivos de A) KM71TanM y B) KM71ANT en medio BMM-alanina a pH 5.0 a las 72 h de inducción después del cambio de buffer a Tris-HCl 100 mM pH 7.0

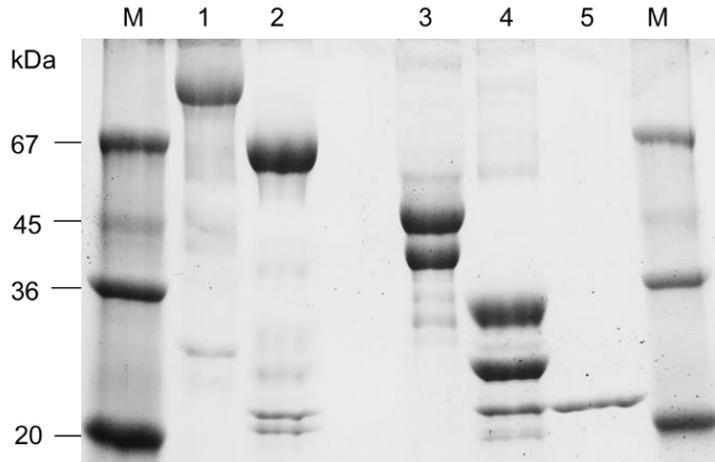


Figura 42. Gel de poliacrilamida al 10% del tratamiento de N-desglicosilación de la fracción eluida a 0.18 M NaCl de los cultivos de KM71TanM y KM71ANT en medio BMM-alanina a pH 5.0 a las 72 h de inducción. M: Marcador de masa molecular, 1: Tanasa M sin desglicosilar, 2: Tanasa M desglicosilada, 3: Tanasa ANT sin desglicosilar, 4: Tanasa ANT desglicosilada, 5: EndoH.

7.4.2. Actividad específica y constantes cinéticas de las tanasa M y ANT producidas en matraz con inducción en medio BMM-alanina

Las fracciones 1 de los cultivos en matraz con inducción en medio BMM-alanina de las cepas KM71TanM y KM71ANT presentaron una actividad específica de 408 U/mg y 38 U/mg, respectivamente. Ambas tanasas siguieron una cinética típica de Michaelis-Menten, con $R^2 = 0.959$ y 0.963 (Figura 43), para la tanasa de una cadena y doble cadena, respectivamente. Los valores de K_m , V_{max} , k_{cat} y k_{cat}/K_m fueron de 0.13 ± 0.03 mM, 3.60 ± 0.13 μ M/min, 417 s^{-1} y $3,094$ $mM^{-1}s^{-1}$ para la tanasa M y de 0.47 ± 0.12 mM, 1.58 ± 0.11 μ M/min, 39 s^{-1} y 82 $mM^{-1}s^{-1}$ para la tanasa ANT (Tabla 34).

Tabla 34. Fuentes microbianas, huésped microbiano para la producción de la enzima, número de cadenas (#C), residuo en el lado carboxilo de la serina de la triada catalítica (Ser-X), constantes cinéticas, actividad específica (AE) y pH y temperatura para la determinación de la actividad de tanasa utilizando galato de metilo como sustrato de diferentes tanasas de *Aspergillus*.

Fuente Microbiana	Huésped	# C	Ser-X	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)	AE (U/mg) ^a	pH	T (°C)	Referencias
<i>A. oryzae</i> ^b	<i>P. pastoris</i>	1	Asp	nd	nd	nd	410 ^c /256	4	30	Koseki et al. 2017
<i>A. niger</i> GH1	<i>P. pastoris</i>	1	Asp	0.13	417	3,094	408/255 ^d	5	30	Este trabajo
<i>A. niger</i> GH1	Nativa	1	Asp	0.78	270 ^e	346 ^e	264/165 ^d	7	30	Renovato et al. 2011
<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> SH-2	1	Glu	nd	nd	nd	75 ^c /47	7	40	Dong et al. 2021
<i>A. oryzae</i>	<i>P. pastoris</i>	1	Glu	1.11	28	25	64 ^c /40	6	30	Koseki et al. 2018
<i>A. oryzae</i>	<i>P. pastoris</i>	2	Asp	1.97	60	31	51 ^c /32	5	30	Mizuno et al. 2014
<i>A. niger</i> GH1	<i>P. pastoris</i>	2	Asp	0.47	39	82	38/24 ^d	5	30	Este trabajo

Los datos de tanasa se ordenaron de menor a mayor valor de actividad específica.

nd: no determinado.

^a Valores calculados a partir del método de Bradford/BCA para la concentración de proteínas.

^b Siete residuos eliminados, incluyendo dos sitios Kex2.

^c Estimado por el método de BCA para la concentración de proteínas.

^d Estimado por el método de Bradford para la concentración de proteínas.

^e Estimado a partir de los datos de Renovato et al. 2011.

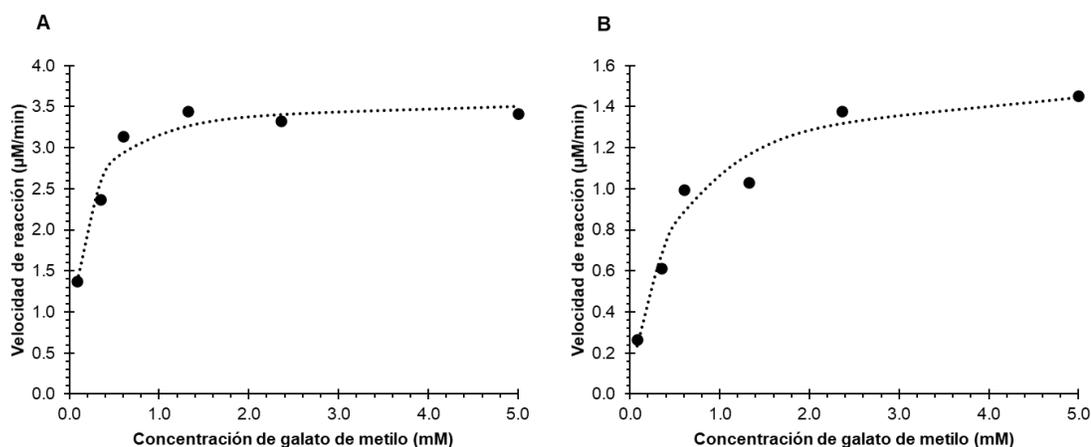


Figura 43. Cinéticas Michaelis-Menten para A) la tanasa M y B) la tanasa ANT utilizando galato de metilo como sustrato. Los puntos representan la media de tres ensayos enzimáticos independientes, y la línea punteada representa los mínimos cuadrados no lineales que mejor se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten.

7.4.3. Purificación de la tanasa M producida a nivel de biorreactor

En la tabla 35 se muestran la concentración de proteínas, porcentaje de recuperación y las actividades específicas de las etapas de purificación del sobrenadante del cultivo en biorreactor a las 74 h de inducción. En la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, se detectaron cuatro picos (Figura 44) a 0.018, 0.030, 0.050 y 0.075 M NaCl, respectivamente. Las cuatro fracciones recogidas presentaron actividad de tanasa en una proporción 552:37:11:1.

Tabla 35. Concentración de proteínas, porcentaje de recuperación y actividad específica (AE) de las etapas de purificación del sobrenadante a las 74 h de inducción del cultivo en biorreactor.

Etapa	Concentración de proteínas (mg/L)	% de recuperación	AE a 30°C pH 5.0 (U/mL)	AE a 20 °C pH 5.0 (U/mL)
Sobrenadante	984.40	100	323.5	592.52
Concentrado	4297.87	81.4	201.0	368.15
Cromatografía de intercambio aniónico				
Fracción 1	328.72	42.0	406.5	745.9
Fracción 2	53.62	2.8	276.2	506.8
Fracción 3	37.52	0.9	103.9	190.6
Fracción 4	5.78	0.1	83.7	153.6

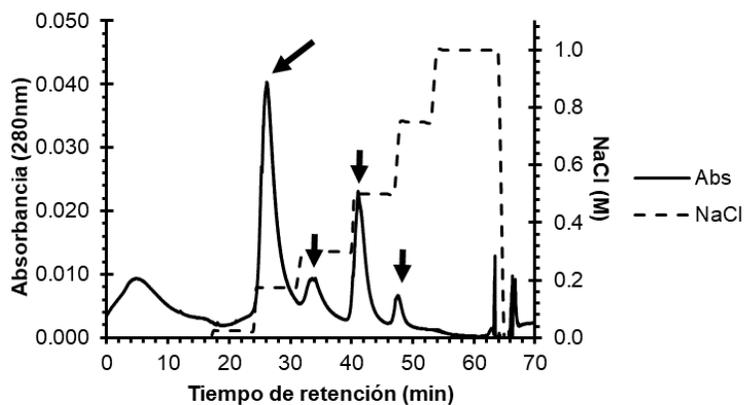


Figura 44. Cromatograma de la purificación por cromatografía de intercambio aniónico del sobrenadante del cultivo en biorreactor a las 74 h de inducción después del cambio de buffer a Tris-HCl 100 mM pH 7.0

En la Figura 45 se muestra el análisis de SDS-PAGE para la primera y segunda fracción con actividad de tanasa. En ambas fracciones se observó la banda de 80.8 kDa, la cual también migró hacia una masa molecular aparente de 65.4 kDa después de la N-desglicosilación con Endo H.

