



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**AUTODISPLAY DE UNA XILANASA EN CÉLULAS COMPLETAS
PARA LA DEGRADACIÓN DE HEMICELULOSA Y OBTENCIÓN DE
BIOCOMBUSTIBLES**

Tesis que presenta

I.B.P. Carlos Joel Salas Montantes

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez

Dr. Victor Emmanuel Balderas Hernández

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2017



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Autodisplay de una xilanasas en células completas para la degradación de hemicelulosa y obtención de biocombustibles**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Carlos Joel Salas Montantes** y aprobada el **8 de diciembre de 2017** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio De León Rodríguez
Codirector de la tesis

Dr. Victor Emmanuel Balderas Hernández
Codirector de la tesis

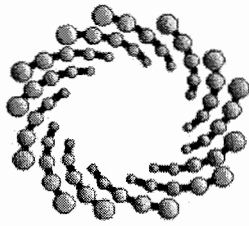
Dr. Luis Manuel Rosales Colunga
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Antonio De León Rodríguez y el Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 590382 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Se agradece al financiamiento de CONACyT-ProNal 247498 SENER-CemieBio 249565.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 175 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 8 días del mes de diciembre del año 2017, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Luis Manuel Rosales Colunga	Presidente	UASLP
Dr. Victor Emmanuel Balderas Hernández	Secretario	IPICYT
Dr. Antonio De León Rodríguez	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Carlos Joel Salas Montantes

sobre la Tesis intitulada:

Autodisplay de una xilanasa en células completas para la degradación de hemicelulosa y obtención de biocombustibles

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Antonio De León Rodríguez
Dr. Victor Emmanuel Balderas Hernández

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:25 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 8 días del mes de diciembre de 2017.


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Agradecimientos

Primero me gustaría agradecer a mi asesor de tesis el Dr. Antonio De León Rodríguez por su asesoría y abrirme las puertas de su laboratorio.

A el Dr. Víctor Balderas Hernández por sus conocimientos, orientaciones, manera de trabajar y paciencia que fueron fundamentales para la finalización de la tesis, así como demostrarme que siempre hay tiempo para disfrutar de la vida.

Al Dr. Manuel Rosales por sus sugerencias aportadas a esta tesis.

Al Dr. Abraham Vidal Limon, por su asesoría en proteínas y el diseño del vector, transmitirme sus conocimientos y trucos en el laboratorio, pero sobre todo su entusiasmo en aprender siempre cosas nuevas y darme una perspectiva diferente de la ciencia.

Al M.C. Sergio (Pedero) Calderón, por sus conocimientos en biología molecular que me salvaron en más de una ocasión y demostrarme que la ciencia siempre tiene trucos.

Al M.C. Ángel López, por su asesoría en HPLC y en la parte de análisis de datos, así como su punto de vista en algunos experimentos.

A la M.C. Cecy Álvarez, por transmitirme sus conocimientos en fermentaciones y darme ánimos cuando lo necesitaba.

Al Dr. Sergio (Science) Cisneros, por dejarme en claro que la curiosidad en la ciencia y las ganas de siempre innovar van más allá de lo posible y también de lo que digan los demás. Que viva la ciencia!!!

A Kelly, Marco, Karen, Gil y todos los integrantes del laboratorio 4 por sus ánimos y apoyo, además de todas las fiestas que por supuesto fueron vitales para la conclusión de esta tesis.

De manera general agradezco a los profesores que han contribuido a mi formación, ya que sin sus conocimientos y no habría sido posible terminar esta parte del camino.

Mis amigos y compañeros de generación (Alain, Daniel, Diana, Faby, Fermín, Fitzya, Gabriel, Gaby, Grecia, Jess, Kelly, Marce, Moni Monse, Moni Gaby y Paulina) por el apoyo, las alegrías, las fiestas y pedas, esos días de estudio, las dificultades, todo lo que vivimos a lo largo de nuestra formación, han hecho posible darnos aliento para llegar hasta el final.

A mis amigos Nancy, Ely, Kary y Felipe que me dieron ánimos a seguir y no darme por vencido nunca.

A mi familia, a mis padres, que siempre me dieron palabras de aliento, una gran paciencia, amor y cariño, me enseñaron a continuar, a no dejarme vencer por las dificultades que uno pasa como estudiante. Ellos con la ayuda de Dios, han sabido educarme y darme todo su apoyo para lograr mis más grandes metas.

A mi madre, que me demostró a no rendirme nunca y no perder la esperanza ni la fe.

Muchas gracias.

“La ciencia no es sino una perversión de sí misma, a menos que tenga como objetivo final el mejoramiento de la humanidad”

— Nikola Tesla

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
Resumen	x
Abstract	xi
1 Introducción	1
2 Materiales y métodos	5
2.1 Diseño del gen sintético <i>xynA-aida</i> .	5
2.2 Transformación de las cepas de <i>E. coli</i> TOP10 y WDHL.	6
2.3 Ensayo cualitativo en placa de la actividad xilanasa.	7
2.4 Preparación de las células para la reacción enzimática.	7
2.5 Temperatura óptima de actividad xilanasa.	8
2.6 pH óptimo de actividad xilanasa.	8
2.7 Efecto de la concentración de calcio en la actividad xilanasa.	9
2.8 Cálculo de las constantes catalíticas de biocatálisis de célula completa.	9
2.9 Medición de la actividad xilanasa por método de DNS.	10
3 Resultados	11
3.1 Diseño del gen sintético <i>xynA-aida</i>	11
3.2 Transformación de las cepas de <i>E. coli</i> TOP10 y WDHL	12
3.3 Ensayo cualitativo en placa de la actividad xilanasa	12
3.4 Temperatura y pH óptimos de actividad xilanasa	12
3.5 Efecto de la concentración de calcio en la actividad xilanasa	13
3.6 Cálculo de las constantes catalíticas de biocatálisis de célula completa	13
4 Discusión	15
5 Conclusiones	32
6 Perspectivas	33
7 Bibliografía	34

Lista de figuras

Figura 1. Biocatálisis de célula completa	22
Figura 2. Sistema <i>autodisplay</i> AIDA.	23
Figura 3. Vector pAIDA-xynA	24
Figura 4. ADN plasmídico de <i>E. coli</i> WDHL y TOP10	25
Figura 5. Detección de la actividad xilanasa en placa	26
Figura 6. Efecto de la temperatura en la actividad xilanasa	27
Figura 7. Efecto del pH en la actividad xilanasa	28
Figura 8. Efecto de la concentración de calcio en la actividad xilanasa	29
Figura 9. Curva de Michaelis-Menten de xynA anclada a WDHL y TOP10	30

Lista de tablas

Tabla 1. Xilanasas usadas para hidrólisis de xilanos

31

RESUMEN

“Autodisplay de una xilanasa en células completas para la degradación de hemicelulosa y obtención de biocombustibles”.

Para mitigar los efectos ambientales causados por el uso de combustibles fósiles, se planea impulsar el uso de biocombustibles. Actualmente su producción se basa en la fermentación de carbohidratos obtenidos de cultivos destinados a la alimentación. Con la finalidad de consolidar un bioproceso económicamente viable a comparación de los ya establecidos, se propone obtener biocombustibles a partir de desechos agroindustriales ricos en material hemicelulósico. Sin embargo, uno de los retos a enfrentar es lograr la degradación eficiente del polímero hemicelulosa para la obtención de monosacáridos que puedan posteriormente ser fermentados. Para ello, el objetivo de este trabajo fue el uso del sistema *autodisplay* AIDA de *Escherichia coli*, para expresar en la superficie de esta bacteria la enzima endo-1,4- β -xilanasa proveniente de *Clostridium cellulovorans* para llevar a cabo biocatálisis de célula completa y así, degradar hemicelulosa. Para lo cual, se diseñó el vector pAIDA-xynA y cuya enzima que codifica en su secuencia tiene la capacidad de degradar xilanos puros con una actividad xilanolítica específica de 270.96 U mg⁻¹ y 1017.22 U mg⁻¹; para cepas de *E. coli* WDHL y TOP10 respectivamente, bajo las condiciones óptimas de temperatura a 55°C y pH de 6.5. Se calcularon las constantes catalíticas K_m y V_{max} de la xilanasa anclada a la superficie de TOP10 que fueron $K_{mapp}=6.01$ mg mL⁻¹ y $V_{maxapp}= 4.13 \times 10^{-2}$ mg mL⁻¹ min⁻¹ y WDHL las cuales fueron $K_{mapp}= 7.52$ mg mL⁻¹ y $V_{maxapp}= 3 \times 10^{-2}$ mg mL⁻¹ min⁻¹. Además, la xilanasa en la cepa WDHL mostro una inhibición por sustrato, tal vez debido al anclaje de la enzima en la membrana externa. Interesantemente el CaCl₂ tiene un efecto potenciador de la actividad xilanolítica en la cepa TOP10 y en la cepa WDHL alcanzando un 240% y 120%, respectivamente. Los resultados indican que el vector diseñado pAIDA-xynA es funcional para expresar enzimas xilanolíticas y realizar biocatálisis de célula completa para la hidrólisis de material hemicelulósico.

Palabras claves: *xilanasa, E. coli, AIDA, autodisplay, biocatálisis de célula completa, hemicelulosa*

ABSTRACT

“Autodisplay of xylanase in whole cell for hemicellulose degradation and biofuels production”.

The use of biofuels has been increasing with the purpose of minimizing the impact caused by the use of fossil fuels in the environment. Nowadays, their production is based on the fermentation of carbohydrates from food crops. With the goal to obtaining a more affordable and viable consolidated bioprocess than others known, we intend to obtain biofuels from hemicellulose rich agroindustrial waste sources. However, another challenge we face is achieving the efficient degradation of hemicellulose polymer to obtain fermentable monosaccharides. For that, the objective of this work was the use of *autodisplay* AIDA system from *Escherichia coli*, to express on this bacterial surface the endo-1,4- β -xylanase enzyme from *Clostridium cellulovorans* to carry out whole cell biocatalysis and hydrolyse hemicellulose. For which, it was designed pAIDA-xynA vector and the enzyme that it codes, has xylan degradation capacity with the high xylanolytic specific activity of 270.96 U mg⁻¹ y 1017.22 U mg⁻¹; for *E. coli* WDHL and TOP10 strains respectively, over optimal conditions of temperature 55°C and pH de 6.5. In the same way, we calculated catalytic constants k_m and V_{max} of anchored xylanase on TOP10 strain surface which were $K_{mapp}=6.01$ mg mL⁻¹ and $V_{maxapp}= 4.13 \times 10^{-2}$ mg mL⁻¹ min⁻¹ and anchored on WDHL strain surface which were $K_{mapp}= 7.52$ mg mL⁻¹ and $V_{maxapp}= 3 \times 10^{-2}$ mg mL⁻¹ min⁻¹. Besides, anchored xylanase on WDHL strain surface performed a substrate inhibition perhaps for the anchorage of the enzyme in the outer membrane. Interestingly, CaCl₂ had an enhanced effect on the xylanolytic activity of TOP10 strain and WDHL strain reached about 240% and 120%, respectively. This suggests that designed pAIDA-xynA vector has the ability to express xylanolytic enzymes to carry out whole cell biocatalysis and so hydrolyse hemicellulose feedstock.

