

[PID 9091](#)

Desarrollo de bioprocesos a bajas temperaturas mediante el uso de psicrozimas con potencial aplicación en la industria alimentaria

Levin Gustavo J., Glodowsky Alejandro, Muchuitti Gabriela S., Larrosa Virginia J.

Autores: Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos. Gral. Perón 64, Gualaguaychú, Entre Ríos, Argentina.

Contacto: glevin@conicet.gov.ar

ARK: <http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/4av0qagpk>

RESUMEN:

Una novedosa transglutaminasa (TGasa, EC 2.3.2.13) fue parcialmente purificada a partir de *Penicillium chrysogenum* antártico, usando como metodologías precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio aniónico. El extracto final alcanzó una actividad específica de 7,81 mU/mg, con un factor de purificación de 7,16 y un rendimiento de 5,02%. El peso molecular de la enzima se estimó en 67 kDa por análisis bioinformático y SDS-PAGE. La actividad máxima de TGasa se observó a pH 8,0 y 30 °C, confirmándose una inactivación total en condiciones mesófilas (cerca de 40 °C). Una ligera mejora en la actividad TGasa se demostró en presencia de Ca²⁺, la cual aumentó a 127,78 ± 9,62% en 35 mM pero retornó a los valores normales con concentraciones superiores. Asimismo, la actividad de la enzima disminuyó progresivamente en presencia de EDTA y STPP lo que expuso ser una enzima Ca²⁺ dependiente, siendo este factor suministrado por el sustrato de fermentación.

La TGasa parcialmente purificada fue posteriormente utilizada como aditivo para modificar la reología de un gel de gelatina en frío, adquiriendo un aumento en la resistencia y gomosidad del gel de 32,25% y 30,50% respectivamente.

Palabras clave: Transglutaminasas; Hongos antárticos; Enzimas frías; Fermentación sustrato sólido (SSF); Tecnología alimentos

OBJETIVOS PROPUESTOS Y CUMPLIDOS

1. Determinar las condiciones óptimas de cultivo de las cepas fúngicas psicrófilas: Sustratos, pH, temperatura, inductores.
2. Utilizar diferentes desechos de la agroindustria para la preparación de medios de cultivo y generar bioprocesos ambientalmente sustentables.
3. Identificar el perfil de las enzimas de interés producidas en cada condición.
4. Implementar estrategias de purificación para las enzimas de interés, con niveles de pureza según los requerimientos de su aplicación alimentaria y/o industrial.
5. Explorar sus capacidades biotecnológicas en el procesamiento y elaboración de alimentos.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue producir, purificar y caracterizar una novedosa transglutaminasa, originada por una cepa antártica de *Penicillium chrysogenum*, mediante fermentación en estado sólido de cáscaras de semillas de soja (un residuo agroindustrial) y probar su potencial aplicación como aditivo alimentario para la modulación estructural.

MARCO TEÓRICO

Las transglutaminasas (TGasa, EC 2.3.2.13) son enzimas implicadas en la modificación postraduccional de proteínas. Ellas catalizan la formación de un enlace peptídico mediante la transferencia de un grupo γ -carboxamida de restos de glutamina (donador de acilo) hacia aminas primarias (aceptores de acilo) lo que resulta en la reticulación intra- o intermolecular. La hidrólisis del grupo γ -carboxamida de glutamina juega un papel subordinado y tiene lugar a niveles bajos o ante la ausencia de un apropiado receptor de acilo (Folk y Chung, 2006). El hecho de que la TGasa pueda actuar sobre una amplia variedad de proteínas hace que sea una herramienta poderosa capaz de modificar las propiedades estructurales de diversas matrices de péptidos (Ahmed et al., 2007) con un alto potencial de aplicación en diferentes campos tales como alimentos, biomédica, industria cosmética, etc. (Santos y Torne, 2009).

La TGasa está ampliamente distribuida en animales, plantas, hongos y bacterias (Wilhelm et al., 1996). El Factor XIII, una proteína del plasma humano, es la TGasa más ampliamente estudiada debido a su importante rol en la cascada de coagulación de la sangre.

Se sabe que las TGasas animales son dependientes de Ca^{+2} , este cofactor induce cambios formativos en la proteína exponiendo así el correspondiente sitio activo. Sin embargo, la TGasa obtenida de *Streptoverticillium sp.* demostró ser no dependiente del ion Ca (Ando et al., 1989), destacando la importancia de las investigaciones en la búsqueda de novedosas fuentes enzimáticas, con el objetivo de alcanzar un alto grado de recuperación a un bajo costo proyectado en futuras aplicaciones industriales (Martins et al., 2014). Hoy en día, los esfuerzos de *screening* en este tema se centran en enzimas que puedan actuar a temperaturas muy bajas o muy altas: *psicrozimas* o *termozimas* (Cavicchioli et al., 2002; Hong et al., 2012).

La reología de las matrices alimentarias son susceptibles a los cambios cuando se exponen a altas temperaturas, esto significa modificación en la dureza, cohesividad, humedad, o simplemente la pérdida de compuestos volátiles, esto último puede afectar drásticamente el sabor del producto final. En este contexto, surge la necesidad de desarrollar procesos industriales eficientes a bajas temperaturas. Las psicrozimas son las herramientas indicadas para estos desarrollos, presentando un alto número de recambio a bajas temperaturas, lo que permite reducir la cantidad de energía utilizada en el proceso y el mantenimiento de las propiedades de los alimentos (Javed y Iqbal, 2016).

Las TGasas psicrófilas tienen un alto potencial de aplicación en la preparación de varios alimentos a base de proteínas tales como productos reestructurados de carne para mejoras de textura (Kuraishi

et al, 1997; Trespalacios y Pla, 2007), en reestructura de productos de pescado para mejorar textura y propiedades mecánicas (Téllez-Luis et al., 2002), en yogur para incrementar la fuerza del gel (Lauber et al., 2000), en productos lácteos para un mejoramiento total de las propiedades funcionales (Hiller y Lorenzen, 2009) y en pan sin gluten para mejorar las propiedades texturales y el volumen del producto final (Pongjaruvat et al., 2014), entre otros (Steffen et al., 2017).

La TGasa liofilizada de grado analítico de hígado de cobayo está disponible comercialmente por Sigma-Aldrich (CAS 80146-85-6). No obstante, la TGasa utilizada en la industria alimentaria generalmente consiste en un extracto enzimático parcialmente purificado de *Streptomyces sp.* o *Streptoverticillium sp.* (Gerber et al., 1994). De acuerdo con Ajinomoto, productor de TGasa grado-alimentario, la adición de esta enzima puede dar como resultado las siguientes propiedades: 1) capacidad de gelatinización de proteínas inicialmente incapaces de formar geles; 2) mejora de la viscosidad al aumentar el peso molecular total de las proteínas; 3) mejora en la estabilidad térmica debido a los enlaces covalentes inter e intra-moleculares formados; 4) una mayor capacidad de retención de agua; y en general, afirman que la polimerización por transformación biológica se considera más segura que el mismo proceso químico, por lo que la TGasa puede aumentar el valor nutricional del producto.