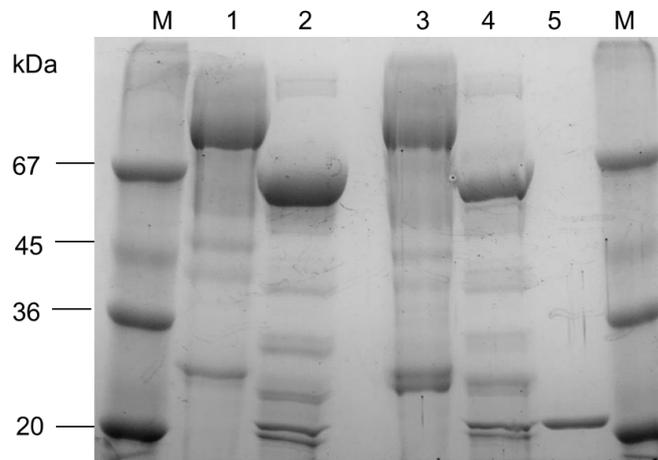


Figura 45. Gel de poliacrilamida al 10% del tratamiento de N-desglicosilación de las fracciones recuperadas en la cromatografía de intercambio aniónico del cultivo en biorreactor de KM71TanM. M: Marcador de masa molecular, 1: Fracción eluida a 0.18 M NaCl sin desglicosilar, 2: Fracción eluida a 0.18 M NaCl desglicosilada, 3: Fracción eluida a 0.30 M NaCl sin desglicosilar, 4: Fracción eluida a 0.18 M NaCl desglicosilada, 5: EndoH.

7.4.4. Determinación de la relación entre la concentración de proteínas de tanasa por el método de Bradford y BCA

En la figura 46 se graficaron los datos obtenidos de concentración de proteínas por el método de BCA contra el método de Bradford. La relación entre ambos métodos para las proteínas de tanasa se obtuvieron a partir de la pendiente de la recta, que en este caso fue un factor de 1.6. Por lo que la concentración de proteínas de tanasa obtenida por el método de BCA es 1.6 veces mayor que la concentración determinada por el método de Bradford.

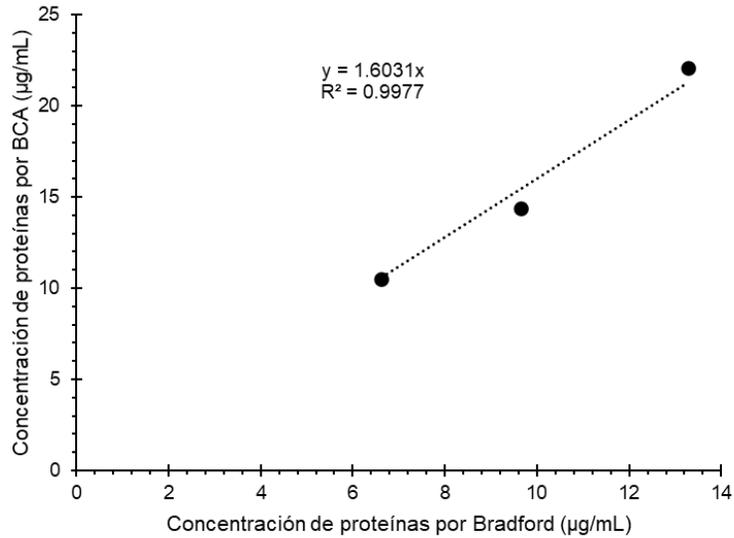


Figura 46. Relación entre la concentración de proteínas de tanasa por el método de Bradford y BCA. Los puntos representan la media de tres determinaciones de proteínas independientes.

7.4.5. Efecto del pH en la actividad enzimática de la tanasa M producida a nivel de biorreactor

La tanasa M obtenida en la fracción 1 de la cromatografía por intercambio aniónico fue la fracción de mayor actividad específica, por lo que se utilizó para la caracterización bioquímica. En la Figura 47 se muestra el comportamiento de la enzima a los diferentes valores de pH. La tanasa M mantuvo más del 40% de su máxima actividad en el intervalo de pH 2.5-9.0, y mantuvo más del 80% del máximo de actividad enzimática en un rango de pH 5.0-6.0. El pH óptimo de la tanasa M fue de 5.0.

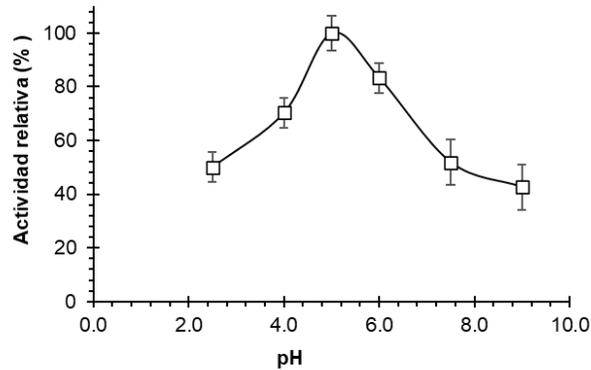


Figura 47. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la tanasa M a 30°C. Los puntos representan la media de tres ensayos enzimáticos independientes.

7.4.6. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la tanasa M producida a nivel de biorreactor

En la Figura 48 se muestra el comportamiento de la enzima en las diferentes temperaturas, manteniendo pH 5.0 constante. La tanasa M mostró actividad enzimática en un amplio rango de temperatura (10-60°C) con más del 20% de su máxima actividad enzimática, mientras que en un rango de 20-60°C mantuvo más del 50% de su máxima actividad enzimática. Además, en la Figura 48 se observan dos picos de máxima actividad enzimática, uno a 20°C que corresponde a la temperatura óptima para la tanasa M, y otro a 50°C con una actividad enzimática del 60%.

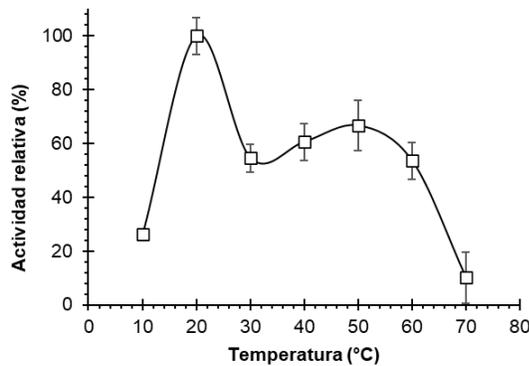


Figura 48. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la tanasa M a pH 5.0. Los puntos representan la media de tres ensayos enzimáticos independientes

7.4.7. Actividad residual de la tanasa M producida a nivel de biorreactor

En la Figura 49 se muestra la actividad residual de la tanasa M almacenada a 4 y 30°C a pH 5.0. La actividad residual en los ensayos de estabilidad siguió una cinética de primer orden con vida media de 58 y 4 días a 4 y 30°C, respectivamente, disminuyendo a 96.36 y 43.64% después de 120 h. Además, la tanasa M mantuvo más del 90% de su máxima actividad enzimática después de 1 mes almacenada a 4°C.

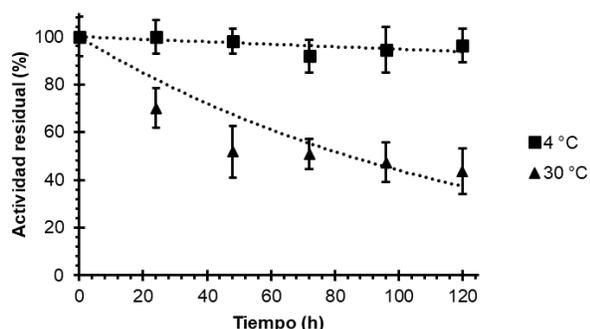


Figura 49. Actividad residual de la tanasa M a pH 5.0 almacenada a 4 y 30°C. Los puntos representan la media de tres ensayos enzimáticos independientes.

7.4.8. Comparación del modelo molecular y análisis de acoplamiento molecular de las tanasa M y ANT

El servidor SWISS-MODEL construyó un modelo molecular completo para la tanasa M de una cadena y la tanasa ANT de doble cadena, utilizando como molde a la estructura de la tanasa de *A. niger* (PDB:7K4O), recientemente descrita (Dong et al. 2021). Esta tanasa presenta una identidad de secuencia del 48% con la secuencia de la tanasa M y ANT, por lo que resultó ser un molde adecuado para la construcción de los modelos moleculares mediante modelamiento por homología (Tress 2013). En ambas tanasas se predijeron 5 probables puentes disulfuro: Cys26-Cys72, Cys195-Cys495, Cys249-Cys295, Cys262-Cys279, y Cys543-Cys559.