Keywords: *xylanase, E. coli, AIDA, autodisplay, whole cell biocatalysts, hemicellulose.*

1 INTRODUCCIÓN

La humanidad afronta una grave problemática debido al aumento en la demanda energética mundial, el agotamiento de los combustibles fósiles, el incremento en el precio del petróleo y las dificultades ambientales causadas por los gases de efecto invernadero, tales como la contaminación del aire y el calentamiento global. Esta situación demanda urgentemente fuentes alternativas de energía basadas en procesos sustentables, renovables y amigables con el ambiente, que además posibiliten la captura de CO₂ (Donohue and Cogdell, 2006). Una alternativa energética son los biocombustibles como el etanol, el cual es un compuesto químico obtenido a partir de la fermentación de carbohidratos y se espera que la producción de biocombustibles aumente considerablemente, como es el caso de la Comisión de la Europea, la cual espera sustituir el 20% de los combustibles fósiles para transporte con biocombustibles para el año 2020 (Hahn-Hägerdal et al., 2006).

Actualmente, el proceso de producción del etanol se enfoca a la fermentación de carbohidratos obtenidos a partir de biomasa hemicelulósica. La hemicelulosa es un polisacárido presente en la pared celular de las plantas, la cual tiene enlaces β -(1→4). El mayor componente de la hemicelulosa son los xilanos, los cuales son los segundos polisacáridos más importantes y abundantes en la naturaleza. A su vez, los xilanos pueden estar constituidos principalmente por xilosa y arabinosa (Scheller and Ulvskov, 2010). Esta compleja red polimérica necesita de un pretratamiento para liberar los carbohidratos fermentables que la conforman, mediante un proceso de hidrólisis llamado sacarificación, utilizando métodos térmicos, físicos y enzimáticos, siendo estos últimos los más prometedores (Hahn-Hägerdal et al.,

2006). Para la liberación de los carbohidratos fermentables atrapados en los xilanos de la biomasa hemicelulósica es necesaria la acción de enzimas xilanólíticas. Estas enzimas son: endo-1,4- β -xilanasas (EC 3.2.1.8), β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), α -glucuronidasas (EC 3.2.1.139) y acetilxilano esterasas (EC 3.1.1.72). Las endo-1,4- β -xilanasas con nomenclatura EC 3.2.1.8, son las enzimas que degradan el polisacárido lineal β -1,4-xilano a xilo-oligosacaridos de longitud variable y a monómeros de D-xilosa en algunos casos (Biswas et al., 2014; Dodd and Cann, 2009). Un ejemplo es la enzima codificada por el gen *xynA* de *Clostridium cellulovorans* que codifica a una endo-1,4- β -xilanasas (*xynA*), la cual consiste de un dominio catalítico perteneciente a la familia 11 de glicósido hidrolasa, siendo esta enzima clave del celulosoma para la degradación de xilanos en este microorganismo (Kosugi et al. 2002).

La utilización de enzimas como biocatalizadores presenta grandes ventajas a nivel industrial (Agbo, 2012), como puede ser el uso de una menor cantidad de materia prima, la especificidad y selectividad que tienen hacia los reactivos permitiendo que la formación de productos secundarios sea casi nula, funcionan a temperaturas y presiones ambientales, así como un pH considerablemente más fácil de manipular. Los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación, son llevados a cabo de manera independiente (SHF, del inglés, *separate hydrolysis and fermentation*), siendo la principal ventaja, trabajar en condiciones óptimas para cada etapa (Hahn-Hägerdal et al., 2006). Sin embargo, el uso de enzimas para la hidrólisis puede representar hasta el 80% del costo de la producción del etanol, debido a que los procesos de aislamiento y purificación pueden llegar a ser muy costosos, así como la cantidad y el recambio de las mismas, con lo cual es necesario una disminución

del costo de las enzimas para que el proceso sea redituable (Agbo, 2012; Geddes et al., 2011).

Como una alternativa a esta problemática está el uso de la biocatálisis de célula completa, que consiste en la inmovilización de enzimas funcionales en la superficie celular para posteriormente catalizar la reacción específica empleando los sustratos presentes en el medio extracelular para un fin en particular (Figura 1). Las ventajas que ofrece esta tecnología es la posibilidad de regenerar las enzimas cuyo tiempo de vida haya terminado, ya que el microorganismo hospedero podrá volver a sintetizarlas de forma continua, además no serían necesarios pasos de purificación para su aplicación, así mismo ofrece enzimas más estables que las puras. Otra ventaja es que se logra obtener una mayor área superficial de reacción en comparación de otros sistemas de inmovilización enzimática, disminuyendo la resistencia a la transferencia de masa de los reactivos hacia la enzima (Lam, 2009). Una de las estrategias más usadas para la expresión de proteínas recombinantes en la superficie de células bacterianas, es la fusión con proteínas que naturalmente se transportan y se anclan a la membrana externa. Entre las proteínas de superficie utilizadas para la fusión se encuentra AIDA (del inglés, *adhesin that is involved in diffuse adherence*) proveniente de *Escherichia coli* (Figura 2), esta proteína es empleada para el “autodisplay” de proteínas y enzimas en este microorganismo debido a su simplicidad y versatilidad para ser utilizada como acarreadora de enzimas, epítopes y proteínas (Detzel et al., 2011; Jose and Von Schwichow, 2004; Kranen et al., 2014; Laarmann and Schmidt, 2003; Lattemann et al., 2000; Maurer et al., 1999; Nhan et al., 2011; Sichert et al., 2015).

El presente proyecto propone utilizar el sistema de *autodisplay* AIDA de *E. coli*, para expresar en la superficie de esta bacteria la enzima xilanasa proveniente de *C. cellulovorans* para llevar a cabo la biocatálisis de célula completa y degradar desechos agroindustriales que contienen hemicelulosa; como la paja de trigo (Figura 1). Una vez liberados los carbohidratos en esta materia prima, la cepa etanológica de *E.coli* *WDHL* podrá producir etanol e hidrógeno por fermentación de dichos carbohidratos. Con esto obtendremos una bacteria que sea capaz de degradar desechos y consumir los carbohidratos liberados para producir biocombustibles simultáneamente.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño del gen sintético *xynA-aida*.

Se realizó el diseño del gen de fusión *xynA-aida* para conferir la capacidad a *E. coli* de degradar xilanos. Para ello, las secuencias de ADN fueron armadas con ayuda del software Snapgene (GSL Biotech LLC, Version 3.3) y MacVector (MacVector, Inc, Version 10.1). El diseño de los genes de fusión para el “*autodisplay*” de proteínas se basó en la secuencia de AIDA (figura 2A) reportada por Maurer y cols. (Maurer, Jose, and Meyer 1997). Para la translocación a la membrana interna se seleccionó como péptido señal el de la toxina de *Vibrio cholerae* subunidad β (*ctxB*, UniProtKB - E3UUX3). Como pasajero se seleccionó el gen *xynA* que codifica para la endo-1,4-beta-xilanasasa proveniente de *Clostridium cellulovorans* (GenBank: AAN32825.1). La secuencia nativa de esta enzima contiene un péptido señal que fue omitido para no interferir con el péptido señal previamente seleccionado. Se utilizó el autotransportador del gen *aida* que consiste en un péptido conector y β -barril (aminoácidos del 839 al 1,286, GenBank: X65022.1). Las secuencias nucleotídicas en este orden fueron optimizadas para su expresión en *E. coli* con la ayuda de la compañía GenScript (Nueva Jersey, USA). La optimización de codones se efectuó evadiendo la mayor cantidad posible de sitios de restricción. Una vez obtenida la secuencia del gen de fusión llamado *xynA-aida*, se añadieron sitios de restricción estratégicos para hacerlo más versátil y poder intercambiar la proteína pasajera cuando se requiera. Se seleccionó el promotor gapAP1 del gen constitutivo *gapA* de *E. coli* como regulador transcripcional del gen *xynA-aida* debido a que funciona en condiciones aerobias y anaerobias. Adicionalmente, en los extremos

del gen *xynA-aida* se le colocaron brazos de recombinación homóloga con blanco en el gen *frdABCD* de *E. coli*. El brazo 3' funciona también como terminador Rho independiente del gen *xynA-aida*.

El gen *xynA-aida* tiene una longitud de 3,176 pb y la proteína de fusión a la cual codifica es de 965 aminoácidos. Esta construcción (Figura 2) fue sintetizada por la compañía Biomatik Corp. (Delaware, USA) dentro del vector pUC57; con resistencia a ampicilina; usando el sitio de restricción *EcoRV* como sitio de clonación.

2.2 Transformación de las cepas de *E. coli* TOP10 y WDHL.

Se realizó la transformación de la cepa de *E. coli* TOP10 para obtener una mayor concentración de plásmido y preservarlo. También se transformó la cepa de *E. coli* WDHL (Rosales-Colunga et al., 2010), la cual será utilizada para la producción de los biocombustibles etanol e hidrógeno. Una vez obtenido el plásmido pAIDA-xynA se introdujo mediante choque térmico a las cepas de *E. coli* TOP10 y WDHL, como se describe a continuación: En un tubo eppendorf que contenía 200 μL de células competentes de *E. coli* TOP10 o WDHL se le añadieron 2 μL de pAIDA-xynA y se mezclaron con pipeta, evitando movimientos bruscos. Esta mezcla se incubó por 30 minutos en hielo. Después, se colocó el tubo a una temperatura de 42°C por 70 segundos, y posteriormente fue incubado en hielo por 2 minutos. Se añadió 1 mL de medio LB y se incubó a 37°C por 1 hora sin agitación. Se cultivaron 100 μL en placas Petri con medio LB adicionado con ampicilina a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ como antibiótico de selección de las células que portarán el plásmido. Las placas se incubaron por toda una noche a 37°C. Posteriormente, se seleccionaron varias colonias, con la ayuda de una punta de micropipeta y se transfirieron a 5 mL de medio LB con

ampicilina a $150 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se incubaron a 37°C a una agitación de 200 rpm por toda una noche. Para la comprobación de la transformación se realizó la extracción del ADN plasmídico mediante lisis alcalina utilizando el kit de extracción Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research Corp., California, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Una vez obtenido ADN plasmídico se confirmó el tamaño de este por electroforesis en gel de agarosa 1%, el resto del ADN fue guardado a -20°C para ensayos futuros.

2.3 Ensayo cualitativo en placa de la actividad xilanasa.

Se realizó un ensayo para comprobar la expresión y translocación de xynA codificada en el vector pAIDA-xynA. Las cepas de *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA se cultivaron en placas de medio LB, al cual se le añadió el compuesto cromogénico RBB-xilano (*4-O-metil-D-glucurono-D-xilan-remazol azul brillante R*, Sigma Aldrich, Estado de México, MX) al 0.2% y ampicilina a $150 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se colocaron $0.5 \mu\text{L}$ de cultivo a una densidad óptica ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) de 10 y se incubó a 37°C a por 24 horas. Como control negativo se utilizaron cepas de *E. coli* TOP10 sin transformar.