Las enzimas aplicadas industrialmente son utilizadas en grandes volúmenes, es por ello que son necesarios métodos simples y de bajo costo para su producción. La fermentación en estado sólido (SSF) representa una forma de cultivo de microorganismos, tales como bacterias, pero especialmente hongos filamentosos, que se caracteriza por su simplicidad, robustez, bajo costo, y alta productividad de ciertas moléculas, en particular enzimas (Pandey, 2003). Su alta productividad volumétrica permite el uso de biorreactores e instalaciones más pequeñas (y más económicas). Por su parte, además admite el uso de residuos agroindustriales como sustratos, reduciendo así el costo de las materias primas y la adición de valor a estos desechos (Castilho et al, 2000; Neira-Vielma et al, 2018). Por estas razones, la SSF aparece como una estrategia de producción conveniente cuando se requieren cantidades masivas de productos, como es el caso de la industria alimentaria.

METODOLOGÍAS

Penicillium chrysogenum es una cepa proporcionada por el Instituto Antártico Argentino (IAA). Las cáscaras de semillas de soja fueron gentilmente proporcionadas por Entre Ríos Crushing SA. (Gualeguaychú, Argentina).

1.1. Determinación de la actividad transglutaminasa

La actividad enzimática se determinó midiendo la capacidad γ -glutamyltransferasa, a través de una modificación del método de Szasz (Szasz, 1974). La mezcla de reacción consistió en agregar una solución que contenía glicilglicina 100 mM en tampón Tris 100 mM, pH 8,5, luego L- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida 2,9 mM y finalmente, la dilución enzimática a evaluar. La prueba se realizó en microplacas empleando un lector EZ Read 800 Research (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido). La reacción cinética se controló espectrofotométricamente en 405 nm a 25 °C, cada 2 min durante 2 h.

La actividad TGasa se expresó como unidades/litro (U/L). A 25 °C, una Unidad (U) se definió como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto en condiciones definidas.

$$\text{Actividad en U / L} = \Delta \text{ Abs} / \text{min} \times \text{Factor}$$

$$\text{Factor} = (V_T * 1000) / (9,5 * V_s * P)$$

Dónde

V_T = Volumen total de reacción en mL

V_s = Volumen de muestra en mL

9,5 = coeficiente de absorción milimolar de 5-amino-2-nitrobenzeno en 405 nm

P = paso de la cubeta en cm.

1.2. Fermentación en sustrato sumergido (SmF) y estado sólido (SSF)

La cepa de *Penicillium chrysogenum* se aisló de microalgas marinas *Gigartina skottbergii* en Caleta Potter, Isla 25 de Mayo, Shetlands del Sur, Antártida (62° 14' 18" S, 58° 40' 00" W), durante la expedición de verano del período austral 2015-2016, en la Base Científica Argentina Carlini por el grupo de Microbiología del Instituto Antártico Argentino (IAA). La identificación de la especie se realizó mediante análisis de secuencias de la región D1/D2. Los primers o cebadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') se utilizaron para amplificar esta región (Kurtzman y Robnett, 1997). El análisis comparativo se realizó utilizando las bases de datos GenBank y UNITE, lo que resultó en una similitud > 99% con la cepa *Penicillium chrysogenum*.

Para iniciar nuestros estudios, la cepa se mantuvo en placas de Petri con medio papa-dextrosa-agar (PDA) a 12 ± 2 °C, de donde se obtuvieron los inóculos de esporas.

Para realizar un cultivo líquido, se utilizó el medio DTS (dextrosa 0,5%, triptona 0,2%, almidón 0,5%), al cual se adicionó también lisina, glutamina o lisina-glutamina como inductores en concentraciones de 0,2% p/v de cada uno. Después de 7-10 días de incubación a 12 ± 2 °C, el sobrenadante se separó del micelio por centrifugación y posterior filtrado y se almacenó el sobrenadante a -20 °C.

Los sustratos utilizados para SSF consistieron en un desecho agro-industrial, cáscaras de semillas de soja, un subproducto del procesamiento de la harina de soja. Por cada 10 g de sustrato, se agregaron 26 g de agua destilada para lograr una humedad final del 75%. La mezcla posteriormente se colocó en un Erlenmeyer de 250 mL y se esterilizó a 121 °C durante 15 min. Luego de enfriar, el sustrato se inoculó con una suspensión de esporas y se incubaron a 12 ± 2 °C bajo condiciones estáticas.

Los extractos enzimáticos fueron obtenidos de muestras fermentadas a los 0, 4, 8, 11, 14, 15 y 25 días mediante la adición de 100 mL de tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,0, y se agitó durante 15 min a 200 rpm. Se filtraron los residuos sólidos, se centrifugó la suspensión y finalmente se filtró el sobrenadante. El sobrenadante clarificado, color parduzco, conteniendo la TGasa fúngica secretada fue llamado extracto crudo (CE) y se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

2.4. Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Con el fin de explorar el enfoque más adecuado de concentración salina y perfil de precipitación, realizamos varias precipitaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 25% y 85% de saturación. Se añadió lentamente sulfato de amonio sólido al extracto crudo a 4 °C con agitación suave durante 30 min, hasta alcanzar el 25% de saturación. El precipitado se obtuvo por centrifugación durante 15 min a 4 °C.

Los sucesivos precipitados de 35, 45, 55, 65, 75 y 85% de saturación se recogieron y se disolvieron en tampón fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0. Todas las muestras, posteriormente se desalaron mediante cromatografía de exclusión molecular, para luego medir la actividad TGasa en cada fracción y la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Zor y Selinger, 1996).

2.5. Purificación de TGasa por cromatografía de intercambio aniónico (IEX)

El sobrenadante de la precipitación con sulfato de amonio al 65% se reacondicionó mediante diálisis con membrana de celulosa MWCO 12.000, en tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, overnight (ON)

a 4 °C. Esta muestra luego se cargó en una columna de matriz Q-sefarosa, previamente equilibrada con el mismo tampón de equilibración.

Las proteínas unidas a la matriz se eluyeron posteriormente en una serie de pasos isocráticos con NaCl de 0 a 1,0 M en tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0. A cada fracción recogida con volúmenes de 2 mL, se les midió la absorbancia en 280 nm, la conductividad y la actividad específica de TGasa.

2.6. Caracterización de transglutaminasa *P. chrysogenum*

2.6.1. Efecto de la temperatura

Se estudió la temperatura de reacción óptima para la TGasa a 4, 15, 20, 25, 30 y 40 °C. La actividad enzimática se determinó cada 15 min como se describió en el apartado 1.1, incubando la mezcla de reacción a la temperatura correspondiente durante 2 h. La actividad relativa de TGasa (%) se calculó usando la actividad más alta obtenida como 100%.