La energía total de las estructuras refinadas con el servidor de minimización de energía YASARA fue -78,557 (puntaje -0.71) y -78,645 (puntaje -0.72) kcal/mol para la tanasa M

y la tanasa ANT, respectivamente. Antes de la minimización de la energía, la energía total fue de 60,502 y $5.69 \cdot 10^{16}$ kcal/mol para cada una de las estructuras de tanasa. La similitud en las energías totales después de la minimización de energía aseguró que los modelos moleculares de ambas tanasas después de la minimización de la energía fueron correctos.

En la Figura 50 se muestra la superposición de la estructura refinada de la tanasa M y la tanasa ANT. La superposición de las estructuras refinadas mostró una alta similitud estructural (RMSD 3.42 Å), con un plegamiento típico de la feruloil esterasa, conteniendo dos dominios estructurales: un dominio hidrolasa α/β , que constituye el dominio catalítico y un dominio tapa, que cubre al sitio catalítico (Fuentes-Garibay et al. 2015; Suzuki et al. 2014). Sin embargo, la similitud estructural de los dominios catalíticos (RMSD 0.51 Å) fue mayor que la similitud entre los dominios lid (RMSD 5.73 Å) de ambas tanasas.

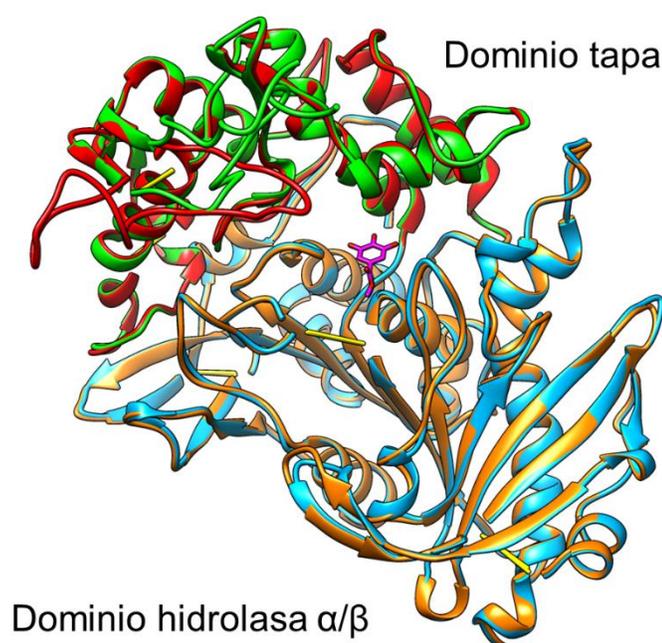


Figura 50. Superposición de la tanasa M y la tanasa ANT. Los dominios tapa de la tanasa M y ANT se muestran en colores rojo y verde, respectivamente. Los dominios hidrolasa α/β se muestran en color naranja y azul cielo, respectivamente.

La principal diferencia estructural entre los dominios de tapa fue alrededor del sitio de reconocimiento de Kex2 mutado y no mutado, donde un probable existe un bucle flexible en la superficie de la proteína, formado por 28 residuos, Cys295-Gln322 (Figura 51). Este bucle flexible se encuentra presente en la tanasa de *A. niger* 7K4O, pero se conforma solamente de 10 residuos, mientras que las estructuras de feruloil esterasa de *A. oryzae* (PDB: 3WMT) y *Fusarium oxysporum* (PDB: 6FAT) no contienen este bucle flexible. La flexibilidad del bucle se confirmó con el programa Modeller 9.25.

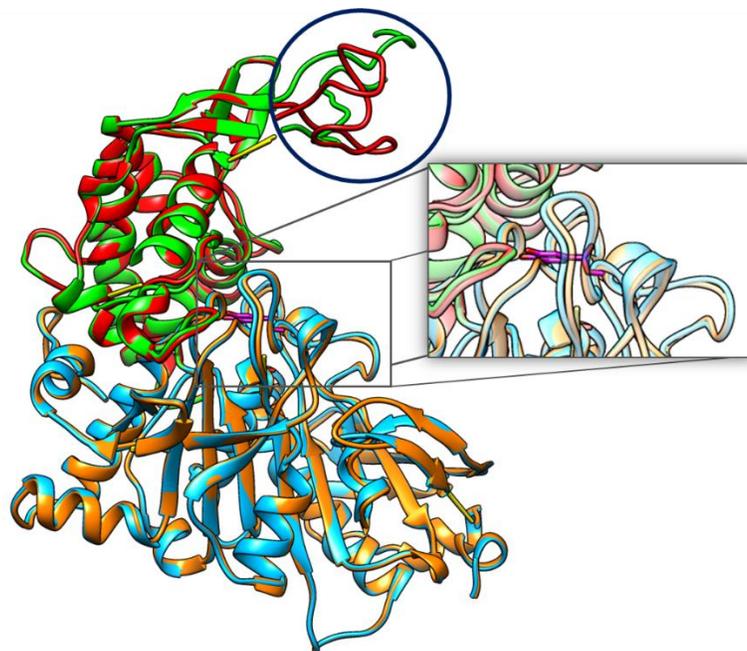


Figura 51. Perspectiva del bucle flexible de la tanasa M y la tanasa ANT; a partir de la figura 50 con rotación de 90°, -20° y 30° para los ejes y, x y z, respectivamente. El bucle flexible se visualiza (dentro del círculo) en el dominio tapa en la superficie del surco de actividad. El galato de metilo se muestra en color magenta. Los dominios tapa de la tanasa M y ANT se muestran en colores rojo y verde, respectivamente. Los dominios hidrolasa α/β se muestran en color naranja y azul cielo, respectivamente.

Las estructuras de las dos tanasas contienen el motivo CS-D-HC con geometría espacial similar (RMSD 0.72 Å). En la Figura 52 se muestra la superposición de la triada catalítica y el puente disulfuro de ambas tanasas; donde los residuos Ser196 e His494 de la triada catalítica están conectados por un puente disulfuro entre las cisteínas Cys195 y Cys495.

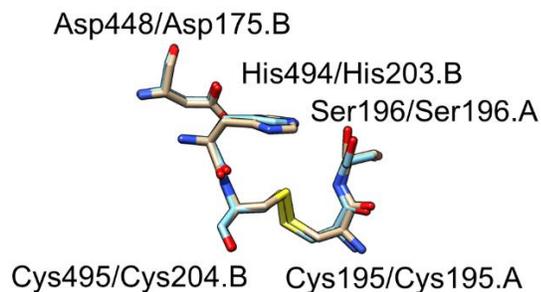


Figura 52. Superposición de la triada catalítica y el puente disulfuro de la tanasa M (color tan) y la tanasa ANT (color azul cornflower). Los primeros y segundos números corresponden a los residuos de la tanasa M y ANT, respectivamente.

AutoLigand identificó tres probables sitios de unión del ligando cerca de la probable triada catalítica anteriormente reportada (Fuentes-Garibay et al. 2015) conformada por Ser196, Asp448 e His494. Una de estas zonas se encuentra en la misma zona que ha sido descrita como el sitio de unión del ligando para la tanasa de *A. niger* (PDB: 7K4O) (Dong et al. 2021), y las feruloil esterasas de *A. oryzae* (PDB: 3WMT) (Suzuki et al. 2014) y *A. niger* (PDB: 1UWC) (McAuley et al. 2004), y la tanasa de *Lactobacillus plantarum* (PDB: 4JUI) (Ren et al. 2013). Por esta razón, se decidió ubicar la caja del grid en dicha zona para realizar los análisis de acoplamiento molecular. Aunque la secuencia de la estructura de tanasa 7K4O tiene solamente el 48% de identidad con las tanasas M y ANT, los residuos de aminoácidos que interaccionan con el sustrato (galato de metilo) están conservados entre las 3 tanasas, a excepción del residuo Asp197 localizado en el lado carboxilo de la serina de la triada catalítica, el cual corresponde a Glu207 en la secuencia de 7K4O. Ambos residuos son polares y tienen carga, sin embargo, el aspartato tiene una cadena más corta que el glutamato. Por lo tanto, se decidió realizar el análisis de acoplamiento molecular con ángulos de torsión flexibles de la cadena lateral del residuo Asp197.

El análisis de acoplamiento molecular mostró que la tanasa M forma un complejo enzima-sustrato con el galato de metilo con energía de -5.10 kcal/mol. En la Figura 53 se muestra el sitio de unión del galato de metilo y los aminoácidos con los que interacciona. Además, en el análisis de acoplamiento molecular se determinó que el complejo enzima-sustrato se

estabiliza por puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del galato de metilo y el N ϵ de Gln228, el O ϵ y N ϵ de Gln229, y el N ϵ de His232. El átomo de carbono del grupo éster del sustrato se localizó a una distancia de 3.8 Å del O γ de la Ser196, el cual está involucrado con el probable ataque nucleofílico del residuo catalítico de serina en el primer paso de la reacción.