2.4 Preparación de las células para la reacción enzimática.

Se inocularon 10 mL de medio LB ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina) con células de *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA o WDHL/pAIDA-xynA en tubos de 50 mL. Se crecieron a 37°C y 200 rpm, hasta alcanzar una $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de 1. Se recuperaron las células en un tubo de 1.5 mL por centrifugación y se lavaron dos veces con buffer de reacción. Las reacciones enzimáticas se realizaron por triplicado con células tratadas, ajustando la biomasa a una $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de 10 y utilizando como sustrato xilanos de madera de

abedul (Sigma-Aldrich, Estado de México, MX) a la concentración requerida para cada ensayo en el buffer de reacción correspondiente. Las reacciones fueron terminadas por centrifugación a 13000 rpm por 5 min. Se usó el sobrenadante para medir la actividad enzimática.

2.5 Temperatura óptima de actividad xilanasa.

Para determinar la temperatura óptima de la actividad xilanasa en *E. coli* WDHL/pAIDA-xynA y *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA, se realizó un ensayo en el cual se hicieron reaccionar células tratadas (sección 2.4) con xilanos de madera de abedul al 1% utilizando como buffer de reacción un buffer de acetato (ácido acético/acetato de sodio al 0.1 M, pH 5.5). La reacción se incubó por un tiempo de 30 min para la cepa *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA y durante 2 h para la cepa *E. coli* WDHL/pAIDA-xynA, y en agitación a fin de evitar la precipitación de las células. El rango de temperatura probado fue de 30 a 70°C. Un control negativo que no contenía células también fue incluido y sus valores se utilizaron para llevar a cabo una normalización.

2.6 pH óptimo de actividad xilanasa.

Se realizó un ensayo para encontrar el pH óptimo de la actividad xilanasa en *E. coli* WDHL/pAIDA-xynA y *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA en el cual se hicieron reaccionar células tratadas con xilanos de madera de abedul al 1%, utilizando como buffer de reacción un buffer universal Britton y Robinson's (50 mM ácido fosfórico, 50 mM ácido bórico, 50 mM ácido acético y pH ajustado de 4 a 8 con NaOH). La reacción se incubó por 15 min para la cepa *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA y 1 h para la cepa *E. coli* WDHL/pAIDA-xynA en agitación a fin de evitar la precipitación de las células.

La temperatura de reacción utilizada fue la óptima de 55°C y el rango de pH probado fue de 4 a 8. Los controles negativos que no contenían células a pH de 4 y 8 también fueron colocados y el promedio de los valores se utilizaron para llevar a cabo una normalización.

2.7 Efecto de la concentración de calcio en la actividad xilanasa.

Se realizó un ensayo para evaluar la influencia del calcio sobre la actividad xilanasa en *E. coli* WDHL/pAIDA-xynA y *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA haciendo reaccionar células tratadas con xilanos de madera de abedul al 1%, utilizando como buffer de reacción un buffer universal Britton y Robinson's a pH 6.5. La densidad celular utilizada fue la necesaria para igualar la actividad enzimática de ambas cepas. La reacción se incubó por 30 min a 55°C, con agitación, el rango de concentraciones de CaCl₂ fue de 0 a 10 mM. Los controles negativos que no contenían células con una concentración de 0 y 10mM de CaCl₂ fueron también incluidos y los valores se utilizaron para llevar a cabo una normalización.

2.8 Cálculo de las constantes catalíticas de biocatálisis de célula completa.

Para conocer los valores de K_m y V_{max} de la xilanasa de *C. cellulovorans* anclada mediante AIDA para biocatálisis de célula completa en la membrana externa de *E. coli* WDHL y TOP10, se realizaron cinéticas para determinar las velocidades iniciales de reacción (V_o) de la enzima con células tratadas (OD_{600nm} de 5), en buffer universal Britton y Robinson's a pH 6.5 y utilizando como sustrato xilanos de madera de abedul a diferentes concentraciones que van de 2.5 a 20 mg mL⁻¹. La reacción se incubó por 2 h a 55°C con agitación, tomando muestras cada 30 min. Los

controles negativos que no contenían células fueron también incluidos y los valores se utilizaron para llevar a cabo una normalización.

2.9 Medición de la actividad xilanasa por método de DNS.

La actividad xilanasa se determinó mediante la cantidad de azúcares reductores equivalentes a xilosa que se liberaron de la reacción enzimática por el método de DNS (Miller, 1959) con algunas modificaciones. Para la reacción de DNS se utilizaron 50 μL del sobrenadante de las muestras centrifugadas y se hicieron reaccionar con 150 μL de ácido 3,5-dinitrosalicílico preparado, catalizando la reacción a 100°C por 15 min. Posteriormente, se midió la absorbancia de 150 μL del producto de la reacción a una OD de 595 nm en microplaca. La curva de calibración se realizó con xilosa en un rango de 0.15 a 5 mg mL⁻¹. La actividad xilanasa máxima se reportó como una unidad (U) de actividad xilanasa, la cual fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 μM de azúcares reductores por minuto y para la actividad xilanasa específica como una unidad de actividad xilanasa por mg de peso seco de células de *E. coli*.

3 RESULTADOS

3.1 Diseño del gen sintético *xynA-aida*

El plásmido pAIDA-xynA (Figura 3) fue diseñado para conferir la habilidad de degradar xilanos mediante biocatálisis de célula completa a *E. coli* mediante un casete de expresión del gen de fusión llamado *xynA-aida*. El ORF (del inglés, *open reading frame*) de este casete fue optimizado para su expresión en *E. coli* por la empresa Genscript, evadiendo todos los sitios de restricción posibles, para insertar sitios de restricción deseables entre las partes del gen de fusión. El gen de fusión original poseía un CAI (del inglés, *Codon Adaptation Index*) de 0.59 y fue llevado a 0.95, lo cual indica que su traducción será más eficiente. El porcentaje del contenido de citocinas-guaninas era de 63.44% en la secuencia original y se llevó a 54.05% en la secuencia optimizada, con la finalidad de que el mRNA tenga un tiempo de vida más prolongado. Fueron evitados todos los sitios parecidos a la secuencia Shine-Dalgarno en el ORF. Además, la formación de estructuras tallo-bucle que tienen influencia en la unión de los ribosomas y estabilidad del mRNA, fueron minimizadas para una mejor traducción. El gen de fusión *xynA-aida* (Figura 3) está constituido de 5' a 3' como sigue: sitio de restricción *SmaI*, brazo de recombinación homóloga 5' con blanco al gen *frdABCD*, sitio de restricción *EcoRI*, promotor del gen *gapA* de *E. coli*, sitio de restricción *NdeI*, péptido señal de la proteína *ctxB*, sitio de restricción *Ascl*, gen pasajero *xynA* que codifica a la endo-1,4-beta-xilanaso proveniente de *C. cellulovorans*, sitio de restricción *XhoI*, conector y β -barril del autotransportador AIDA de *E. coli*, sitio de restricción *BamHI*, terminador Rho

independiente y brazo de recombinación homóloga 3' del gen *frdABCD* y sitio de restricción *Sma*I. El casete fue insertado en el plásmido pUC57 en el sitio de restricción *Eco*RV. El vector resultante llamado pAIDA-xynA tiene un tamaño de 5,922 pb.

3.2 Transformación de las cepas de *E. coli* TOP10 y WDHL

La transformación de las cepas WDHL y TOP10 fue exitosa como se muestra en la Figura 4, apreciando la extracción del plásmido pAIDA-xynA de ambas cepas en el carril 3 y 6 respectivamente. Se muestra el plásmido de 5,922 pb y sus isoformas, con lo cual es evidente que las células portan el plásmido pAIDA-xynA. Los carriles 2 y 5 corresponden a la extracción del plásmido pUC57. El carril 2 muestra la extracción plasmídica de cepa WDHL carente de plásmidos.

3.3 Ensayo cualitativo en placa de la actividad xilanasa

Las células de *E. coli* WDHL y TOP10 transformantes poseen la habilidad de degradar xilanos, como se observó en el ensayo de halo del compuesto cromogénico RBB-xilano. En la Figura 5, se muestra un esquema del ensayo enzimático en placa, en el cual se aprecia un halo alrededor de la colonia de *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA, que corresponde a la actividad xilanasa (Figura 5A y 5B), mientras que en la cepa control no se presenta (Figura 5C y 5D).

3.4 Temperatura y pH óptimos de actividad xilanasa

Una vez comprobada la actividad xilanasa del gen *xynA-aida* en la membrana externa, se evaluó la temperatura óptima de la actividad, tanto para *E. coli* WDHL/pAIDA-xynA y para *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA, la cual fue buscada en un

rango de 30 a 70°C. Como puede observarse en la Figura 6, la temperatura óptima de la actividad fue de 55°C para ambas cepas que portan el plásmido pAIDA-xynA. El pH óptimo de la actividad xilanasa se buscó en un rango de 4 a 8 (Figura 7), siendo el óptimo de 6.5 para ambas cepas. La actividad xilanasa máxima mostrada a temperatura y pH óptimos fue de 97.5 U para *E. coli* WDHL/pAIDA-xynA y de 366.2 U para *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA. La actividad xilanasa específica máxima fue de 270.9 U mg⁻¹ y 1017.2 U mg⁻¹, respectivamente.

3.5 Efecto de la concentración de calcio en la actividad xilanasa

Varios reportes sugieren que el Ca²⁺ es un potenciador de la actividad xilanasa. Los resultados en la Figura 8 muestran que una concentración de 5 mM de CaCl₂ es suficiente para potenciar la actividad xilanasa hasta un 240% en la cepa TOP10 y un 120% para la cepa WDHL, manteniéndose constante a 10 mM de CaCl₂ en ambas cepas.

3.6 Cálculo de las constantes catalíticas de biocatálisis de célula completa

Se llevaron a cabo cinéticas enzimáticas en las cuales se varió la concentración de sustrato desde 2.5 hasta 20 mg mL⁻¹ para obtener las velocidades iniciales de la enzima xilanasa anclada a la membrana de *E. coli* TOP10 y WDHL. Con estos datos se construyó el gráfico de la figura 9 de sustrato vs velocidad inicial. Los datos cinéticos se muestran en la Tabla 1. Las constantes catalíticas de TOP10 transformante fueron calculadas, tomando en cuenta que la enzima está inmovilizada en la membrana externa de *E. coli* y que, debido a la agitación la resistencia a la transferencia de masa hacia la superficie de *E. coli* disminuye,

siendo por tanto despreciada, y así el sistema se comporta como si la enzima estuviera de forma libre. La enzima xilanasas expresada en la superficie celular y que fue la responsable de la biocatálisis de célula completa se ajustó al modelo matemático de Michaelis-Menten (Ec. 1) (Michaelis and Menten, 1913)

$$v = \frac{v_{max} S}{K_m + S} \quad (Ec. 1)$$

donde v es la velocidad de la enzima a cierta concentración de sustrato, V_{max} es la velocidad máxima que puede alcanzar la enzima, K_m es la constante de Michaelis-Menten y S es la concentración de sustrato. Se obtuvieron las constantes catalíticas de K_m y V_{max} mediante la linealización de los datos por el modelo de Hanes–Woelf (Hanes, 1932). Las constantes catalíticas fueron K_m aparente=6.01 mg mL⁻¹ y V_{max} app= 4.13 x 10⁻² mg mL⁻¹ min⁻¹.