2.6.2. Efecto del pH

El pH óptimo se determinó probando la reacción en un intervalo de pH de 5,5 a 10,5. Se añadieron tampones a la mezcla de reacción y se registró el pH final. Para ello utilizamos tampón acetato de sodio 100 mM para pH 5,5, tampón fosfato de sodio 100 mM para pH 6,0-7,0, tampón Tris-HCl 100 mM para pH 8,0-9,0 y tampón carbonato de sodio 100 mM para pH 9,5-10,5.

La cinética de la reacción a cada pH se evaluó mediante la prueba de actividad TGasa durante 2 h a 25 °C. La actividad relativa TGasa (%) se calculó usando la actividad más alta obtenida como 100%.

2.6.3. Efecto de iones y aditivos

Se evaluó el efecto de modulación de la actividad TGasa por NaCl (0-1000 mM), KCl (0-200 mM), CaCl₂ (0-125 mM) y EDTA (0-10 mM). Además, se ensayó el efecto de otros componentes típicos utilizados para el procesamiento de alimentos, como el glutamato (Glu, 0-1,4 mM), eritorbato de sodio (E316, 0-2,4 mM) y tripolifosfato de sodio (STPP, 0-5,4 mM). Las reacciones se realizaron en las condiciones detalladas en la sección 1.1. La actividad relativa TGasa (%) se calculó usando la actividad más alta obtenida como 100%.

2.6.4. Termoestabilidad de la enzima

La estabilidad térmica de la TGasa se evaluó pre-incubando la enzima a valores de temperatura de 4, 15, 20, 25, 30 y 40 °C y determinando su actividad residual después de 0, 5, 10, 15, 20 y 40 min. La actividad de TGasa se evaluó como se refiere en la sección 1.1.

2.7. Estabilidad de almacenamiento

La estabilidad de almacenamiento de la enzima TGasa en el extracto crudo de proteínas se evaluó a 4, -20 y -80 °C durante 120 días sin agregar ningún crioprotector. Se almacenó una muestra control a 4 °C con PMSF 1 mM. (PMSF del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*), que es un inhibidor de serin-proteasas. La actividad enzimática de todas las muestras se determinó como se describe en la sección 1.1.

2.8. Electroforesis de proteínas

Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida de concentración al 5% y de resolución al 12%, seguido del revelado por tinción con colorante Coomassie Blue R-250. Se utilizó marcador de proteínas *Precision Plus Protein All Blue Standards* (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.), para estimar el peso molecular de la enzima.

2.9. Aplicación tecnológica

La fracción purificada obtenida de IEX se utilizó como aditivo para la preparación de un gel a base de gelatina para evaluar su capacidad de modificar las características estructurales y reológicas del producto. Se preparó una solución de gelatina al 6,0% p/v en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, agitando a 50 °C hasta su completa disolución, dejando enfriar a 30 °C antes de la adición del extracto enzimático. Se añadieron concentraciones de TGasa de 1,27 y 12,7 U/g de gelatina con agitación constante durante una hora a 30 °C. Las soluciones de gelatina se colocaron en un cilindro de jeringa modificado de 20 mL y luego se enfriaron a 4 °C durante 24 h para formar los geles y su posterior análisis. Se utilizó una solución de gelatina sin enzimas como muestra control.

La resistencia del gel se midió en base al método estándar de *Gelatin Manufacturers Institute of America* (GMIA, 2006). El cilindro de gel formado se retiró y se cortó en discos de 1,5 cm de altura con un diámetro final de 1,9 cm. La prueba de TPA se realizó usando un analizador de textura Instron 3342 (Illinois Tool Works Inc, IL, EE. UU.), equipado con una sonda cilíndrica de 45 mm de diámetro a una velocidad de prueba de 1 mm/seg.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

3.1. Fermentación sumergida y en estado sólido

Se observó un desarrollo micelar en SSF después de 4 días de inoculación, logrando una cobertura total del sustrato luego de 15 días de fermentación. Los niveles de actividad específica de TGasa aumentaron de manera constante hasta el día 12 ± 2 de fermentación, alcanzando una posterior estabilidad. Este perfil fue evidenciado en un ensayo previo a menor escala (datos no mostrados). Los valores máximos de actividad se obtuvieron a los 18 y 25 días de fermentación. Sin embargo, el valor de actividad específica por día de fermentación (U/L/día) alcanza el máximo nivel a los 12 ± 2 días (Fig. 1).

La cantidad de TGasa producida bajo SSF fue 10 veces mayor que la cantidad producida por SmF. Por esta razón, la SmF se ha reemplazado en la producción de enzimas en general. Este fenómeno fue reportado con anterioridad; donde un estudio sugiere que los cultivos que crecen en SSF pueden estar trabajando inherentemente como un *batch* alimentado, con una rápida oxigenación pero con un suministro lento de nutrientes, evitando la represión catabólica (Viniestra-González et al., 2003). Varios estudios dan cuenta del hecho que la expresión enzimática de los hongos difiere mucho según el sustrato. Se encontró que la expresión de lipasa de *Penicillium simplicissimum* era 3,3 veces mayor mientras crecía en SSF (Gutarra et al., 2009). Se obtuvieron resultados similares para *Penicillium restrictum*, donde el uso de fuentes de carbono fácilmente catabolizables, principalmente glucosa y ácido oleico, resultó en una actividad de lipasa más baja de 5,7 y 2,5 veces respectivamente (De Azeredo et al., 2007). Otro informe señala que la producción de celulasa extracelular por *Aspergillus niger* fue 14,6 veces mayor cuando se usaba SSF en comparación con SmF (Mrudula y Murugammal, 2011). En vista al futuro cercano, un estudio de transcriptoma de *Aspergillus oryzae*, bajo SmF y SSF, encontró que 4628 genes se expresaron diferencialmente entre ambas condiciones, siendo genes relacionados con la producción de proteínas globales regulados positivamente en SSF (Wang et al., 2010). Todos estos ejemplos avalan la selección de SSF por sobre SmF.

Aunque las funciones fisiológicas de las TGAsas de mamíferos o animales están bien estudiadas, se ha informado muy poco acerca de las TGAsas de plantas (Eckert et al., 2014). Además, casi no hay investigaciones de la función fisiológica respecto a las TGAsas fúngicas (Lipke, 2018). Algunos de estos alcances fisiológicos incluyen la señalización celular, la diferenciación celular y las funciones estructurales. Por ejemplo, es bien conocido que *Candida albicans* produce una proteína poliglutaminada Hwp1 (proteína de la pared hifal 1) en la superficie de la pared que sirve como sustrato para la TGasa de queratinocitos de mamíferos (Staab et al., 1999), lo que permite la reticulación covalente y la adhesión al huésped,

siendo crucial como mecanismo de patogénesis (Staab et al., 2004). Además, se han observado agrupaciones de proteínas con capacidad de agregación en la superficie de la pared celular de *C. albicans* (Aguado et al., 1998). Dado el hecho que la TGasa de *Penicillium chrysogenum* es una enzima extracelular, planteamos la hipótesis de que puede estar implicada en una organización estructural o agregación de las proteínas extracelulares presentes en la superficie de la pared celular, además de proporcionar adhesión al sustrato fermentado.