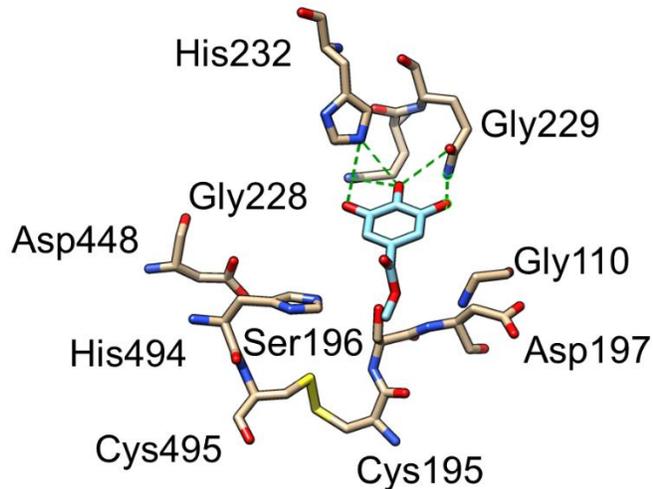


Figura 53. Complejo enzima-sustrato entre la tanasa M y el galato de metilo (color azul cielo). Se muestran la triada catalítica, las cisteínas vecinas, y los aminoácidos alrededor del sustrato. Los puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del galato de metilo y los residuos de la enzima se muestran en líneas discontinuas color verde.

7.5. Diseño de un proceso de recuperación y formulación de la tanasa M

Las tanasas disponibles en el mercado se encuentran en presentación en polvo, en concentraciones que van de los 250 a 500 U/g, con un rango de precio de los 20-500 dólares por kilo, de acuerdo con la concentración y la cantidad que se adquiera.

La propuesta para la formulación del polvo de tanasa M, se muestra en la Figura 54 y se estimó para una concentración de polvo de 500 U/g. Se consideró que el downstream siga las siguientes etapas: centrifugación para obtener el medio de cultivo libre de células, seguido de una etapa de microfiltración, posteriormente ultrafiltración con cambio de buffer a buffer de citratos pH 5.0, y finalmente una etapa de secado por aspersión

utilizando ciclodextrina A al 10% p/v como coadyuvante (Morganna et al. 2020), del cual se estima que el rendimiento del polvo es 2.5 veces más que la cantidad inicial de coadyuvante, con un porcentaje de recuperación del 95% en cada etapa del downstream.

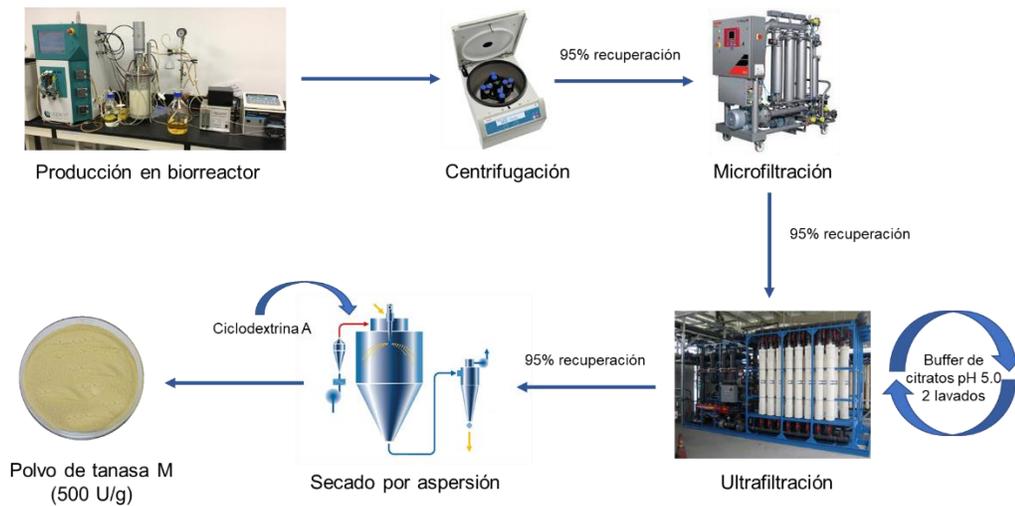


Figura 54. Diagrama del downstream propuesto para obtener el formulado en polvo de la tanasa M a concentración de 500 U/g.

De acuerdo con el procedimiento que se siguió en la sección 7.6.12 para la etapa de producción en biorreactor, los materiales y reactivos utilizados, el costo total de la materia prima fue de 1.55 dólares/kg, lo cual representa el 30% del costo total de un bioproceso (Lizarazo et al, 2015). Por lo que el costo total estimado para el proceso de producción de la tanasa M fue de 4.68 dólares/kg.

Los resultados obtenidos en la producción de tanasa M a nivel de biorreactor (sección 8.4.8), mostraron que la actividad volumétrica de tanasa generada fue de 318,289 U/L y la actividad específica de la tanasa M fue de 408 U/mg. Si se considera un factor de ganancia del 50% sobre el costo total del proceso de producción, se estimó que el precio de venta para la tanasa M pudiera ser de 9.37 dólares/kg. Este precio de venta es de 30 a 50 veces más económico que el precio de venta disponible para otras tanasas en polvo y concentración de 500 U/g.

8. DISCUSIÓN

Recientemente, el grupo de trabajo ha mostrado la eficiencia del sistema de expresión de *P. pastoris* para producir y secretar la tanasa de *A. niger* GH1 (Fuentes-Garibay et al. 2015). Sin embargo, esta tanasa recombinante mostró diferentes propiedades bioquímicas a la tanasa nativa, como son el pH y la temperatura óptima de actividad, y baja actividad específica. La tanasa recombinante fue caracterizada como una proteína N-glicosilada con dos cadenas unidas por un puente disulfuro, mientras que la tanasa nativa es una proteína N-glicosilada de cadena simple (Renovato et al. 2011). Dado que la secuencia de la tanasa de *A. niger* GH1 tiene dos sitios de reconocimiento de Kex2 (Lys309-Arg310 y Lys347-Arg348), nosotros hipotetizamos que la proteína de doble cadena fue formada por el corte proteolítico del primer sitio Kex2 de la secuencia de la tanasa, dado que este sitio está en la superficie de la proteína en un bucle flexible del dominio tapa; mientras que el segundo sitio Kex2 se encuentra menos expuesto a la superficie de la proteína comparado con el primer sitio Kex2 (Fuentes-Garibay et al. 2015). Por lo tanto, se diseñó la secuencia de la tanasa de *A. niger* GH1 y cepas de *P. pastoris* Mut^s para producir y secretar la enzima como una proteína de una cadena. La proteína recombinante producida fue la esperada de una cadena, como lo mostro el análisis SDS-PAGE, y tuvo propiedades bioquímicas similares a la tanasa recombinante de dos cadenas de *A. niger* GH1, excepto por los parámetros cinéticos y la actividad específica. La tanasa de una cadena mostró 4 veces menor K_m y 11, 38 y 11 veces mayor k_{cat} , k_{cat}/K_m y actividad específica que la tanasa recombinante de dos cadenas. Estos resultados indican que para alcanzar la V_{max} , se requiere mayor concentración de sustrato para la tanasa de doble cadena que para la tanasa de una cadena, y que la eficiencia catalítica es mayor en la tanasa de una cadena, comparado con la tanasa de dos cadenas.

Después de la transformación de *P. pastoris*, a menudo se ha observado una variación clonal con una cantidad variable de proteína secretada. Por lo tanto, se requiere un tamizaje para la selección de transformantes con niveles altos de producción de proteína secretada (Vogl et al. 2018). En el presente trabajo, después de 48 h de inducción con metanol en cultivos de matraz, las 84 transformantes de *P. pastoris* que fueron evaluadas, mostraron diferentes valores de rendimiento proteínas extracelulares/biomasa; lo cual

claramente indico el impacto de la variación clonal en la producción de proteína extracelular. Solo una de las 84 transformantes que fueron evaluadas se consideró como clona sobreproductora, revelando la importancia del proceso de tamizaje para maximizar la producción de proteínas en las células de la levadura.

Las cinéticas de actividad volumétrica de tanasa extracelular para los cultivos en matraz mostraron un decremento en la actividad de tanasa a las 48 h y un incremento nuevamente a las 72 h de inducción. Además, el análisis SDS-PAGE para el medio de cultivo libre de células del mismo cultivo mostraron bandas de baja masa molecular que también estaban N-glicosiladas. En primera instancia se sospechó de una probable mezcla de cepas entre KM71TanM y KM71ANT, que pudiera haber ocurrido durante la mutagénesis, debido a que la diferencia entre las secuencias nucleotídicas *TanM* y *ANT* es de tan solo un codón, por lo que pudiera no haber sido detectable a lo largo de la construcción de la cepa KM71TanM. Sin embargo, las secuencias también se diferenciaban en el sitio de restricción presente al final de las secuencias, siendo *AvrII* para *ANT* y *NotI* para *TanM*. Por lo que se descartó ésta probable contaminación al realizar una PCR específica mediante el uso de un oligonucleótido (3'TANGSA) que contenían la secuencia *AvrII* y un pequeño fragmento de la secuencia de la tanasa. El mencionado oligonucleótido hibridaba en 11 pb con la secuencia de *TanM*; lo cual es insuficiente para obtener una PCR positiva, ya que se conoce que un oligonucleótido debe ser complementario a la secuencia en al menos 13 pb (Woolf et al. 1992). Mientras que con la secuencia de *ANT* ocurre la hibridación de las 20 pb correspondientes al oligonucleótido.