La cepa *E. coli* WDHL transformante parece sufrir una inhibición conforme aumenta la concentración de sustrato, y sus constantes catalíticas fueron calculadas ajustando la curva a la ecuación de inhibición por sustrato (Ec. 2) (Haldane, 1930):

$$v = \frac{v_{max} S}{K_m + S + S/K_i} \quad (Ec. 2)$$

donde K_m y V_{max} son las constantes catalíticas de Michaelis-Menten y K_i es la constante de inhibición. Se determinaron las constantes catalíticas de la Ec. 2 por el software OriginPro (OriginLabs Corp. Versión 2017) utilizando el algoritmo de Levenberg–Marquardt con un RSS (del inglés, *residual sum of squares*) de 3.008x10⁻⁵, indicando que el software encontró una solución al ajuste. Los datos obtenidos fueron: K_m app=7.52 mg mL⁻¹ y V_{max} app=3x10⁻² mg mL⁻¹ min⁻¹, K_i =15.38 mg mL⁻¹.

4 DISCUSIÓN

La sacarificación de material de desecho de la industria agroalimentaria es ideal para la industria energética y un gran desafío que hay que superar para la producción de biocombustibles. La utilización de este material, supondría dejar de utilizar la biomasa vegetal destinada a alimentación. Sin embargo, la compleja red polimérica de los materiales lignocelulósicos no puede ser utilizada como sustrato directo para llevar a cabo la fermentación. Este material tiene que pasar por un largo y costoso proceso de sacarificación para poder obtener carbohidratos que sean fermentables. Una de las estrategias que se han planteado para obtener un bioproceso consolidado (CBP, del inglés *consolidated bioprocessing*) es la utilización de enzimas funcionales ancladas a células vivas, haciendo el proceso económicamente viable (Hahn-Hägerdal et al., 2006; Tanaka and Kondo, 2015).

En este trabajo, se logró llevar a cabo la expresión y *autodisplay* de la xilanasas proveniente *C. cellulovorans* utilizando el autotransportador AIDA de *E. coli* contenido en el vector sintético pAIDA-xynA. La funcionalidad del plásmido se comprobó mediante placas de agar que contenían el sustrato cromogénico RBB-xilano (Figura 5). Debido a que alrededor de las colonias de microorganismos productores de xilanasas se forman zonas de color azul pálido como resultado de los fragmentos teñidos de RBB-xilan liberados por las enzimas. Los resultados observados en este ensayo son similares a los reportados por Qu y cols. (Qu et al., 2015) en el cual los autores utilizan el sistema de fusión con la proteína Lpp-OmpA para la biocatálisis de célula completa de una xilanasas de *Thermomyces lanuginosus* en la superficie de *E. coli*. Fujita y col (Fujita et al., 2002) llevaron a

cabo la expresión de una xilanasas para biocatálisis de célula completa utilizando la xilanasas II de *Trichoderma reesei* anclándola en la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, obteniendo de igual manera los halos de actividad xilanasas con el compuesto RBB-xilano en placa.

Una vez comprobada la funcionalidad del plásmido se obtuvieron las condiciones óptimas de temperatura y el pH para la enzima inmovilizada en la membrana externa de *E. coli* (figura 7 y 8). Kosugi y col. reportaron las propiedades de la enzima xynA de *C. cellulovorans* y la influencia que tiene esta enzima en el celulosoma al degradar xilanos. La temperatura óptima que reportaron para la degradación de xilanos a xilooligosacaridos fue de 60°C y a un pH de 5 (Kosugi et al., 2002). Con la enzima inmovilizada en *E. coli*, la temperatura y pH óptimo fueron de 55°C y 6.5, respectivamente. Estas diferencias pudieran explicarse como resultado del anclaje de las enzimas a la pared celular, ya que se ha reportado que este proceso puede llegar a modificar las propiedades termodinámicas debido a la conformación tridimensional final que puede estar otorgada por el plegamiento de la chaperona del conector de AIDA (Gawarzewski et al., 2014). Además, el hecho de que la enzima este anclada a una superficie como lo es la membrana externa de *E. coli*, genera una estructura más rígida a diferencia de estar de forma libre (Kumar and Nussinov, 2001). Este cambio de temperatura y pH óptimos puede ser beneficioso ya que, a nivel industrial, un proceso que requiere temperaturas altas es costoso y el pH se mantiene cercano al neutro, que es más sencillo de manipular (Agbo, 2012).

Cabe destacar, además, que con el sistema AIDA, no se requirió ningún proceso de purificación para obtener la enzima activa, la única operación unitaria llevada a cabo

fue la recuperación de las células y que pudiera no ser necesario en el proceso industrial. Por tanto, los costos para la obtención de enzimas para la degradación de hemicelulosa serían mucho más económicos, a comparación de usar enzimas purificadas, obteniendo una mayor cantidad de azúcares fermentables para la obtención de hidrógeno y etanol (Ertas et al., 2014; Tanaka and Kondo, 2015).

Los valores de actividad xilanasa específica para *E. coli* WDHL/pAIDA-xynA y *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA fueron de 270.96 U mg⁻¹ y 1017.22 U mg⁻¹ respectivamente. Estos valores demuestran la eficiencia de la cepa *E. coli* TOP10 para la expresión y translocación de la enzima xilanasa. Comparando estos valores con otras enzimas xilanasas utilizando biocatálisis de célula completa, podemos observar que es mucho más eficiente el sistema AIDA (Tabla 1), presentando actividades enzimáticas comparables al de las enzimas en forma libre, esto quizá es debido al alto número de enzimas ancladas a la membrana externa de *E. coli*.

La enzima xynA de *C. cellulovorans* contiene en su secuencia peptídica un dominio conservado (cd14256) llamado Dockerin_I, el cual es un sitio de unión a Ca²⁺. Este dominio también juega la función de cohesina y se ha visto implicado en la formación del celulosoma bacteriano. El calcio es esencial para la interacción entre cohesinas y *dokerins* para formar el complejo enzimático y degradar sinérgicamente a la hemicelulosa. Se llevó a cabo una prueba para averiguar si el Ca²⁺ pudiera funcionar como potenciador de la actividad xilanasa, al interaccionar con la estructura del centro catalítico de la enzima y el xilano y estabilizar la interacción haciendo que sea más sencilla la reacción de hidrólisis como ya se ha reportado (Yazawa et al., 2011). Tal como se muestra en la Figura 8, el Ca²⁺ logró potenciar la actividad, llegando hasta un 240% aproximadamente en las células *E. coli* TOP10/pAIDA-

xynA. Sin embargo, el aumento para la cepa WDHL/pAIDA-xynA solo llego hasta el 120%, manteniéndose constante a 10 mM de CaCl₂ en ambas cepas. Como reporto Yazawa y col. (Yazawa et al., 2011) las interacciones de Ca²⁺ ocurren solamente con algunos aminoácidos cercanos al sitio activo como por ejemplo los ácidos aspárticos. Se observó que mutaciones en estos aminoácidos tuvieron como consecuencia una disminución en la unión del xilano a la xilanasa. Pudiera sugerirse que la conformación 3D que adquiere la enzima xilanasa es diferente para TOP10 y WDHL. Siendo en WHDL una conformación que impidiera la unión coordinada de ácido aspártico, Ca²⁺ y el xilano, a fin de potenciar la actividad.

Estos resultados muestran que es evidente el efecto que tiene el fondo genético de la cepa de *E. coli* que se utilice para *autodisplay* y la manera de cómo se está llevando a cabo la translocación y plegamiento de la proteína pasajera, así como los niveles de proteína que finalmente lleguen a anclarse en la superficie celular. Con respecto a los bancos genéticos de las cepas utilizadas, en el caso de la cepa *E. coli* WDHL cuya cepa parental es *E. coli* W3110 (Rosales-Colunga et al. 2010), es una cepa *recA+* (Moulton 2014). Dicho gen está implicado en el proceso de recombinación homóloga y, por lo tanto, debido al alto número de copias que posee el vector pUC57 (parental de pAIDA), podría estar interfiriendo con la replicación de pAIDA-xynA (Summers 1998; Moulton 2014) y afectando la expresión de la enzima xynA. Sería prudente, evaluar la posibilidad de realizar modificaciones genéticas a fin obtener esta cepa *recA-*, así como el silenciamiento de proteasas como *lon* y *OmpT* para obtener aún más cantidad de enzima y posiblemente una mayor actividad xilanasa por mg de peso seco de células, ya que WDHL tiene el potencial de realizar el proceso de SSF (del inglés, *simultaneous saccharification and*

fermentation) utilizando AIDA. Otro factor que pudiera explicar la diferencia en los niveles de actividad xilanasa en las cepas evaluadas, es el hecho de que en un reporte de Jishage e Ishihama (Jishage and Ishihama, 1997) analizaron las diferencias en las subunidades σ de diferentes stocks de *E. coli* W3110 y encontraron cambios en la subunidad σ^{28} y σ^{38} , como cambios en la secuencia peptídica e incluso una nula expresión de estas subunidades. El promotor utilizado para la expresión del gen *xynA-aida* fue el del gen *gapA*; el promotor *gapAP1*, el cual es transcrito por las RNA polimerasas con subunidades σ^{70} y σ^{38} , dependiendo la fase de crecimiento y las condiciones ambientales (Olvera et al., 2009; Thouvenot et al., 2004). Para las condiciones de cultivo utilizadas, notamos la diferencia en la actividad enzimática, que puede estar relacionada con el nivel de la expresión y la correcta translocación hacia la membrana externa de la enzima y por consiguiente estar relacionado a las diferencias fenotípicas que las polimerasas de la cepa W3110 (parental de WDHL) pudiera contener.

Como ya se discutió, varios factores parecen estar implicados en la correcta expresión y translocación de las proteínas pasajeras del sistema AIDA, como el banco genético y el fenotipo de la cepa, así como la conformación 3D adquirida durante el plegamiento en la superficie celular. Por tanto, será necesario hacer un estudio con mayor detalle para determinar cuál cepa de *E. coli* es la más eficiente para la expresión de enzimas utilizando el sistema *autodisplay* y las condiciones óptimas de expresión de enzimas pasajeras.