Figura 1

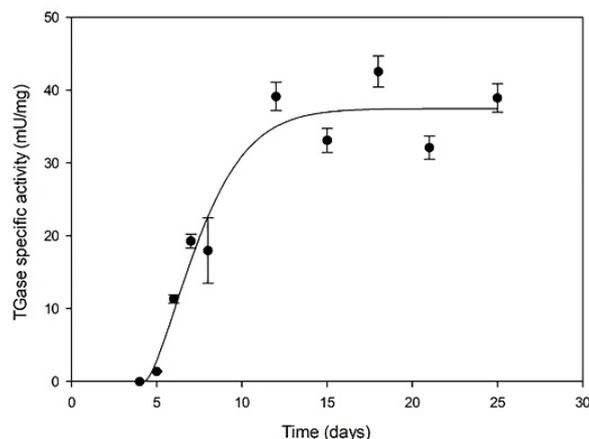


Figura 1: Actividad específica de TGasa basada en el tiempo de fermentación de las cáscaras de soja evaluados en eventos independientes (réplicas biológicas). La actividad específica aumentó de manera constante hasta el día 12 de fermentación, observándose dos valores máximos de actividad en el día 18 y 25. El ajuste utilizado fue una curva sigmoidea con $R^2 = 0,9449$. Los análisis se realizaron por duplicado.

3.2. Purificación de TGasa

El extracto crudo de SSF que contiene TGasa se fraccionó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como se describió previamente. Después de desalar con columnas HiTrap (GE Healthcare, Suecia), se analizó la actividad TGasa de cada fracción (Fig. 2A). La actividad específica máxima (10,39 U/mg) se obtuvo luego de una precipitación al 85% de saturación de sulfato de amonio (Fig. 2A) con un factor de purificación y rendimiento de 1,71 y 36,38% respectivamente (Tabla 1). Se llevaron a cabo sucesivos enriquecimientos con sales resultando una saturación del 65% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ la que retiene la mayor parte de la TGasa en forma soluble en el sobrenadante. Esta fracción se utilizó para una purificación cromatográfica adicional.

La cromatografía de intercambio aniónico con incrementos isocráticos de la concentración de NaCl permitió una mejor resolución de la fracción con actividad TGasa en comparación con la elución en gradiente (no mostrado). Esta fracción eluyó a 0,25 M de NaCl (Fig. 2B) y presentó un valor de actividad de 3,92 U/L. El factor de purificación y el rendimiento en la etapa IEX fueron de 7,16 y 5,02%, respectivamente (Tabla 1).

Figura 2

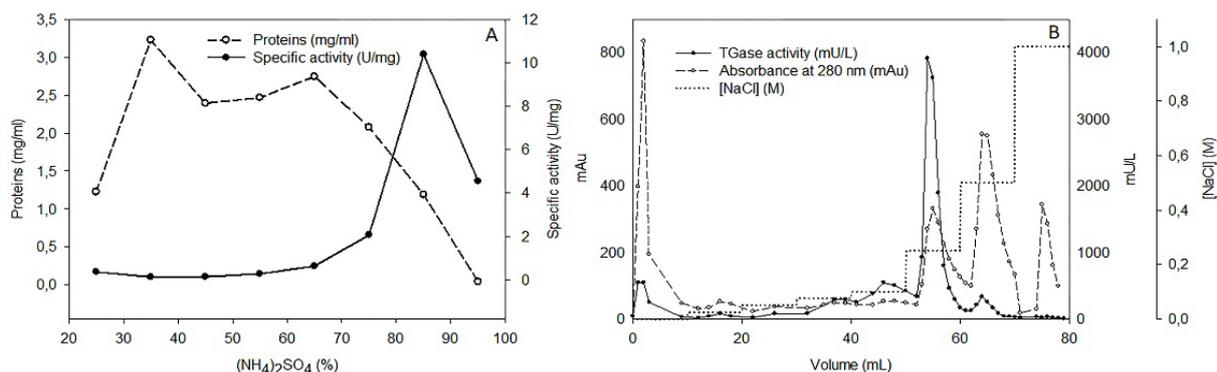


Figura 2: A) Proteínas totales y actividad específica de TGasa en las fracciones de precipitación con sulfato de amonio entre 25% y 85% de saturación; la enzima permanece en estado soluble hasta un 65% de sulfato de amonio. Los análisis se realizaron por duplicado. **B)** Cromatografía de intercambio iónico con columna Q sefarosa; la mayor cantidad de actividad TGasa se obtuvo después de la elución con 0,25 M de NaCl.

Tabla 1: Pasos de purificación de TGasa de SSF en cáscaras de soja por *Penicillium chrysogenum*.

Paso de Purificación	Proteínas Totales (mg)	Actividad Total (mU)	Actividad Específica (mU/mg)	Factor de Purificación	Rendimiento (%)
Extracto Crudo	4,46	4,87	1,09	1,00	100,00
Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄	1,62	3,02	1,86	1,71	36,38
IEX Q-sefarosa	0,22	1,75	7,81	7,16	5,02

3.3. Efecto del pH, temperatura y aditivos sobre la actividad TGasa

El sobrenadante de precipitación con sulfato de amonio al 65% se concentró por diafiltración con MWCO de 10 kDa, al mismo tiempo, se eliminó el exceso de (NH₄)₂SO₄ mediante la adición de agua bi-distilada. Este concentrado se utilizó para estudiar los efectos de las condiciones de pH y temperatura, la termoestabilidad y la modulación de la actividad de los aditivos alimentarios comunes.

El rendimiento de la actividad TGasa se evaluó en un rango de temperaturas de 4 a 40 °C (Fig. 3A). La actividad relativa máxima se observó a 30 °C (100 ± 1,68), aunque representa un mínimo aumento respecto de la actividad presentada a 25 °C (90,13 ± 1,57), se observó además, una inactivación total a 40 °C. Por su parte, el ensayo de termoestabilidad de TGasa muestra que la enzima está inactiva (actividad residual <50%) después de 20 min de incubación a 30 °C (Fig. 3D). La actividad residual no representa una disminución significativa luego de su incubación a temperaturas por debajo de 20 °C (100,55 ± 2,51, 100 ± 2,11 y 96,11 ± 4,91 para 4, 15 y 20 °C respectivamente). De manera similar, no hubo pérdida de actividad en ninguna de las condiciones de almacenamiento probadas durante el período evaluado resistiendo varios ciclos de congelación-descongelación a -80 °C (datos no mostrados). La enzima alcanza una actividad máxima en el rango de 25-30 °C, un aumento típico de la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, por un efecto termodinámico, pero se observa una inactivación total a temperaturas mesófilas (cerca de 40 °C) destacando su adaptación al frío como se describió anteriormente (Feller, 2013).