Al haber descartado la contaminación de cepas, se consideró que los resultados obtenidos en las cinéticas de actividad volumétrica de tanasa extracelular en matraz y las bandas del análisis de SDS-PAGE indicaban un comportamiento parecido a la degradación. La degradación de proteínas heterólogas en el sistema de expresión de *P. pastoris* cuando se utiliza metanol como fuente de carbono se ha relacionado con la lisis celular que incrementa la actividad proteolítica (Sinha et al. 2004). La subtilisina endógena de *P. pastoris* se ha descrito como la responsable de gran parte de la degradación de proteínas heterólogas, ya que se libera en el medio de cultivo después de la lisis celular o por difusión a través de la pared celular (Salamin et al. 2010). Esta serin proteasa tiene pH

óptimo de actividad ente 6.0 y 8.0. Además, se ha reportado un decremento de la proteólisis de endoglucanasa recombinante en cepas de *P. pastoris* KM71 cuando el cultivo fue realizado a pH 5.0 en lugar de pH 6.0 (Chanroenenrat et al. 2013). En el presente trabajo, correlacionamos el aumento en la actividad volumétrica de tanasa a las 72 h de inducción en el matraz de agitación con una disminución en el pH del medio de cultivo de 6.0 a 5.0 a las 72 h de inducción. Por esta razón, las tanasas mutada y no mutada se produjeron utilizando inducción en medio BMM a pH 5.0 suplementado con alanina; lo cual se ha reportado como un buen amortiguador de pH para el medio BMM en los cultivos en matraz (O'Callagan et al 2002), y que no reprime las vías del metabolismo del metanol (Inan & Meagher 2001). Además, para evaluar la hipótesis que el pH 5.0 en el medio de inducción aumenta la producción de tanasa, también se produjo la tanasa de una cadena en un biorreactor de sobremesa, debido a que en este se pueden lograr altas concentraciones de biomasa con un control de pH establecido en 5.0 para inhibir la probable actividad de la proteasa subtilisina en el medio de cultivo. En este cultivo, la actividad de tanasa extracelular aumentó durante toda la etapa de inducción de metanol; por lo tanto, la degradación de la tanasa fue insignificante.

Anteriormente, el grupo de trabajo ha descrito que existen tres factores que impactan, en el incremento de la producción de proteínas heterólogas en los cultivos de *P. pastoris*; los cuales son la densidad inicial en la etapa de inducción, la concentración de metanol en el medio de cultivo y la temperatura (Viader et al. 2013). Esta es la razón por la que se consideró la relación entre la densidad celular inicial en la etapa de inducción (50 g/L DCW) y la concentración de metanol en el medio de cultivo (1 g/L) que fue adecuada en otros cultivos en biorreactor optimizados. Por otro lado, se ha reportado que en los cultivos en biorreactor, la relación óptima entre la producción específica (q_p) y la velocidad específica de crecimiento (μ) demuestra un balance entre la dosis génica y el proceso metabólico en la célula. En cepas Mut⁺ la μ óptima con mayor q_p ocurre con valores bajos de 0.01 a 0.03 h⁻¹. Para obtener μ constante, la velocidad de alimentación debe incrementarse exponencialmente (Looser et al. 2015). En el presente trabajo, se obtuvo una μ constante de 0.0203 h⁻¹ con q_p de 0.084 mg/gh; lo cual se encuentra dentro de los parámetros esperados para incrementar la producción de proteína heteróloga. Sin

embargo, la μ constante se logró utilizando adición de metanol en exceso y regulado para mantener una concentración constante de metanol en el medio de cultivo.

La productividad volumétrica de microorganismos productores de tanasa, bacterias y hongos, se ha reportado en rangos de 1.62 a 83.161 U/Lh (Aguilar et al. 2001; Selwal et al. 2011; Selvaraj & Vytla 2018). Por otro lado, en los microorganismos recombinantes, la productividad volumétrica se encuentra en rangos de 0.66 a 72.9 U/Lh (Zhong et al. 2004; Liu et al. 2018). El cultivo en biorreactor de Tan M obtuvo una productividad volumétrica mayor (2800.5 U/Lh), convirtiendo el proceso en una alternativa potencial para la producción industrial de tanasa.

La tanasa nativa de *A. niger* GH1 y la recombinante de doble cadena tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero muestran diferentes propiedades bioquímicas que se han atribuido a sus diferentes grados de N-glicosilación y/o sus diferentes estructuras: proteína de cadena simple frente a proteína de doble cadena, respectivamente (Fuentes-Garibay et al. 2015). Nuestros resultados confirman que las diferencias en el perfil de temperatura y pH probablemente se deben a sus diferentes grados de N-glicosilación, ya que las tanasas recombinantes de cadena simple y doble que tienen grados similares de N-glicosilación también tienen el mismo pH y temperatura óptimos (5.0 y 20°C, respectivamente). Por el contrario, la tanasa nativa de *A. niger* GH1, que es principalmente un solo glicopolipéptido de 102-105 kDa con diferentes grados de glicosilación en comparación con las tanasas recombinantes, tiene un pH y una temperatura óptimos de 6.0-7.0 y 60°C (Renovato et al. 2011). En cualquier caso, se observaron algunas ligeras diferencias en la actividad en los perfiles de temperatura y pH entre las tanasas recombinantes de cadena simple y de cadena doble. Los rangos de pH y temperatura con una actividad relativa de más del 50% fueron más altos en la tanasa recombinante de cadena sencilla que en la de doble cadena (2.5-8.0, 20-60°C contra 4.0-5.0, 10-40°C). Aunque se observó un segundo máximo de actividad en el perfil de temperatura para las dos tanasas recombinantes, para la tanasa de cadena sencilla fue a 50°C y para la tanasa de doble cadena fue a 40°C. Tanto la tanasa de cadena sencilla como la doble cadena mostraron altas actividades residuales a 4°C y entre 40-50% de actividad residual a 30°C durante al menos 120 h. Otras tanasas recombinantes de *Aspergillus* mostraron un pH óptimo en el rango de 5.0 a 6.0 y una temperatura óptima

entre 30 y 80°C (Mizuno et al. 2014, Koseki et al. 2017, Koseki et al. 2018, Shao et al. 2020).

La tanasa de *A. oryzae* también se ha producido en el sistema de expresión de *P. pastoris* como una proteína de doble cadena (Koseki et al 2017). Esta tanasa fúngica tiene dos sitios de reconocimiento de Kex2. La delección de siete residuos que contienen los dos sitios Kex2 la convirtieron en una tanasa de cadena sencilla con una actividad específica más alta que la proteína recombinante no mutada. En consecuencia, se sugirió una mejora en la estabilidad conformacional de la variante mutada. La tanasa de *A. niger* GH1 tiene una identidad de secuencia del 77% con la tanasa de *A. oryzae*. Sin embargo, la tanasa de *A. niger* GH1 ha eliminado naturalmente cinco de los siete residuos, quedando solo un sitio Kex2 en esa posición. Por lo tanto, la tanasa de *A. niger* GH1 mutada en un solo aminoácido se asemeja a la tanasa de *A. oryzae* con eliminación de siete residuos en los alrededores del primer sitio Kex2.

La tanasa de *A. niger* GH1 debe tener un mecanismo que es típico para muchas hidrolasas que involucran una triada catalítica Ser/His/Asp con Ser como el nucleófilo, His como el catalizador base y Asp ayudando a orientar el residuo de His. Dado que los residuos de la triada catalítica de la tanasa de *A. niger* GH1 ya han sido identificados (Fuentes-Garibay et al. 2015), se esperaría que la orientación correcta de la triada catalítica y la proximidad nucleofílica del carbono carbonilo del sustrato como punto electrofílico desempeñaran un papel importante en la eficiencia de la enzima. La orientación de la triada catalítica y la proximidad entre los residuos de la triada catalítica están asegurados por el enlace disulfuro entre Cys195 y Cys495 que conecta directamente los residuos Ser196 e His494 de la triada catalítica en las tanasas de cadena simple y doble (Fuentes-Garibay et al. 2015). Además, los modelos moleculares de las tanasas de cadena simple y doble muestran identidad geométrica para la triada catalítica junto con Cys195 y Cys495. El análisis de acoplamiento molecular ha demostrado que las tanasas de cadena simple y doble pueden formar complejos enzima-sustrato con el galato de metilo, estabilizado por enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo del galato de metilo y los contactos hidrofóbicos cerca de la triada catalítica putativa, a una distancia razonablemente cercana

para el ataque nucleofílico del O γ de Ser196 al átomo de carbono del grupo éster del galato de metilo.