Analizando los datos de las constantes catalíticas, podemos observar en la Figura 9 como la cinética de la cepa *E. coli* TOP10 presenta una cinética que pudo ser ajustada al modelo de Michelis-Menten (Ecuación 1). Hasta el momento no hay

reportes de constantes catalíticas de xilanasas para biocatálisis de célula completa, pero sí de xilanasas ancladas a nanopartículas (Dhiman et al., 2013, 2012; Landarani-Isfahani et al., 2015; Liu et al., 2014; Soozanipour et al., 2015); sistema que sería el más cercano al utilizado en este trabajo (Tabla 1). Al analizar las constantes catalíticas reportadas podemos observar que presentan valores aparentes de K_m similares a otras enzimas inmovilizadas en nanopartículas, por ejemplo, la xilanasas de *Thermomyces lanuginosus* anclada a poliglicerol hiper-ramificado soportado en nanopartículas magnéticas es la que presenta un valor de K_{mapp} más parecido a la xilanasas xynA de *C. cellulovorans* anclada a *E. coli*. Sin embargo, presenta valores más altos que las enzimas ancladas a nanopartículas de silicio que son más afines al sustrato y cuya K_{mapp} es aproximadamente de 2 mg mL⁻¹. Esto es debido principalmente, a que la enzima está en una forma inmovilizada en una célula de *E. coli* que es de gran tamaño a comparación del de las nanopartículas o al estar en forma libre, afectando por tanto a la transferencia de masa de los xilanos hacia la membrana externa (Martinez et al., 1999), que es donde se encuentra la xilanasas. Por otro lado, la enzima anclada a *E. coli* WDHL sufrió una inhibición conforme aumentó la concentración de sustrato, en la cual después de 10 mg mL⁻¹ de xilanos se presentó una disminución de la velocidad de reacción, cuya cinética se ajustó a la de inhibición por sustrato. Los datos cinéticos de esta cepa se mueven ligeramente para V_{max} y K_m , aumentando, esto significa que es menos afín al sustrato que la enzima anclada a TOP10. Ya se han reportado diferencias en las actividades enzimáticas para una misma enzima usando diferentes cepas de *E. coli* para evaluar la expresión, transporte y actividad con el sistema *autodisplay* AIDA; por ejemplo, Kaessler y col. expresaron en 2011 una

hialuronidasa humana usando cepas de *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* F470, observando únicamente en la última una inhibición competitiva (Kaessler et al., 2011). Varios factores pueden estar provocando las diferencias de estos comportamientos catalíticos. Uno de los factores que puede tener influencia es el plegamiento de la enzima y que tan expuesto se encuentre su sitio activo debido a la orientación que la enzima pudiera tomar en cada cepa de *E. coli*, como ya se discutió anteriormente. Esto ya se ha observado en otras enzimas ancladas a *E. coli* por el sistema *autodisplay* AIDA, las cuales poseen una actividad más baja a comparación de la enzima en forma libre (Gustavsson et al., 2014; Lattemann et al., 2000).

A pesar de las posibles desventajas que implica el *autodisplay* de enzimas, no se utilizaron procesos de bioseparación y purificación para la obtención de enzimas funcionales, salvo el de centrifugación; que en el proceso industrial puede ser evitado; haciendo económicamente viable el uso de enzimas en el proceso de sacarificación de residuos agroindustriales, como lo es la paja de trigo.

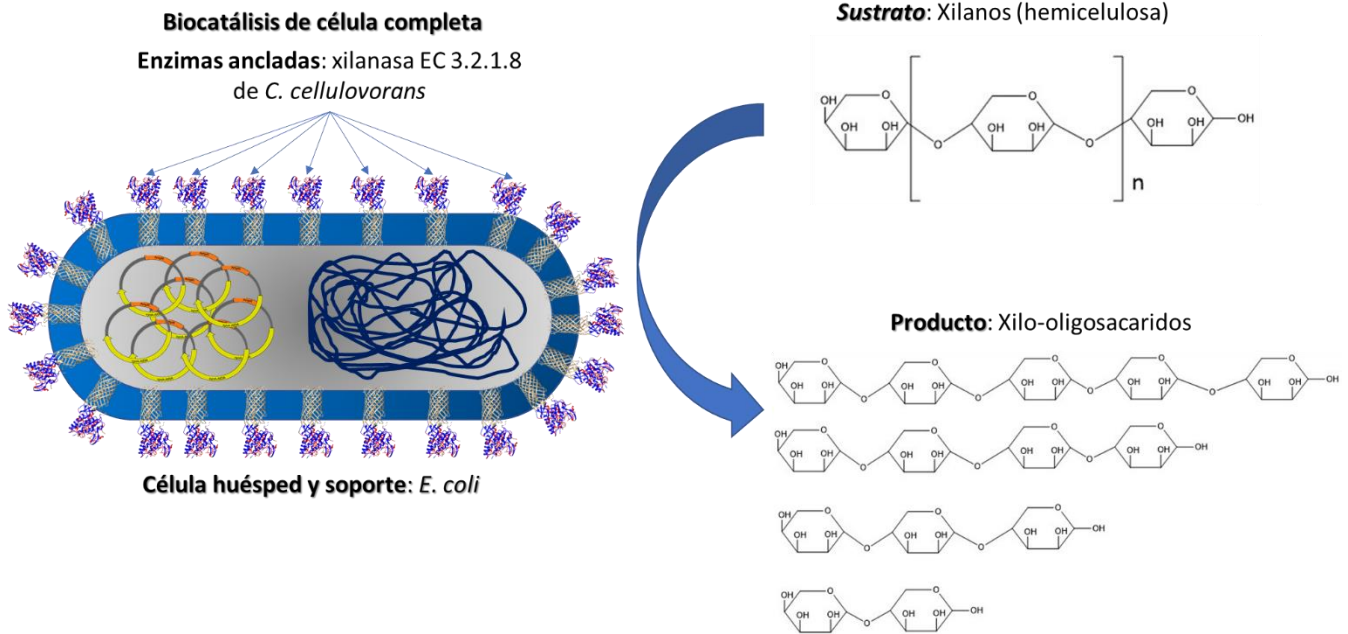


Figura 1. Biocatálisis de célula completa

Representación visual de la biocatálisis de célula completa que consiste en la inmovilización de enzimas funcionales en la superficie celular (como *E. coli*) para posteriormente catalizar la reacción específica empleando los sustratos presentes en el medio extracelular. En este trabajo se lleva a cabo la hidrólisis de xilanos contenidos en la hemicelulosa por la enzima endo-1,4- β - xilanasa (EC 3.2.1.8) proveniente de *C. cellulovorans* y codificada en el vector pAIDA-xynA. Se usaron xilanos de madera de abedul como sustrato y se obtuvieron como productos xilo-oligosacáridos de longitud variable.

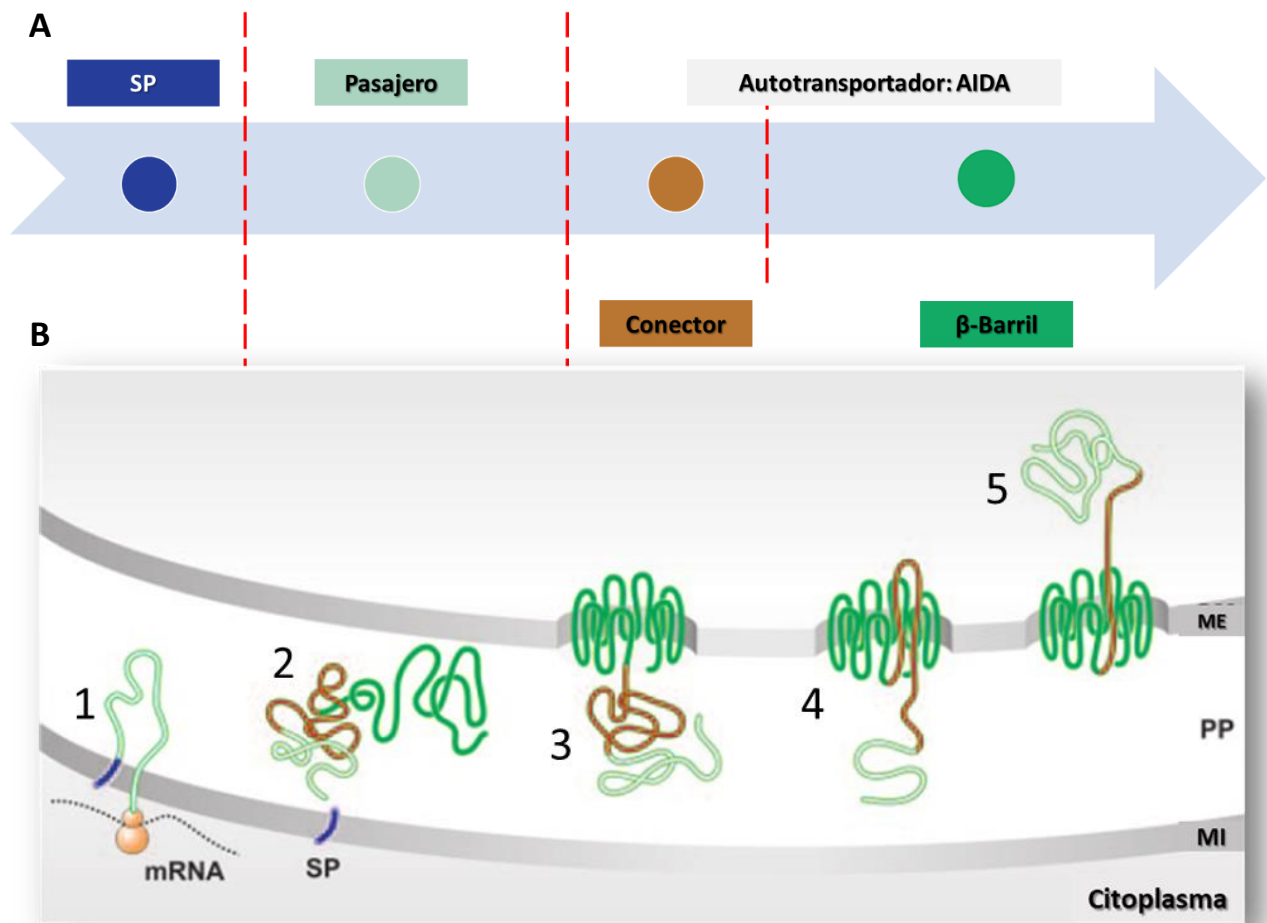


Figura 2. Sistema *autodisplay* AIDA.

(A). Secuencia de las partes del autotransportador AIDA, en cual contiene un péptido señal (SP), la proteína o enzima pasajera, y la secuencia del autotransportador AIDA, la cual está conformada por el conector y el β -Barril.

(B). 1) La translocación de AIDA que es llevada a cabo primeramente por el reconocimiento del péptido señal, 2) el cual será proteolisado en la membrana interna y una vez que el polipéptido esté en el periplasma, 3) se formará el β -barril y se insertará en la membrana externa, 4) el conector jalará a la proteína pasajera funcionando como chaperona el β -barril y 5) finalmente mostrando la proteína plegada en la superficie de la célula. Imagen tomada de Jose and Meyer (2007).