El efecto de las condiciones de pH sobre la actividad TGasa se muestra en la Figura 3B. La actividad relativa máxima se observó a pH 8,0 (100%) con tampón Tris-HCl. Este resultado es similar al pH óptimo informado para la TGasa de vieira, carpa (Nozawa et al., 1997) y ostra japonesa (Kumazawa et al., 1997); mientras que otras TGasas eucariotas reportaron valores de pH óptimos ligeramente superiores, como la obtenida de hígado de besugo (Hemung y Yongsawatdigul, 2008) y cangrejos de río (Sirikharin et al.,

2018) con una actividad óptima a pH 8,5, o la TGasa de hígado de abadejo de lucioperca con actividad óptima a pH 9,0 (Kumazawa et al., 1996).

No se observó variación en la actividad de TGasa en presencia de NaCl, KCl, Glu y E316 en el rango probado (datos no mostrados). Sin embargo, se observó un pequeño aumento ($127,78 \pm 9,62\%$) en CaCl_2 35 mM, una condición que luego se invirtió a valores de actividad normal en concentraciones más altas (Fig. 3C). Este patrón de pico de actividad de TGasa con respecto a la concentración de Ca^{2+} se informó previamente para la enzima aislada de krill antártico y se atribuyó a una interacción excesiva entre la enzima y el ion, induciendo así una estructura proteica más rígida y afectando adversamente la actividad catalítica en concentraciones más altas de Ca^{2+} (Zhang et al., 2017). Además, se ha observado que un exceso de concentración de Ca^{2+} podría inducir la oxidación de los residuos de cisteína en el dominio catalítico, principalmente en TG2 un tipo TGasas, resultando en una pérdida de actividad (Eckert et al., 2014). Hay numerosos reportes sobre la concentración óptima de Ca^{2+} para la actividad TGasa, que varía desde menos de 1 mM como la TGasa de carpa hasta 50 mM para TGasa de vieira (Nozawa et al., 1997). Así también, hay informes de TGasa no dependientes de Ca^{2+} como *Streptoverticillium sp.* y plantas (Ando et al., 1989; Mangala y Mehta, 2005), lo que revela como difiere la capacidad de modular la actividad TGasa por este ion entre diferentes especies.

Se observó una clara inhibición de la actividad TGasa con EDTA y STPP a medida que aumentaba la concentración (Fig.3C), manifestando una actividad residual de $58,33 \pm 2,92\%$ a 10 mM de EDTA y $44,43 \pm 4,53\%$ a 2,7 mM de STPP, siendo este último un inhibidor más fuerte.

En este contexto, los ensayos realizados sugieren que la TGasa de *Penicillium chrysogenum* es dependiente de Ca^{2+} pero este cofactor está siendo suficientemente suministrado durante la fermentación por el sustrato.

Figura 3

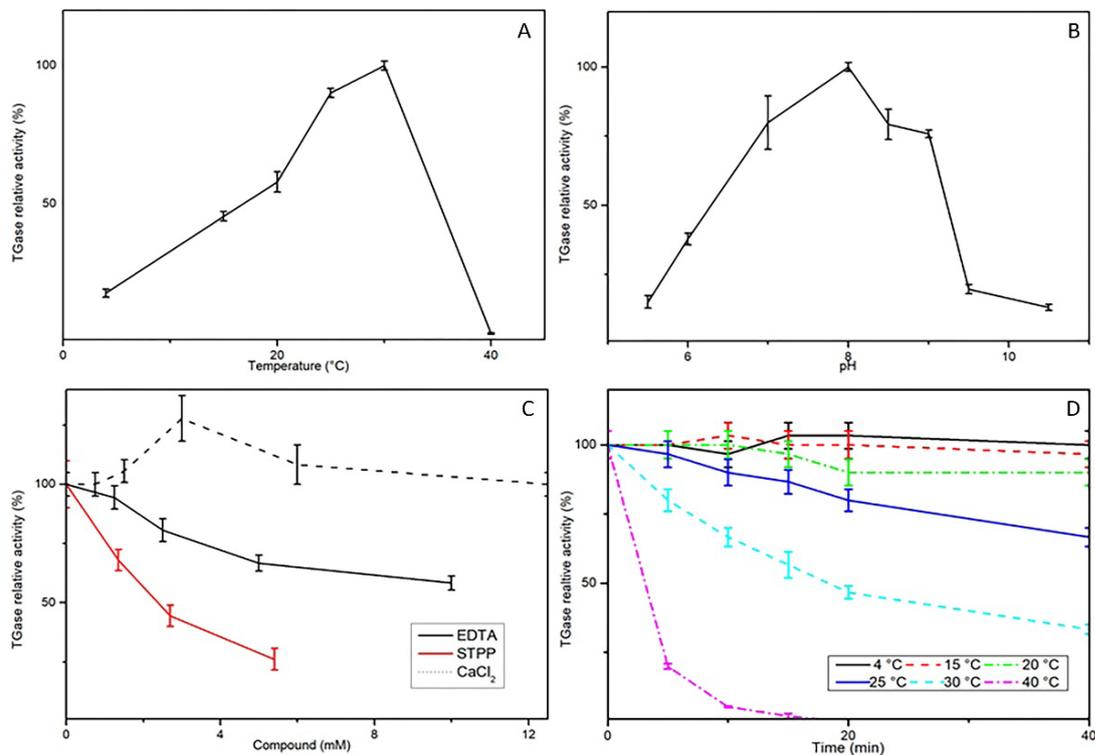


Figura 3: A) Efecto de la condición de temperatura sobre la reacción de TGasa; la actividad máxima se observó a 30 °C. **B)** Efecto del pH sobre la reacción de TGasa; la actividad máxima se alcanzó a pH 8. **C)** Efecto de Ca^{2+} e inhibidores sobre la actividad TGasa (la escala para la concentración de Ca^{2+} disminuye en un orden de magnitud); tanto EDTA como STPP tuvieron un efecto negativo sobre la actividad TGasa mientras que la concentración de Ca^{2+} mostró un efecto positivo en el rango de 35 mM. **D)** Termoestabi-

lidad de TGasa; la enzima se inactivó después de 20 min a 30 °C y en menos de 5 min a 40 °C mientras que retuvo hasta el 67% de actividad después de 40 min a 25 °C. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.4. SDS-PAGE y peso molecular

La TGasa parcialmente purificada se evaluó mediante SDS-PAGE. Se recuperó muy poca proteína de la precipitación con sulfato de amonio al 85% (Fig. 2A), esto podría deberse a la dilución después del paso de desalinización, necesaria para asegurar una correcta electroforesis. Se observaron dos bandas, una de 37 kDa y otra de 30 kDa aproximadamente, tanto en la precipitación con sulfato de amonio como en la fracción de cromatografía IEX tras la elución con NaCl 0,25 M (Fig. 4B).