Un dominio tapa móvil o tipo solapa localizado sobre el sitio activo es un mecanismo bien conocido para la activación y especificidad del sustrato en lipasas (Khan et al 2017). En tanasas y feruloil esterases, el dominio tapa es más variable en número de residuos (0 a 231 residuos) y estructura, en comparación con el dominio hidrolasa α/β (261 a 365 residuos); lo cual se puede deducir al comparar las estructuras proteicas de la tanasa de *A. niger* (PDB: 7K4O), la tanasa de *L. plantarum* (PDB: 4JUI), tres feruloil esterases fúngicas (*A. niger* [PDB: 1UWC], *A. oryzae* [PDB: 3WMT] y *F. oxysporum* [PDB: 6FAT]), y una esterasa de *A. oryzae* (PDB: 6G21). La tanasa recombinante de cadena simple del presente trabajo tiene un dominio tapa más largo (198 residuos) de entre las dos tanasas que fueron comparadas, estando dentro del tamaño del dominio tapa de la tanasa de *L. plantarum* (186 residuos) y la estructura reportada como una esterasa de *A. oryzae* con código PDB 6G21 (209 residuos). La base de datos Pfam de familias de proteínas (Punta et al 2012) predice la presencia de dominios de tanasa fúngica y feruloil esterasa en esta esterasa. Las diferencias en el dominio tapa pueden causar las diferencias en el reconocimiento del sustrato y la eficiencia de la enzima, como en el caso de las lipasas. En el dominio tapa, la tanasa de cadena simple tiene un bucle flexible (Cys295-Gln322) localizado en el surco de superficie; lo cual puede facilitar o impedir el acceso del sustrato al sitio de unión. En la estructura de la tanasa de *A. niger* con código PDB: 7K4O (Dong et al. 2021), este bucle flexible es más pequeño que el predicho para las estructuras de la tanasa de cadena simple y doble. Sin embargo, un bucle flexible similar como el bucle de la tanasa de *A. niger* GH1 ha sido descrito como una solapa para la estructura de la tanasa de *L. plantarum* (PDB:4JUI) (Ren et al., 2013). Dicha solapa no cubre directamente el surco de superficie. Por lo que, los autores sugieren que es probable que no se requiera un ajuste conformacional de la solapa para la unión del sustrato. Sin embargo, el bucle flexible de las tanasas M y ANT incluyen el sitio de reconocimiento de Kex2 que fue removido en el presente trabajo mediante mutagénesis para producir la tanasa de cadena simple. Debido a que la tanasa de doble cadena tiene el sitio de corte de Kex2 en esta región flexible extra del dominio tapa, se puede esperar que la flexibilidad de esta región sea mayor en contraste con la de la tanasa de cadena simple, que, a su vez,

podría obstaculizar la flexibilidad del bucle en el surco de superficie, es decir, obstaculizar el acceso del sustrato al sitio de unión. Esto daría lugar a una K_m mayor y a menor eficiencia catalítica (incluyendo menor actividad específica) para la tanasa de cadena doble sobre la tanasa de cadena simple.

La estructura de la tanasa de *A. niger* (PDB: 7K4O), llamada An-Tan es una proteína de cadena simple y tiene una actividad específica de 46.9 U/mg cuando se utiliza galato de metilo como sustrato (Dong et al. 2021), mientras que la tanasa M tuvo una actividad específica de 408 U/mg. Aunque el método de rodantina-ácido gálico fue utilizado para determinar la actividad de ambas tanasas, nosotros utilizamos el método de Bradford para la determinación de concentración de proteínas, mientras que para An-Tan, fue utilizado el ensayo de proteína de ácido bicinónico (BCA) (Liu et al 2018). Usualmente, la concentración de proteínas está subestimada por el método de Bradford y sobreestimada por el método de BCA para las proteínas glicosiladas. Nosotros estimamos que la proporción de la concentración de proteínas determinados por los métodos de BCA y Bradford para la tanasa recombinante de cadena simple es 1.6; lo cual está en concordancia con el valor aproximado de 2 descrito para proteínas glicosiladas (Fountoulakis et al 1992). Entonces, se estimó que la tanasa de cadena simple podría tener 255 U/mg proteína BCA, un valor que es mayor al reportado para la actividad específica de An-Tan. Dado que ambas estructuras son muy similares en sus dominios hidrolasa α/β y la geometría de la triada catalítica, la diferencia en las actividades específicas parece venir del dominio tapa, específicamente de la región flexible en el dominio tapa. Sin embargo, el cambio de glutamato a aspartato en el lado carboxilo de la serina de la triada catalítica también podría jugar un rol en el incremento de la actividad específica de la tanasa de cadena simple de este trabajo, comparado con An-Tan. Debido a que el aspartato tiene una cadena lateral más corta que el glutamato, es un poco más rígido en estructuras proteicas que el glutamato; lo cual le da mayor preferencia para participar en sitios activos de proteínas que el glutamato (Betts & Russell, 2003).

Por otro lado, la descrita tanasa A de *A. oryzae* de cadena simple también producida en *P. pastoris* a partir de la eliminación de siete residuos, mostró una actividad específica de 256 U/mg de proteína BCA a 30°C y pH 5.0 cuando se utiliza galato de metilo como

sustrato (Koseki et al 2017). Este valor está en el mismo orden de magnitud que estimamos para la tanasa de cadena simple de este trabajo en las mismas condiciones (203 U/mg de proteína BCA). Por el contrario, la tanasa B de *A. oryzae* producida en *P. pastoris* (Koseki et al 2018), mostró una actividad específica más baja (40.3 U/mg de proteína BCA), aunque se produjo como una tanasa de cadena simple. Esta tanasa tenía 22 residuos que se eliminaron naturalmente, incluidos los del primer sitio Kex2 y sus alrededores, lo cual resultó en un bucle flexible de 14 residuos. Además, el glutamato se localiza en el lado carboxil de la serina de la triada catalítica. La menor actividad específica de la tanasa B de *A. oryzae*, en comparación con la tanasa A de *A. oryzae*, nuevamente apunta a la región flexible en el sitio Kex2, aunado con la presencia del glutamato o aspartato en el lado carboxil de la serina de la triada catalítica.

Actualmente, las tanasas tienen un potencial para ser utilizadas en la industria de la infusión de té. El tratamiento con tanasa durante el proceso de extracción reduce la turbidez en un 72% y un 58% en las infusiones de té negro y té verde, respectivamente. También mantiene el pH de la infusión de té entre 4.8 y 5.5 (Aharwar et al 2020). Además, la extracción a temperatura entre 40-60°C combinada con el tratamiento con tanasa puede reducir entre un 31 y un 60% las catequinas hidrolizadas; lo cual mejora el color y la claridad del té y desarrolla un sabor de dulzura en el regusto de la infusión del té (Shao et al 2020, Lima et al 2018). La tanasa producida en el presente trabajo podría ser utilizada en la industria del té de infusión y su alta actividad específica aseguraría su desempeño en el proceso del té sin utilizar una gran cantidad de tanasa. Basados en los perfiles de pH y temperatura, la tanasa de cadena simple producida en este trabajo también podría utilizarse en el procesamiento de alimentos y bebidas.

Las tanasas que se encuentran disponible en el mercado se encuentran como presentación de polvo en concentración de 250-500 U/g, oscilando en precios que van desde 20 USD hasta 500 USD de acuerdo con la empresa y a la compra por toneladas. Los precios y concentraciones son cotizaciones de empresas asiáticas como Sunson, Xi'an Tian Guangyuan Biotech Co., Shaanxi Owens Industry Co., entre otras. Los rendimientos del proceso en biorreactor realizado para la tanasa del presente trabajo, en conjunto con el diseño del proceso de downstream para el formulado en polvo, permiten que el precio de

comercial para la tanasa M sea de 30 a 50 veces menor que los precios disponibles en el mercado, por lo que el proceso de producción de la tanasa recombinante que se desarrolló en el presente trabajo se encuentra dentro de los parámetros para ser competitiva en la industria de enzimas de tipo tanasa.