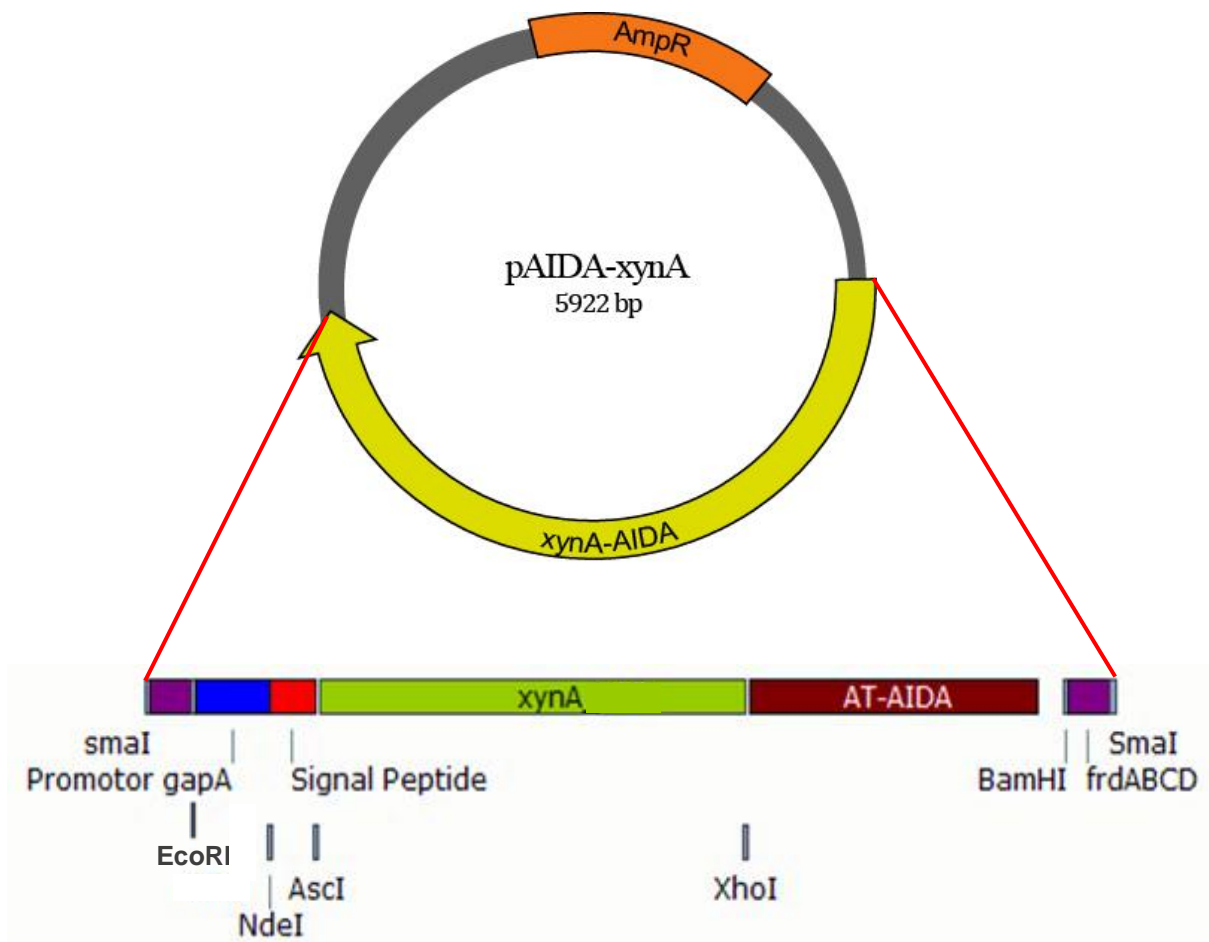


Figura 3. Vector pAIDA-xynA

El vector pAIDA-xynA posee una longitud de 5922 bp y contiene al casete de expresión del gen de fusión *xynA-aida*. Los sitios de restricción *NdeI*, *AscI*, *XhoI*, *EcoRI* y *BamHI* flanquean las secuencias principales del gen y los sitios *SmaI* flanquean al gen completo. En morado se esquematizan los brazos de recombinación homóloga con el gen *frdABCD*. En verde se muestra el gen pasajero *xynA*, en magenta el conector y el β -barril del gen *aida*. El plásmido otorga resistencia a ampicilina debido al gen de selección *AmpR*.

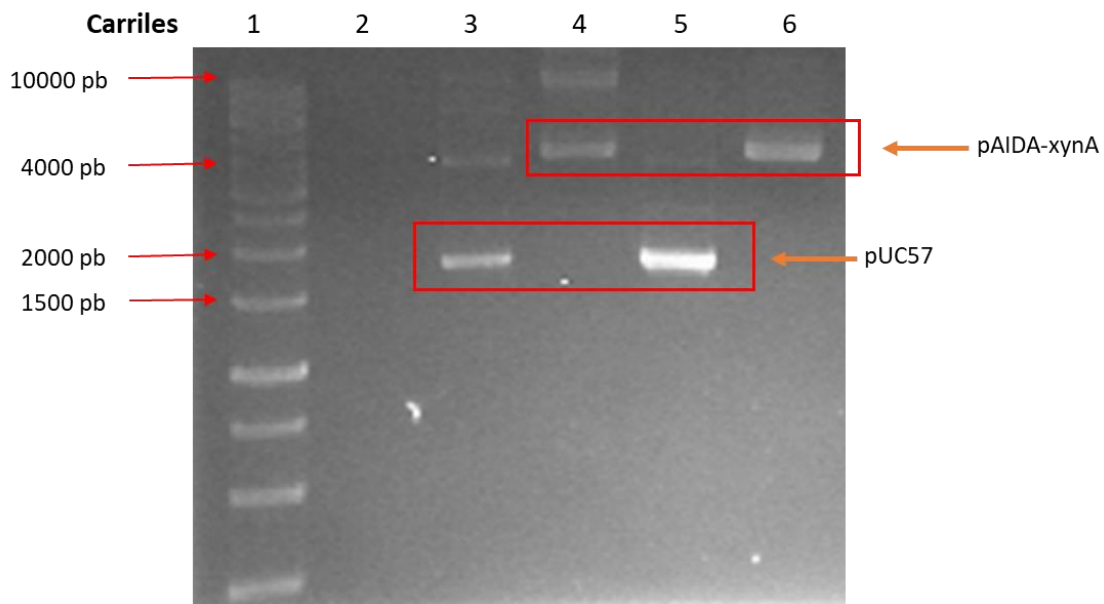


Figura 4. ADN plasmídico de *E. coli* WDHL y TOP10.

Imagen obtenida de la electroforesis en gel de agarosa 1% con muestras de extracción de ADN plasmídico. En el carril 1 se observa el marcador escalera de ADN. En los carriles 2-6 la extracción de ADN plasmídico y sus isoformas: carril 2, *E. coli* WDHL sin plásmido; 3, WDHL/pUC57; 4, WDHL/pAIDA-xynA; 5, TOP10/pUC57; 6, TOP/pAIDA-xynA. Se observan las del vector pAIDA-xynA. Las bandas de WDHL/pAIDA-xynA (carril 4) son idénticas a TOP10/pAIDA-xynA (carril 6) y WDHL/pUC57 (carril 3) a TOP10/pUC57 (carril 5).

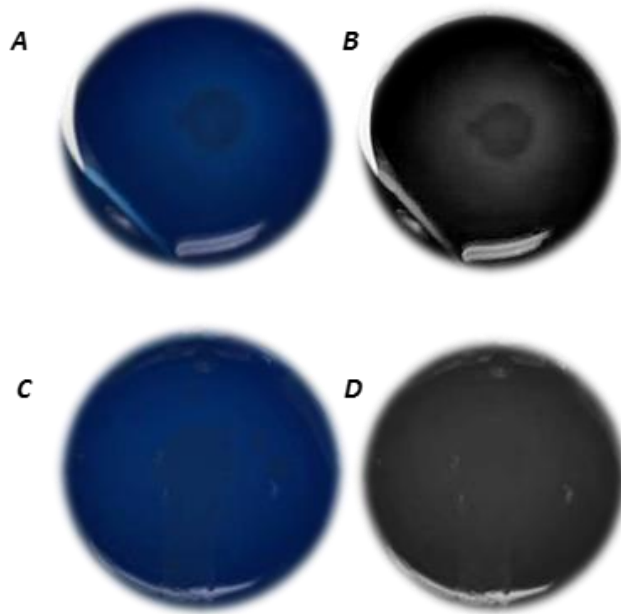


Figura 5. Detección de la actividad xilanasa en placa

Se muestran las placas de cultivo suplementado con el compuesto cromogénico RBB-xilano. En (A) se observa el halo de la degradación del RBB-xilano de la colonia de *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA, apreciándose mejor en (B) al colocar un contraste de grises. En (C) se muestran las colonias *E. coli* TOP10 y no se observa el halo, en (D) se la misma imagen en contraste de grises.

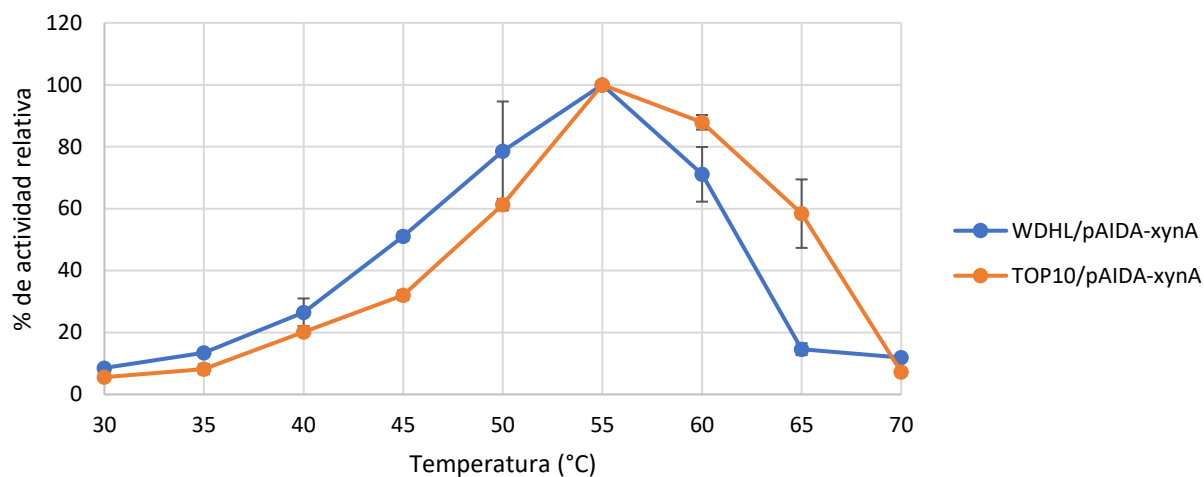


Figura 6. Efecto de la temperatura en la actividad xilanasas

Actividades enzimáticas relativas para *E. coli* WDHL/pAIDA-xynA y *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA al degradar xilanos puros a distintas temperaturas. La actividad relativa máxima (100%) es la máxima actividad observada de todos los ensayos para esa cepa de *E. coli*. Los datos de desviación estándar son de experimentos por triplicado.

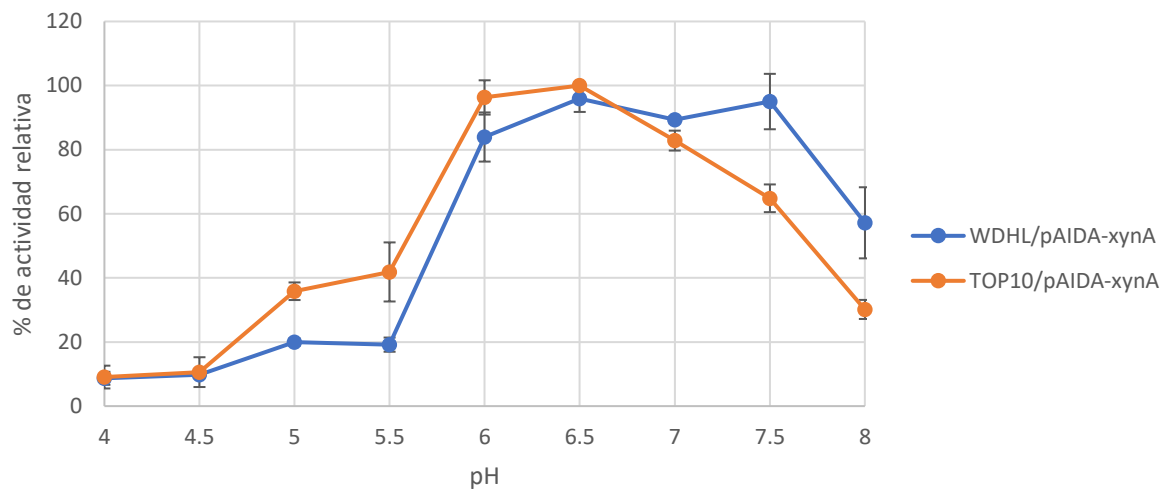


Figura 7. Efecto del pH en la actividad xilanasa

Actividades enzimáticas relativas para *E. coli* WDHL/pAIDA-xynA y *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA al degradar xilanos puros a distintos valores de pH. La actividad relativa máxima (100%) es la máxima actividad observada de todos los ensayos para esa cepa de *E. coli*. Los datos de desviación estándar son de experimentos por triplicado.