El análisis del genoma de referencia para *Penicillium chrysogenum* disponible en la base de datos GenBank reveló la presencia de una proteína putativa perteneciente a la familia de la gamma-glutamil transferasa (gen *YwrD*, número de acceso KZN85939.1). El análisis de la secuencia de proteínas con la herramienta Compute pI / Mw de ExPasy reveló una masa molecular estimada de 64,43 kDa y un pI de 5,68. Además, la comparación de la secuencia con la base de datos pública de BLAST mostró una similitud de alto nivel con varias gamma-glutamil transferasas de diferentes especies de hongos. Esto podría indicar que el MW de las TGasas es de aproximadamente 67 kDa pero sufrió degradación después de los pasos de diálisis antes de la ejecución de SDS-PAGE, dando como resultado las dos bandas de 37 kDa y 30 kDa. La diferencia aproximada de 2,57 kDa se puede explicar por modificación postraduccional (principalmente glicosilación) o teniendo en cuenta el porcentaje de aminoácidos ácidos (Guan et al., 2015).

Una banda con un peso molecular de 67 kDa es visible en la muestra de extracto crudo y es consistente con las reportadas para otras TGasas eucariotas como hígado de cobayo, hígado de abadejo de lucioperca e hígado de besugo, que se estimaron en 76,6, 77 kDa y 95 kDa respectivamente (Ikura et al., 1988; Kumazawa et al., 1996; Worratao y Yongsawatdigul, 2005), pero no tan pequeñas como las TGasas procariotas de *Streptomyces sp.* del orden de 37 kDa (Rickert et al., 2016).

Figura 4

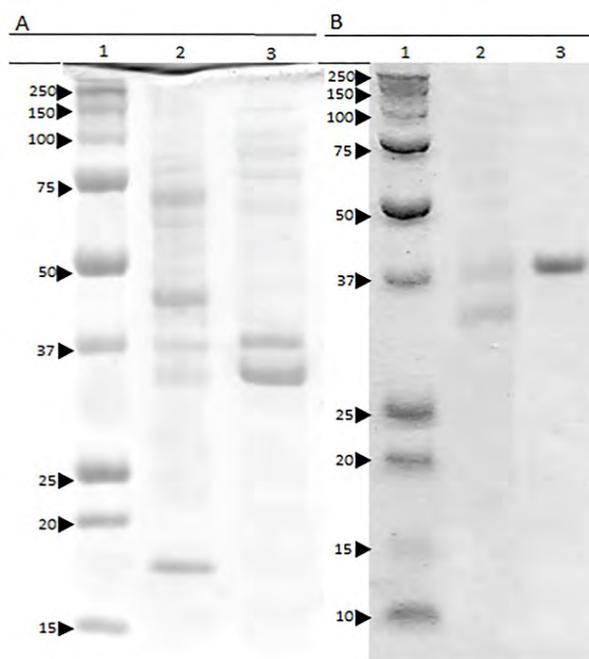


Figura 4: SDS-PAGE de purificación de TGasa. **A)** Calle 1: marcador estándar; Calle 2: Extracto crudo de SSF; Calle 3: fracción precipitada con sulfato de amonio 85%. **B)** Calle 1: marcador estándar; Calle 2: fracción de IEX después de elución con NaCl 0,25 M; Calle 3: estándar comercial de TGasa. Una banda de 67 kDa es visible en el extracto crudo (A, calle 2), posible correspondencia

con γ -glutamyl transferasa (YwrD) de *Penicillium chrysogenum*. Mientras que dos bandas de 30 y 37 kDa son visible después de la precipitación de amonio y cromatografía IEX (A, calle 3 y B calle 2) debido a una posible degradación de proteínas tras los pasos de exposición a diálisis.

3.5. Aplicación tecnológica

La fracción obtenida de IEX se utilizó para realizar un gel a base de gelatina en frío. Se utilizaron dos concentraciones de TGasa y una muestra control con agua destilada. Se emplearon las condiciones óptimas de concentración de Ca^{2+} , pH y temperatura para asegurar la máxima actividad de la enzima. Luego del tiempo de incubación, se midió la resistencia del gel mediante TPA como fue descrito previamente.

Se comprobó que la fuerza del gel aumentó significativamente con la adición de 1,27 U/g de enzima, hasta un 32,25% en comparación con aquellas muestras sin TGasa (Tabla 2). El producto final también resultó en un aumento de la gomosidad y consistencia del 30,50% y 30,11% respectivamente ($p < 0,05$). Sin embargo, no hubo cambios en los valores de elasticidad / deformabilidad, lo que explica el aumento de la consistencia. El hecho de que la dureza aumente dejando intacta la elasticidad representa una ventaja para las aplicaciones tecnológicas, de lo contrario, el producto final podría tener una sensación desagradable en la boca (Calvarro et al., 2016).

Por otro lado, concentraciones más altas de TGasa dieron como resultado una disminución en la fuerza del gel, este efecto ya se había visto antes y se atribuyó a la ruptura de la estructura de triple hélice de la gelatina por un entrecruzamiento covalente excesivo. Estas modificaciones pueden interferir con la agregación intermolecular, impidiendo la formación de la red de gel (Norziah et al., 2009). Algunos productores de TGasa también sostienen la idea que debe añadirse muy poca TGasa para obtener los resultados deseados. Según ARYSA ARGENTINA S.A. (Villa Tesei, Bs. As., Argentina), el 0,05% p/p de su producto TG2S (TGasa liofilizada grado alimenticio) debe usarse para mejorar la calidad del pan. Aunque no especifican ningún valor de actividad, estimamos una equivalencia de 3,3 U/g de proteína.

Otro ejemplo de TGasa liofilizada de grado alimenticio es PROBIND TXo, producido por BDF Natural Ingredients S.L. (Girona, España). La hoja de datos del producto establece que se deben utilizar 0,1 U/g de proteína para aumentar el volumen de pan y se deben utilizar 0,1 a 0,5 U/g de proteínas para mejorar las propiedades de los productos de panadería sin gluten. Estos resultados avalan el hecho de que el efecto de la TGasa variará significativamente según la fuente y el tipo de proteína sustrato (Rachel y Pelletier, 2013).

Tabla 2: Parámetros del análisis TPA. Los valores se dan como media y desviación estándar. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Los valores de dureza y gomosidad entre las tres muestras fueron significativamente diferentes mientras que los valores de elasticidad no fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Muestra	Dureza (N)	Gomosidad (N)	Elasticidad
Gelatina + 0 mU/mg TGasa	3,08 ± 0,30	2,99 ± 0,29	0,99 ± 0,01
Gelatina + 1,27 mU/mg TGasa	4,07 ± 0,32	3,91 ± 0,33	0,93 ± 0,01
Gelatina + 12,7 mU/mg TGasa	2,43 ± 0,28	2,20 ± 0,21	0,94 ± 0,04

4. CONCLUSIONES

Se seleccionó una cepa de hongos psicrófilos antárticos capaces de expresar actividad TGasa. Esta cepa de *Penicillium chrysogenum* presentó una excelente capacidad de fermentación en estado sólido de cáscaras de semillas de soja con muy buen desarrollo micelar. El tiempo de fermentación se optimizó para lograr la mayor actividad específica de TGasa.