9. CONCLUSIONES

1. La tanasa mutada de cadena simple producida en el sistema de expresión de *P. pastoris* está N-glicosilada, y tiene masa molecular aparente de 65.4 kDa, después de la N-glicosilación.
2. La tanasa de cadena simple mostró actividad en rangos de pH y temperatura de 2.5 a 9 y 10 a 60°C, respectivamente; con un pH óptimo de 5.0 y una temperatura óptima de 20°C. Además, la enzima recombinante tiene vida media de 58 y 4 días, a 4 y 30°C, respectivamente.
3. La actividad específica de la tanasa mutada aumentó en comparación con la versión de la enzima no mutada de doble cadena que también se producía en *P. pastoris* (408 contra 38 U/mg, respectivamente).
4. Un análisis estructural sugirió que la alta actividad específica puede deberse a la presencia de un bucle flexible en el dominio tapa en el surco de actividad que puede controlar e impulsar el sustrato al sitio activo. Por el contrario, la menor actividad específica de la tanasa de doble cadena podría deberse a la presencia de un bucle desordenado y flexible que puede dificultar el acceso del sustrato al sitio de unión.
5. El proceso de producción y preparación del formulado en polvo de la tanasa recombinante de cadena simple, conduce a un precio comercial de 30 a 50 veces menor que el de otras tanasas disponibles en el mercado.
6. Con base en sus perfiles de pH y temperatura, estabilidad, alta actividad específica y su posible producción en el sistema de expresión de *P. pastoris*, la tanasa producida y descrita en este trabajo podría ser utilizada en el procesamiento de alimentos y bebidas a bajas y medias temperaturas.

10. PERSPECTIVAS

Los niveles de producción de tanasa obtenidos en biorreactor tienen potencial para la industria de enzimas, de acuerdo con el análisis de costos que se realizó en el presente trabajo. Sin embargo, estos niveles pueden aumentarse si se realiza un proceso de optimización de las condiciones de cultivo en el biorreactor. Es de conocimiento que las condiciones de cultivo óptimas para producir proteínas recombinantes cambian en función de la proteína que se quiere producir. Por lo que un proceso de optimización se requiere para determinar aquellas condiciones de cultivo que garanticen mayores rendimientos de producto/sustrato y mayor productividad volumétrica. En base a lo observado en el trabajo, algunas de las condiciones de cultivo que se pueden evaluar son la temperatura y la densidad celular al inicio de la etapa de metanol

La estrategia de downstream para la obtención del formulado en polvo de la tanasa que se propuso en el presente trabajo, da pie a realizar estudios sobre las condiciones óptimas de cada una de las etapas de recuperación. Además de estudiar el porcentaje de recuperación real que se obtiene del polvo de tanasa.

Las características bioquímicas y los niveles de producción de la tanasa recombinante, y un análisis de costos rentable, indican que la enzima recombinante producida en el presente trabajo es una enzima con potencial para ser utilizada en la industria de alimentos. Por lo que se pueden llevar a cabo estudios sobre la aplicación de la enzima en procesos de alimentos para tener una perspectiva de la aplicabilidad real.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar CN, Augur C, Favela-Torres E, Viniegra-González G. 2001. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 26:296-302.
2. Aguilar CN, Rodríguez R, Gutiérrez-Sánchez G, Augur C, Favela-Torres E, Prado-Barragan LA, Ramírez-Coronel A, Contreras-Esquivel JC. 2007. Microbial Tannases: Advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(1):47-59.
3. Aharwar A & Parihar DK. 2021. *Talamoryces verruculosus* tannase immobilization, characterization, and application in tea infusion treatment. *Biomass Conversion and Biorefinery*
4. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98:5301-5317.
5. Aizemberg R, Terrazas WDM, Ferreira-Dias S, Valentini SR, Gattás EAL. 2011. Optimal conditions for biomass and recombinant glycerol kinase production using the yeast *Pichia pastoris*. *Food Technology and Biotechnology* 49(3):329-335.
6. Aurand JM. 2016. 2017 World Viticulture Situation, OIV statistical report on world viticulture. International Organisation of Vine and Wine. 38th OIV World Congress of Vine and Wine, Brazil, October 23-28.
7. Battestin V, Mecedo GA. 2007. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. *Journal of Biotechnology* 10(2):191-199.
8. Beena PS, Soorej MB, Elyas KK, Sarita GB, Chandrasekaran M. 2010. Acidophilic tannase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(10):1403-1414.
9. Betts MJ & Russell RB. 2003. Amino acid properties and consequences of substitutions. In: *Bioinformatics for Geneticists*, Barnes MR & Gray IC (eds.), John Wiley & Sons, pp: 289-316.

10. Belmares R, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R, Ramírez AC, Aguilar CN. 2004. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Food Science and Technology* 37:857-864.
11. Berrios J, Flores MO, Díaz-Barrera A, Altamirano C, Martínez I, Cabrera Z. 2017. A comparative study of glycerol and sorbitol as co-substrates in methanol-induced cultures of *Pichia pastoris*: temperature effect and scale-up simulation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 44:407-411.
12. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
13. Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. 13:329-332.
14. Cereghino JL, Cregg JM. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology reviews* 24:45-66.
15. Cha-aim, K, Hoshida H, Fukunaga T, Akada R. 2012. Fusion PCR via novel overlap sequences. In: *Gene Synthesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Jean Peccoud (ed.). Springer, pp: 97-110.
16. Charoenrat T, Khumruaengsri N, Promdonkoy P, Rattanaphan N, Eurwilaichitr L, Tanapongpipat S, Roongsawang N. 2013. Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 116(2):193-198.
17. D'Anjou MC, Daugulis AJ. 2000. Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. *Biotechnology Letters* 22:341-346.
18. De Waele S, Vandenberghe I, Laukens B, Planckaert S, Verweire S, Van Bogaert INA, Soetaert W, Devreese B, Ciesielska K. 2018. Optimized expression of the *Starmarella bombicola* lactone esterase in *Pichia pastoris* through temperature adaptation, codon-optimization and co-expression with *HAC1*. *Protein Expression and Purification* 143:62-70.

19. Dehnavi E, Siadat SOR, Roudsari MF, Khajeh K. 2016. Cloning and high-level expression of β -xylosidase from *Selonomonas ruminantium* in *Pichia pastoris* by optimizing of pH, methanol concentration and temperature conditions. *Protein Expression and Purification* 124:55-61.
20. Díaz DC, Bolívar F, Escalante A. 2016. Ingeniería de proteínas como una herramienta en ingeniería de vías metabólicas. *BioTecnología* 20(1):16-34.
21. Dong L, McKinsty WJ, Pan L, Newman J, Ren B. 2021. Crystal structure of fungal tannase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallographica D77*, 267-277.
22. Fountoulakis M, Juranville J-F, Manneberg M. 1992. Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantitation assays, using non-glycosylated and glycosylated proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:265-274
23. Fuentes-Garibay JA, Aguilar CN, Rodríguez-Herrera R, Guerrero-Olazarán M, Viader-Salvadó JM. 2015. Tannase sequence from a xerophilic *Aspergillus niger* strain and production of the enzyme in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology* 57:439-447.
24. Govindarajan RK, Revathi S, Rameshkumar N, Krishnan M, Kayalvizhi N. 2016. Microbial tannase: current perspectives and biotechnological advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 6:168-175.
25. Guex N, & Peitsch MC. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: and environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18(15):2714-2723.
26. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. 2012. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics* 4(17):1-17.
27. Harris R, Olson AJ, Goodsell DS. 2007. Automated prediction of ligand-binding sites in proteins. *Proteins* 70(4):1506-1517.
28. Healthcare GE. 2010. *Strategies for Protein Purification: Handbook*. Uppsala GE Healthcare, pp: 39-40.
29. Heckman KL, Pease LR. 2007. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols* 2(4):924-932.

30. Hutchinson CA, Philipps S, Edgell MH, Gillam S, Jahnke P, Smith M. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *The Journal of Biological Chemistry* 253(18):6551-6560.
31. Inan M & Meagher MM. 2001. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92:585-589.
32. Institute of Alcohol Studies. 2016. *The Alcohol Industry: Overview*. Factsheet. London, UK, pp: 4-7.
33. Karbalaei M, Rezaee SA, Farsiani H. 2020. *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of cellular physiology* 2020:1-15.
34. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. 2015. The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10(6):845-858.
35. Khan FI, Lan D, Durrani R, Huan W, Zhao Z, Wang Y. 2017. The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. *Frontier in Bioengineering and Biotechnology* 5(16):1-13.
36. Khanbabaee K, Ree TV. 2001. Tannins: Classification and Definition. *Natural Product Reports* 18:641-649.
37. Koseki T, Ichikawa K, Sasaki K, Shiono Y. 2018. Characterization of a novel *Aspergillus oryzae* tannase expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 126(5):553-558.
38. Koseki T, Otsuka M, Mizuno T, Shiono Y. 2017. Mutational analysis of Kex2 recognition sites and a disulfide bond in tannase from *Aspergillus oryzae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482:1165-1169.
39. Krieger E, Joo K, Lee J, Lee J, Raman S, Thompson J, Tyka M, Baker D, Karplus K. 2009. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8. *Proteins* 77(9):114-122.
40. Kumar R, Singh M. 1984. Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32:447-453.