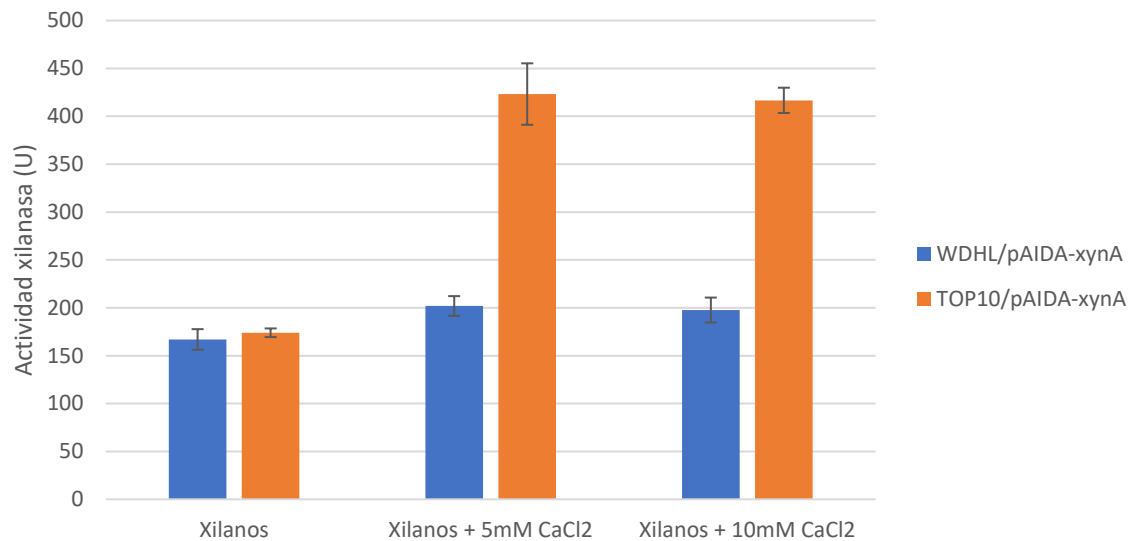


Figura 8. Efecto de la concentración de calcio en la actividad xilanasa

Actividades enzimáticas relativas para *E. coli* WDHL/pAIDA-xynA y *E. coli* TOP10/pAIDA-xynA al degradar xilanos puros con la adición de diferentes concentraciones de CaCl₂. Los datos de desviación estándar son de experimentos por triplicado.

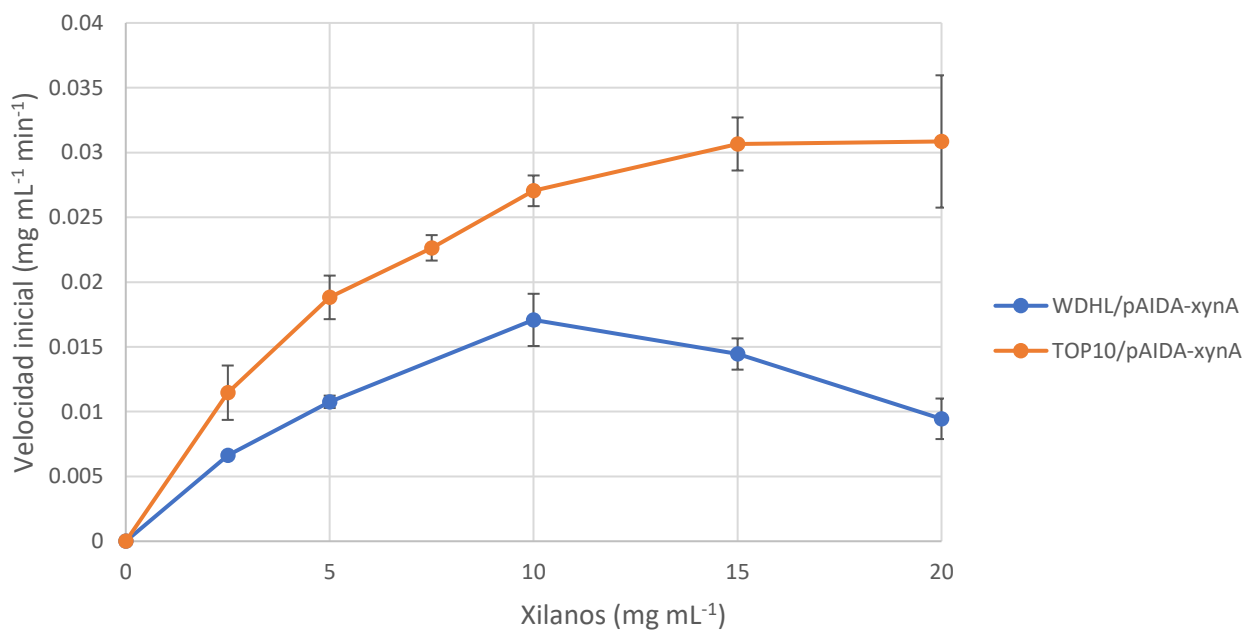


Figura 9. Curva de Michaelis-Menten de xynA anclada a WDHL y TOP10

La concentración de sustrato vs velocidad inicial de reacción de la enzima xilanasas anclada a *E. coli* WDHL y TOP10, las cuales presentaron un comportamiento que se ajusta al modelo matemático de Michaelis-Menten. La curva de WDHL transformante parece presentar una inhibición por sustrato después de los 10 mg mL⁻¹ de xilanos, mientras que la expresada en TOP10 alcanza la velocidad máxima de reacción a los 15 mg mL⁻¹ de xilanos a una concentración celular equivalente a OD_{600nm} de 5. Los datos de desviación estándar son de experimentos por triplicado.

Tabla 1. Xilanasas usadas para hidrólisis de xilanos

Las enzimas xilanasas EC 3.2.1.8 para diferentes tipos de biocatálisis, actividades específicas y constantes catalíticas.

Célula completa: ancladas a microorganismos utilizando diversos autotransportadores. *Enzima inmovilizada*: Enzima en

forma pura anclada a nanopartículas biofuncionalizadas. *Enzimática*: Enzima en forma pura. *Actividad reportada en U por

mg de peso seco de microorganismo usado para el anclaje. **Actividad reportada en U por mg de enzima pura. ***Actividad

reportada en mU por mL de cultivo a OD_{578nm}: 2. ****Co-expresión de xilobiosidasa y xilanasas.

Microorganismo	Tipo de biocatálisis	Anclaje	Sustrato	Actividad específica (U mg ⁻¹)*	K _m (mg mL ⁻¹)	Referencia	
<i>Clostridium cellulovorans</i>	Célula completa	<i>E. coli</i> WDHL	<i>AIDA</i>	beechnwood xylan	270.96	7.52	Este trabajo
<i>Clostridium cellulovorans</i>		<i>E. coli</i> TOP10	<i>AIDA</i>	beechnwood xylan	1017.22	6.01	Este trabajo
<i>Cellulomonas fimi</i>		<i>E. coli</i> C41 (DE3)	<i>PgsA</i>	xylan	0.049		Chen et al. 2012
<i>Thermomyces lanuginosus</i>		<i>E. coli</i> JM109	<i>Lpp-OmpA</i>	oat-spelt xylan	0.072		Qu et al. 2015
<i>Fusarium graminearum</i>		<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>bIc</i>	beechnwood xylan	0.265****		Zhao et al. 2013
<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Pseudomonas putida</i>	<i>AIDA</i>	beechnwood xylan	48.5 mU/mL***		Schulte et al. 2017
<i>Trichoderma reesei</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	α -agglutinin	birchwood xylan	0.0018		Fujita et al. 2002
<i>Aspergillus niger</i>	Enzima inmovilizada	NP's magnéticas de quitosano recubiertas de Fe ₃ O ₄	birchwood xylan		10.53	Liu et al. 2014	
<i>Thermomyces lanuginosus</i>		NP's de magnetita modificada revestidas con sílice	beechnwood xylan		9.63	Soozanipour et al. 2015	
<i>Armillaria gemina</i>		SiO ₂ NP's	birchwood xylan		1.92	Dhiman et al. 2013	
<i>Thermomyces lanuginosus</i>		NP's magnéticas revestidas de Poliglicerol hiperramificado	beechnwood xylan		5.2	Landarani-Isfahani et al. 2015	
<i>Pholiota adiposa</i>		SiO ₂ NP's	birchwood xylan		2.37	Dhiman et al. 2012	
<i>Aspergillus niger</i>	Enzimática		oat spelt xylan	29702 **	6.57	Guo et al. 2013	
<i>Trichoderma reesei</i>			Birchwood		2.1	He et al. 2009	
<i>Clostridium acetobutylicum</i>			larchwood xylan	5.4**	6	Lee et al. 1987	
<i>Clostridium cellulovorans</i>			birchwood xylan	155.3**		Kosugi et al. 2002	
<i>Thermoascus aurantiacus</i>			beechnwood xylan	1283.96**		de Souza et al. 2016	

5 CONCLUSIONES

La expresión de enzimas xilanolíticas en la superficie celular mediante el sistema *autodisplay* AIDA es una poderosa herramienta para la hidrólisis de xilanos, al disminuir los costos de producción de enzimas además de que no se requiere de purificación.

Los resultados sugieren que la cepa WDHL y TOP10 son capaces de expresar eficientemente enzimas en su membrana externa mediante este sistema utilizando el vector pAIDA.

Existen diferencias en actividad enzimática específica y comportamiento cinético al comparar ambas cepas que expresan mediante AIDA para la misma enzima, indicando la importancia del fondo genético de la célula huésped.

6 PERSPECTIVAS

Se planea expresar el resto de las enzimas xilanolíticas utilizando el “*autodisplay*” de AIDA obteniendo una cepa de *E. coli* por cada enzima xilanolítica. Una vez obtenidas las transformantes de TOP10 y WDHL, encontrar las condiciones óptimas de hidrólisis de xilanos puros, paja de trigo y el autohidrolizado de paja de trigo utilizando la combinación de cepas, como parte de un SHF.

Evaluar el potencial de WDHL para realizar SSF como consorcio de múltiples transformantes de WDHL, donde cada transformante porte una enzima xilanolítica. Encontrar las condiciones óptimas de diferentes factores para el proceso SSF que tendrá como respuestas: la expresión de enzimas, hidrólisis de hemicelulosa y producción de etanol e hidrógeno.

7 BIBLIOGRAFÍA

Agbo, E.C. (Ed.), 2012. Innovations in Biotechnology. InTech. doi:10.5772/2450

Biswas, R., Persad, A., Bisaria, V.S., 2014. Production of Cellulolytic Enzymes.