La actividad enzimática no se vio afectada en presencia de los compuestos comúnmente usados en formulaciones alimentarias, demostrando su compatibilidad para una aplicación industrial. La temperatura necesaria para lograr la máxima actividad enzimática fue de 30 °C, sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre la condición de 25 °C y 30 °C, mientras que la inactividad total se observó a 40 °C.

Se obtuvo un extracto semipurificado de alta actividad TGasa que se utilizó para modular la capacidad de gelificación de la gelatina en frío, observándose un aumento de la resistencia del gel por acción enzimática. Sin embargo, las duras condiciones durante las etapas de diálisis podrían haber sido responsables de un evento de degradación que explica la purificación de bajo rendimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Aguado, C., Ruíz-Herrera, J., Iranzo, M., Sentandreu, R., Mormeneo, S., 1998. *Reaggregation and binding of cell wall proteins from Candida albicans to structural polysaccharides*. Res. Microbiol. 149, 327–338. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(98\)80438-5](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(98)80438-5).
- 2- Ahmmed, A.M., Kawahara, S., Ohta, K., Nakade, K., Soeda, T., Muguruma, M., 2007. *Differentiation in improvements of gel strength in chicken and beef sausages induced by transglutaminase*. Meat Sci. 76, 455–462. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.01.002>.
- 3- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H., Motoki, M., 1989. *Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms*. Agric. Biol. Chem. 53, 2613–2617. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869735>.
- 4- Calvarro, J., Perez-Palacios, T., Ruiz, J., 2016. *Modification of gelatin functionality for culinary applications by using transglutaminase*. Int. J. Gastron. Food Sci. 5–6, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2016.11.001>.
- 5- Castilho, L.R., Polato, C.M.S., Baruque, E.A., Sant'Anna, G.L., Freire, D.M.G., 2000. *Economic analysis of lipase production by Penicillium restrictum in solid-state and submerged fermentations*. Biochem. Eng. J. 4, 239–247. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00052-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00052-2).
- 6- Cavicchioli, R., Siddiqui, K.S., Andrews, D., Sowers, K.R., 2002. *Low-temperature extremophiles and their applications*. Curr. Opin. Biotechnol. 13, 253–261. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00317-8).
- 7- De Azeredo, L.A.I., Gomes, P.M., Sant'Anna, G.L., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., 2007. *Production and regulation of lipase activity from Penicillium restrictum in submerged and solid-state fermentations*. Curr. Microbiol. 54, 361–365. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0425-7>.
- 8- Eckert, R.L., Kaartinen, M.T., Nurminskaya, M., Belkin, A.M., Colak, G., Johnson, G.V.W., Mehta, K., 2014. *Transglutaminase regulation of cell function*. Physiol. Rev. 94, 383–417. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2013>.
- 9- Feller, G., 2013. *Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology*. Scientifica (Cairo). 2013, 1–28. <https://doi.org/10.1155/2013/512840>.
- 10- Folk, J.E., Chung, S.I., 2006. *Molecular and Catalytic Properties of Transglutaminases*. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 38, 109–191. <https://doi.org/10.1002/9780470122839.ch3>.
- 11- Gerber, U., Jucknischke, U., Putzien, S., Fuchsbaauer, H.L., 1994. *A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from Streptovorticillium mobaraense*. Biochem. J. 299, 825–829. <https://doi.org/10.1042/bj2990825>.
- 12- Guan, Y., Zhu, Q., Huang, D., Zhao, S., Jan Lo, L., Peng, J., 2015. *An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide*. Sci. Rep. 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep13370>.

- 13- Gutarra, M.L.E., De Godoy, M.G., Silva, J.D.N., Guedes, I.A., Lins, U., Castilho, L.D.R., Freire, D.M.G., 2009. *Lipase production and Penicillium simplicissimum morphology in solid-state and submerged fermentations*. *Biotechnol. J.* 4, 1450–1459. <https://doi.org/10.1002/biot.200800298>.
- 14- Hemung, B.-O., Yongsawatdigul, J., 2008. *Partial purification and characterization of transglutaminase from threadfin bream (Nemipterus sp.) liver*. *J. Food Biochem.* 32, 182–200. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2008.00154.x>.
- 15- Hiller, B., Lorenzen, P.C., 2009. *Functional properties of milk proteins as affected by enzymatic oligomerisation*. *Food Res. Int.* 42, 899–908. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.04.022>
- 16- Hong, S., Lee, C.W., Jang, S.H., 2012. *Purification and properties of an extracellular esterase from a cold-adapted Pseudomonas mandelii*. *Biotechnol. Lett.* 34, 1051–1055. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0866-y>
- 17- Ikura, K., Nasu, T.A., Yokota, H., Tsuchiya, Y., Sasaki, R., Chiba, H., 1988. *Amino Acid Sequence of Guinea Pig Liver Transglutaminase from Its cDNA Sequence*. *Biochemistry* 27, 2898–2905. <https://doi.org/10.1021/bi00408a035>.
- 18- Javed, A., Iqbal, J., 2016. *Psychrophilic Microbial Enzymes Implications in Coming Biotechnological Processes*. *Am. Sci. Res. J. Eng. Technol. Sci.* 23, 103–120.
- 19- Kumazawa, Y., Nakanishi, K., Yasueda, H., Motoki, M., 1996. *Purification and Characterization of Transglutaminase from Walleye Pollack Liver*. *Fish. Sci.* 62, 959–964. <https://doi.org/10.2331/fishsci.62.959>.
- 20- Kumazawa, Y., Sano, K.I., Seguro, K., Yasueda, H., Nio, N., Motoki, M., 1997. *Purification and Characterization of Transglutaminase from Japanese Oyster (Crassostrea gigas)*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 604–610. <https://doi.org/10.1021/jf9604596>.
- 21- Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa, Y., Kuhara, C., Soeda, T., 1997. *Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking*. *J. Food Sci.* 62, 488–490. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04412>.
- 22- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1997. *Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene*. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1216–1223. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.5.1216-1223.1997>.
- 23- Lauber, S., Henle, T., Klostermeyer, H., 2000. *Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt*. *Eur. Food Res. Technol.* 210, 305–309. <https://doi.org/10.1007/s002170050554>.
- 24- Lipke, P.N., 2018. *What we do not know about fungal cell adhesion molecules*. *J. Fungi* 4. <https://doi.org/10.3390/jof4020059>.
- 25- Mangala, L.S., Mehta, K., 2005. *Tissue Transglutaminase (TG2) in Cancer Biology*, in: *Transglutaminases*. KARGER, Basel, pp. 125–138. <https://doi.org/10.1159/000084237>.
- 26- Martins, I.M., Matos, M., Costa, R., Lopes-da-Silva, F., Pascoal, A., Estevinho, L.M., Choupina, A.B., 2014. *Transglutaminases: Recent achievements and new sources*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6957–6964. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5894-1>.
- 27- Mrudula, S., Murugammal, R., 2011. *Production of cellulase by Aspergillus niger under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate*. *Brazilian J. Microbiol.* 42, 1119–1127. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300033>.
- 28- Neira-Vielma, A.A., Aguilar, C.N., Ilyina, A., Contreras-Esquivel, J.C., Carneiro-da-Cunha, M. das G., Michelena-Álvarez, G., Martínez-Hernández, J.L., 2018. *Purification and biochemical characterization of an Aspergillus niger phytase produced by solid-state fermentation using triticale residues as substrate*. *Biotechnol. Reports* 17, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.12.004>.
- 29- Norziah, M.H., Al-Hassan, A., Khairulnizam, A.B., Mordi, M.N., Norita, M., 2009. *Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: Thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties*. *Food Hydrocoll.* 23, 1610–1616. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.12.004>.