41. Land H & Humble MS. 2018. YASARA: a tool to obtain structural guidance in biocatalytic investigations. In: Protein Engineering Methods and Protocols, Bornscheuer UT & Höhne M (eds). Humana Press: New York, pp. 43-67.
42. Lehmann M, Pasamontes L, Lassen SF, Wyss M. 2000. The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1543:408-415.
43. Lekha PK, Chand N, Lonsane BK. 1994. Computerized study of interactions among factors and their optimization through response surface methodology for the production of tannin acyl hydrolase by *Aspergillus niger* PKL 104 under solid state fermentation. *Bioprocess Engineering* 11:7-15.
44. Lekha PK, Lonsane BK. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the Art. *Advances in applied microbiology* 44:215-260.
45. Li J, Xiao Q, Huang Y, Ni H, Wu C, Xiao A. 2017. Tannase application in secondary enzymatic processing of inferior Tieguanyin oolong tea. *Electrical Journal of Biotechnology* 28:87-94.
46. Li Z, Xiong F, Lin Q, d'Anjou M, Daugulis AJ, Yang DSC, Hew CL. 2001. Low-Temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 21:438-445.
47. Lima JS, Cabrera MP, Casazza AA, Silva MF, Perego P, Carvalho JLB, Converti A. 2018. Immobilization of *Aspergillus ficuum* tannase in calcium alginate beads and its application in the treatment of boldo (*Peumus boldus*) tea. *International Journal of Biological Macromolecules* 118:1989-1994.
48. Liu F, Wang B, Ye Y, Pan L. 2018. High level expression and characterization of tannase tan7 using *Aspergillus niger* SH-2 with low-background endogenous secretory proteins as the host. *Protein Expression and Purification* 144:71-75.
49. Lizarazo SP, Hurtado GG, Rodríguez LF. 2015. Análisis técnico económico de la producción de bioetanol a partir de papa a nivel de laboratorio en Boyacá. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 9(1):97-111.
50. Looser V, Bruhlmann B, Bumbak F, Stenger C, Costa M, Camattari A, Foriadis D, Kovar K. 2015. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances* 33:1177-1193.

51. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193(1):265-275.
52. Mahendran B, Raman N, Kim DJ. 2006. Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:44-450.
53. McAuley KE., Svendsen S, Patkar SA, Wilson KS. 2004. Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallographica D*60:878-887.
54. Mckee T, Mckee JR. 2013. *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida*. 5th ed. Mc Graw Hill, pp: 171-178.
55. McPherson MJ, Moller SG. 2000. PCR Mutagenesis. In: *PCR The Basics from Background to Bench*. BIOS Scientific. New York, pp: 143-179.
56. Mizuno T, Shiono Y, Koseki T. 2014. Biochemical characterization of *Aspergillus oryzae* native tannase and the recombinant enzyme expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118(4):392-395.
57. Morganna RMF, Martinez MLL, Oliveira WP, Guimarães LHS. 2020. Stabilization and application of spray-dried tannase from *Aspergillus fumigatus* CAS21 in the presence of different carriers. *3 Biotech* 10(177):1-14.
58. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. 2009. Autodock4 and AutodockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 16:2785-2791.
59. Natarajan K. 2009. Tannase: A tool for instantaneous tea. *Current Biotica* 3(1):96-103.
60. O'Callagan J, O'Brien MM, McClean K, Dobson ADW. 2002. Optimization of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29:55-59.
61. País-Chanfraud JM, García Y, Licor L, Besada V, Castellanos-Serra L, Cabello CI, Hernández L, Mansur M, Plana L, Hidalgo A, Támara Y, Abrahantes-Pérez MC, del Toro Y, Valdés J, Martínez E. 2004. Improving the expression of mini-proinsulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters* 26:1269-1272.

62. 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. *Journal of Computational Chemistry* 25(13):1605-1612.
63. Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer ELL, Eddy SR, Bateman A, Finn R. D. 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 40:D290-D301.
64. Ren B, Wu M, Wang Q, Peng X, Wen H, McKinstry WJ, Chen Q. 2013. Crystal structure of tannase from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Molecular Biology* 425(15):2737-2751.
65. Renovato J, Gutiérrez-Sánchez G, Rodríguez-Durán LV, Bergman C, Rodríguez R, Aguilar CN. 2011. Differential properties of *Aspergillus niger* Tannase produced under solid-state and submerged fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165:382-395.
66. Rockwell NC, Krysan DJ, Komiyama T, Fuller RS. 2002. Precursor processing by Kex2/furin proteases. *Chemical Reviews* 102:4525-4548.
67. Rodríguez-Durán LV, Valdivia-Urdiales B, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera RR, Aguilar CN. 2010. Química y biotecnología de la tannasa. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* 2(4):1-11.
68. Rosano GL, Ceccarelli EA. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5:1-17.
69. Salamin K, Sriranganadane D, Léchenne B, Jousson O, Monod M. 2010. Secretion of an endogenous subtilisin by *Pichia pastoris* strains GS115 and KM71. *Applied and Environmental Microbiology* 76(13):4269-4276.
70. Saraswat M, Musante L, Ravidá A, Shortt B, Byrne B, Holthofer H. 2013. Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. *BioMed Research International* 2013:1-18.
71. Selvaraj S & Vytla RM. 2018. Solid state fermentation of *Bacillus gottheilii* M2S2 in laboratory-scale packed bed reactor for tannase production. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 48(9):799-807.

72. Selwal MK, Yadav A, Selwal KK, Aggarwal NK, Gupta R, Gautam SK. 2011. Tannase production by *Penicillium atramentosum* KM under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology* 42:374-387.
73. Shao Y, Zhang Y-H, Zhang F, Yang Q-M, Wen H-F, Xiao Q, Xiao A-F. 2020. Thermostable tannase from *Aspergillus niger* and its application in the enzymatic extraction of green tea. *Molecules* 25:1-14.
74. Sharma S, Agarwal L, Saxena RK. 2008. Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*. *Bioresource Technology* 99:2544-2551.
75. Sharma S, Bhat TK, Dawra RK. 1999. Isolation, purification and properties of tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15:673-677.
76. Sharma S, Bhat TK, Dawra RK. 2000. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodamine. *Analytical Biochemistry* 279:85-89.
77. Shi X, Karkut T, Chamankhah M, Alting-Mees M, Hemmingsen SM, Hegedus D. 2003. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expression & Purification* 28:321-330.
78. Sinha J, Plantz BA, Inan M, Meagher MM. 2004. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant Ovine Interferon-Tau. *Biotechnology and Bioengineering* 89(1):102-112.
79. Skotnicki-Hoogland M. 2016. Liquid Fruit Market Report. European Association Fruit Juice. S&G: Brussels, pp. 16-17.
80. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150:76-85.
81. Sphoner SC, Müller H, Quitmann H, Czermak P. 2015. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 202:118-134.

82. Sreenivas S, Krishnaiah SM, Govindappa N, Basavaraju Y, Kanojia K, Mallikarjun N, Natarajan J, Chatterjee A, Sastry KN. 2014. Enhancement in production of recombinant two-chain Insulin Glargine by over-expression of Kex2 protease in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(1):327-336.
83. Suzuki K, Hori A, Kwamoto K, Thangudu RR, Ishida T, Igarashi K, Samejima M, Yamada C, Arakawa T, Wakagi T, Koseki TK, Fushinobu S. 2014. Crystal and structure of a feruloyl esterase belonging to the tannase family: A disulfide bond near a catalytic triad. *Proteins* 82:2857-2867.
84. Svoboda K. 1983. Significance of specific activity and a possible universal unit for its definition. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 88(1):13-29.
85. Tress M. 2013. Protein tertiary structures: prediction from amino acid sequences. In: eLS., John Wiley & Sons (eds). Chichester.
86. Urban A, Neukirchen Sm Jaeger KE. 1997. A rapid and efficient method for site-direct mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Research* 25(11):2227-2228.
87. Viader-Salvadó JM, Castillo-Galván M, Fuentes-Garibay JA, Iracheta-Cárdenas MM, Guerrero-Olazarán M. 2013. Optimization of five environmental factors to increase beta-propeller phytase production in *Pichia pastoris* and impact on the physiological response of the host. *Biotechnology Progress* 29(6):1377-1385.
88. Vogl T, Gebbie L, Palfreyman RW, Speight R. 2018. Effect of plasmid design and type of integration event on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 84:e02712-e02717.
89. Wang Y, Xiao J, Suzek TO, Zhang J, Wang J, Bryant SH. 2009. PubChem: a public information system for analyzing bioactivities of small molecules. *Nucleic Acids Research* 37:W623-W633.
90. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* 46:W296-W303.

91. Webb B & Sali A. 2016. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics* 54:561-5637.
92. Woolf TM, Melton DA, Jennings CGB. 1992. Specificity of antisense oligonucleotides *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:7305-7309.
93. Woodley JM. 2013. Protein engineering of enzymes for process applications. *Current Opinion in Chemical Biology* 17:310-316.
94. Wu JM, Wang SY, Fu WC. 2012. Lower temperature cultures enlarge the effects of *Vitreoscilla* hemoglobin expression on recombinant *Pichia pastoris*. *International Journal of Molecular Sciences* 13:13212-13226.
95. Zhong X, Peng L, Zheng S, Sun Z, Ren Y, Dong M, Xu A. 2004. Secretion, purification and characterization of a recombinant *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 36:165-169.