Bioprocess. Renew. Resour. to Commod. Bioprod. 105–132.

doi:10.1002/9781118845394.ch5

Chen, Y.P., Hwang, I.E., Lin, C.J., Wang, H.J., Tseng, C.P., 2012. Enhancing the

stability of xylanase from *Cellulomonas fimi* by cell-surface display on

Escherichia coli. J. Appl. Microbiol. 112, 455–463. doi:10.1111/j.1365-

2672.2012.05232.x

de Souza, A.R., de Araújo, G.C., Zanphorlin, L.M., Ruller, R., Franco, F.C., Torres,

F.A.G., Mertens, J.A., Bowman, M.J., Gomes, E., Da Silva, R., 2016.

Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1, 4- β -xylanase from

Thermoascus aurantiacus CBMAI 756. Int. J. Biol. Macromol. 93, 20–26.

doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.08.056

Detzel, C., Maas, R., Jose, J., 2011. Autodisplay of Nitrilase from *Alcaligenes*

faecalis in *E. coli* Yields a Whole Cell Biocatalyst for the Synthesis of

Enantiomerically Pure (R)-Mandelic Acid. ChemCatChem 3, 719–725.

doi:10.1002/cctc.201000382

Dhiman, S.S., Jagtap, S.S., Jeya, M., Haw, J.R., Kang, Y.C., Lee, J.K., 2012.

Immobilization of *Pholiota adiposa* xylanase onto SiO₂ nanoparticles and its

application for production of xylooligosaccharides. Biotechnol. Lett. 34, 1307–

1313. doi:10.1007/s10529-012-0902-y

Dhiman, S.S., Kalyani, D., Jagtap, S.S., Haw, J.-R., Kang, Y.C., Lee, J.-K., 2013.

- Characterization of a novel xylanase from *Armillaria gemina* and its immobilization onto SiO₂ nanoparticles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1081–91. doi:10.1007/s00253-012-4381-9
- Dodd, D., Cann, I.K.O., 2009. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Glob. Change Biol. Bioenergy* 1, 2–17. doi:10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x
- Donohue, T.J., Cogdell, R.J., 2006. Microorganisms and clean energy. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 800. doi:10.1038/nrmicro1534
- Ertas, M., Han, Q., Jameel, H., Chang, H. min, 2014. Enzymatic hydrolysis of autohydrolyzed wheat straw followed by refining to produce fermentable sugars. *Bioresour. Technol.* 152, 259–266. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.026
- Fujita, Y., Katahira, S., Ueda, M., Tanaka, A., Okada, H., Morikawa, Y., Fukuda, H., Kondo, A., 2002. Construction of whole-cell biocatalyst for xylan degradation through cell-surface xylanase display in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* 17, 189–195. doi:10.1016/S1381-1177(02)00027-9
- Gawarzewski, I., DiMaio, F., Winterer, E., Tschapek, B., Smits, S.H.J., Jose, J., Schmitt, L., 2014. Crystal structure of the transport unit of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence from *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.* 187, 20–29. doi:10.1016/j.jsb.2014.05.003
- Geddes, C.C., Nieves, I.U., Ingram, L.O., 2011. Advances in ethanol production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 312–319. doi:10.1016/j.copbio.2011.04.012
- Guo, N., Zheng, J., Tian, J., Wu, L., Zhou, H., 2013. Characterization and constitutive expression of an acidic mesophilic endo-1,4-β-d-xylanohydrolase

- with high thermotolerance and catalytic efficiency in *Pichia pastoris*. World J. Microbiol. Biotechnol. 29, 2095–2103. doi:10.1007/s11274-013-1374-5
- Gustavsson, M., Muraleedharan, M.N., Larsson, G., 2014. Surface expression of ω -transaminase in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 80, 2293–8. doi:10.1128/AEM.03678-13
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., Zacchi, G., 2006. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends Biotechnol. 24, 549–556. doi:10.1016/j.tibtech.2006.10.004
- Haldane, J., 1930. Enzymes. New York: Longmans, Green and Co.
- Hanes, C.S., 1932. Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. Biochem. J. 26, 1406–1421.
- He, J., Yu, B., Zhang, K., Ding, X., Chen, D., 2009. Expression of endo-1, 4-beta-xylanase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the produced enzyme. BMC Biotechnol. 9, 56. doi:10.1186/1472-6750-9-56
- Jishage, M., Ishihama, A., 1997. Variation in RNA polymerase sigma subunit composition within different stocks of *Escherichia coli* W3110 . Variation in RNA Polymerase Sigma Subunit Composition within Different Stocks of *Escherichia coli* W3110 179, 959–963.
- Jose, J., Meyer, T.F., 2007. The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71, 600–19. doi:10.1128/MMBR.00011-07
- Jose, J., Von Schwichow, S., 2004. Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase

- (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars.
ChemBioChem 5, 491–499. doi:10.1002/cbic.200300774
- Kaessler, A., Olgen, S., Jose, J., 2011. Autodisplay of catalytically active human hyaluronidase hPH-20 and testing of enzyme inhibitors. Eur. J. Pharm. Sci. 42, 138–47. doi:10.1016/j.ejps.2010.11.004
- Kosugi, A., Murashima, K., Doi, R.H., 2002. Xylanase and Acetyl Xylan Esterase Activities of XynA, a Key Subunit of the *Clostridium cellulovorans* Cellulosome for Xylan Degradation. Appl. Environ. Microbiol. 68, 6399–6402. doi:10.1128/AEM.68.12.6399-6402.2002
- Kranen, E., Detzel, C., Weber, T., Jose, J., 2014. Autodisplay for the co-expression of lipase and foldase on the surface of *E. coli*: washing with designer bugs. Microb. Cell Fact. 13, 19. doi:10.1186/1475-2859-13-19
- Kumar, S., Nussinov, R., 2001. How do thermophilic proteins deal with heat? Cell. Mol. Life Sci. 58, 1216–1233. doi:10.1007/PL00000935
- Laarmann, S., Schmidt, M.A., 2003. The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. Microbiology 149, 1871–1882. doi:10.1099/mic.0.26264-0
- Lam, K.S., 2009. Application of Whole-Cell Biotransformation in the Pharmaceutical Industry. Biocatal. Pharm. Ind. Discov. Dev. Manuf. 213–227. doi:10.1002/9780470823163.ch10
- Landarani-Isfahani, A., Taheri-Kafrani, A., Amini, M., Mirkhani, V., Moghadam, M., Soozanipour, A., Razmjou, A., 2015. Xylanase Immobilized on Novel Multifunctional Hyperbranched Polyglycerol-Grafted Magnetic Nanoparticles: An Efficient and Robust Biocatalyst. Langmuir 31, 9219–9227.

doi:10.1021/acs.langmuir.5b02004

Lattemann, C.T., Maurer, J., Gerland, E., Meyer, T.F., 2000. Autodisplay: Functional display of active β -lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J. Bacteriol.* 182, 3726–3733.

doi:10.1128/JB.182.13.3726-3733.2000

Lee, S.F., Forsberg, C.W., Rattray, J.B., 1987. Purification and Characterization of Two Endoxylanases from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 644–50. doi:10.1139/m87-178

doi:10.1139/m87-178

Liu, M.Q., Dai, X.J., Guan, R.F., Xu, X., 2014. Immobilization of *Aspergillus niger* xylanase A on Fe₃O₄-coated chitosan magnetic nanoparticles for xylooligosaccharide preparation. *Catal. Commun.* 55, 6–10.

doi:10.1016/j.catcom.2014.06.002

Martinez, M.B., Flickinger, M.C., Nelsestuen, G.L., 1999. Steady-state enzyme kinetics in the *Escherichia coli* periplasm: A model of a whole cell biocatalyst. *J. Biotechnol.* 71, 59–66. doi:10.1016/S0168-1656(99)00015-2

doi:10.1016/S0168-1656(99)00015-2

Maurer, J., Jose, J., Meyer, T.F., 1999. Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J. Bacteriol.* 181, 7014–7020. doi:10559167

doi:10559167

Michaelis, L., Menten, M.L., 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* 49, 333–369. doi:10.1021/bi201284u

doi:10.1021/bi201284u

Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. doi:10.1021/ac60147a030

doi:10.1021/ac60147a030

Nhan, N.T., Gonzalez de Valdivia, E., Gustavsson, M., Hai, T.N., Larsson, G., 2011. Surface display of Salmonella epitopes in *Escherichia coli* and

Staphylococcus carnosus. Microb. Cell Fact. 10, 22. doi:10.1186/1475-2859-10-22

- Olvera, L., Mendoza-Vargas, A., Flores, N., Olvera, M., Sigala, J.C., Gosset, G., Morett, E., Bolívar, F., 2009. Transcription analysis of central metabolism genes in *Escherichia coli*. Possible roles of σ_{38} in their expression, as a response to carbon limitation. PLoS One 4. doi:10.1371/journal.pone.0007466
- Qu, W., Xue, Y., Ding, Q., 2015. Display of Fungi Xylanase on *Escherichia coli* Cell Surface and Use of the Enzyme in Xylan Biodegradation. Curr. Microbiol. 70, 779–785. doi:10.1007/s00284-015-0781-2
- Rosales-Colunga, L.M., Razo-Flores, E., Ordoñez, L.G., Alatraste-Mondragón, F., De León-Rodríguez, A., 2010. Hydrogen production by *Escherichia coli* Δ hycA Δ lacl using cheese whey as substrate. Int. J. Hydrogen Energy 35, 491–499. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.10.097
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. Annu. Rev. Plant Biol. 61, 263–289. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112315
- Schulte, M.F., Tozakidis, I.E.P., Jose, J., 2017. Autotransporter-based surface display of hemicellulases on *Pseudomonas putida*: new whole-cell biocatalysts for the production of xylose from biomass. ChemCatChem. doi:10.1002/cctc.201700577
- Sichwart, S., Tozakidis, I.E.P., Teese, M., Jose, J., 2015. Maximized Autotransporter Mediated Expression (MATE) for Surface Display and Secretion of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. Food Technol. Biotechnol. 53, 251–260. doi:10.17113/ftb.53.03.15.3802
- Soozanipour, A., Taheri-Kafrani, A., Landarani Isfahani, A., 2015. Covalent

attachment of xylanase on functionalized magnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. Chem. Eng. J. 270, 235–243.

doi:10.1016/j.cej.2015.02.032

Tanaka, T., Kondo, A., 2015. Cell surface engineering of industrial microorganisms for biorefining applications. Biotechnol. Adv. 33, 1403–1411.

doi:10.1016/j.biotechadv.2015.06.002

Thouvenot, B., Charpentier, B., Branlant, C., 2004. The strong efficiency of the *Escherichia coli* gapA P1 promoter depends on a complex combination of functional determinants. Biochem. J. 383, 371–382. doi:10.1042/BJ20040792

Yazawa, R., Takakura, J., Sakata, T., Ihsanawati, Yatsunami, R., Fukui, T.,

Kumasaka, T., Tanaka, N., Nakamura, S., 2011. A calcium-dependent xylan-binding domain of alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* strain 41M-1.

Biosci. Biotechnol. Biochem. 75, 379–81. doi:10.1271/bbb.100730

Zhao, M.N., Zheng, Z., Chen, T., 2013. Expressing Xylanases in *Escherichia Coli* by Cell Surface Display. Adv. Mater. Res. 634–638, 965–969.

doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.634-638.965