- 30- Nozawa, H., Mamegoshi, S.I., Seki, N., 1997. *Partial purification and characterization of six transglutaminases from ordinary muscles of various fishes and marine invertebrates*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 118, 313–317. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00062-X](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00062-X)
- 31- Pandey, A., 2003. *Solid-state fermentation*. *Biochem. Eng. J.* 13, 81–84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3).
- 32- Rachel, N.M., Pelletier, J.N., 2013. *Biotechnological applications of transglutaminases*. *Biomolecules* 3, 870–888. <https://doi.org/10.3390/biom3040870>.
- 33- Rickert, M., Strop, P., Lui, V., Melton-Witt, J., Farias, S.E., Foletti, D., Shelton, D., Pons, J., Rajpal, A., 2016. *Production of soluble and active microbial transglutaminase in Escherichia coli for site-specific antibody drug conjugation*. *Protein Sci.* 25, 442–455. <https://doi.org/10.1002/pro.2833>.
- 34- Santos, M., Torne, J., 2009. *Recent Patents on Transglutaminase Production and Applications: A Brief Review*. *Recent Pat. Biotechnol.* 3, 166–174. <https://doi.org/10.2174/187220809789389180>.
- 35- Sirikharin, R., Söderhäll, I., Söderhäll, K., 2018. *Characterization of a cold-active transglutaminase from a crayfish, Pacifastacus leniusculus*. *Fish Shellfish Immunol.* 80, 546–549. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.042>.
- 36- Staab, J.F., Bahn, Y.S., Tai, C.H., Cook, P.F., Sundstrom, P., 2004. *Expression of transglutaminase substrate activity on Candida albicans germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification*. *J. Biol. Chem.* 279, 40737–40747. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406005200>.
- 37- Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L., Sundstrom, P., 1999. *Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of Candida albicans Hwp1*. *Science* 283, 1538–1538. <https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1538>.
- 38- Szasz, G., 1974. *New substrates for measuring gamma-glutamyl transpeptidase activity*. *Z Klin Chem Klin Biochem* 228–228.
- 39- Téllez-Luis, S.J., Uresti, R.M., Ramírez, J.A., Vázquez, M., 2002. *Low-salt restructured fish products using microbial transglutaminase as binding agent*. *J. Sci. Food Agric.* <https://doi.org/10.1002/jsfa.1132>.
- 40- Trespalacios, P., Pla, R., 2007. *Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels*. *Food Chem.* 100, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.058>.
- 41- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gomez, S. de J., Díaz-Godínez, G., Augur, C., 2003. *Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems*. *Biochem. Eng. J.* 13, 157–167. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6).
- 42- Wang, B., Guo, G., Wang, C., Lin, Y., Wang, X., Zhao, M., Guo, Y., He, M., Zhang, Y., Pan, L., 2010. *Survey of the transcriptome of Aspergillus oryzae via massively parallel mRNA sequencing*. *Nucleic Acids Res.* 38, 5075–5087. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq256>.
- 43- Wilhelm, B., Meinhardt, A., Seitz, J., 1996. *Transglutaminases: Purification and activity assays*. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 684, 163–177. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00562-5](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00562-5).
- 44- Worratao, A., Yongsawatdigul, J., 2005. *Purification and characterization of transglutaminase from Tropical tilapia (Oreochromis niloticus)*. *Food Chem.* 93, 651–658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.044>.
- 45- Zhang, Y., He, S., Simpson, B.K., 2017. *A cold active transglutaminase from Antarctic krill (Euphausia superba): Purification, characterization and application in the modification of cold-set gelatin gel*. *Food Chem.* 232, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.135>.
- 46- Zor, T., Selinger, Z., 1996. *Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies*. *Anal. Biochem.* 236, 302–308. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0171>.

INDICADORES DE PRODUCCIÓN:

- 1- *"Screening de enzimas extremófilas y su importancia en el procesamiento de los alimentos"*. Glodowsky, A; Fernández Preisegger, M; Coria, S; Mac Cormack W; Levin, G. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016). Córdoba, Argentina. 2-4 de Noviembre de 2016.
- 2- *"Enzimas activas a bajas temperaturas aisladas del territorio antártico y sus potenciales aplicaciones biotecnológicas en la industria agroalimentaria"*. Fernández Preisegger, M; Glodowsky, A; Ruberto, L; Mac Cormack W; Levin, G. Congreso Nacional de Biotecnología 2017 (Biotec 2017). Murcia, España. 18-21 de Junio de 2017.
- 3- *"Obtención y caracterización de transglutaminasa psicrófila con potencial aplicación en tecnología alimentaria"*. Glodowsky A; Bordin, J; Saporittis, K; Genevois, C; Ruberto, L; Mac Cormack, W; Levin, G. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018). 1-3 de Octubre de 2018.
- 4- *"Cold active transglutaminase from antarctic Penicillium chrysogenum: Partial purification, characterization and potential application in food technology"*. Glodowsky A. P; Ruberto, L. A; Marorell, M. M; Mac Cormack, W. P; Levin, G. J. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 29 (2020) 101807. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101807>

PID 9091

Denominación del Proyecto

Desarrollo de bioprocesos a bajas temperaturas mediante el uso de psicrozimas con potencial aplicación en la industria alimentaria

Director

Gustavo Javier Levin

Unidad de Ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Bromatología

Área o disciplina científica

Biotecnología alimentaria

Instituciones intervinientes públicas o privadas

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Contacto

glevin@conicet.gov.ar

Integrantes del proyecto

Docentes: María C. Melchiori.

Estudiantes de Posgrado: Alejandro Glodowsky; Mariana Fernández Preisegger.

Colaboradora: Carolina Genevois.

Becarias: Johanna A. Bordin; Karen Saporittis

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

29/08/2017 y 28/12/2019

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 248/22 (26/08/2022)