



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Dirección de Postgrado
Doctorado en Química Tecnológica



*Estudio funcional de una β -xilosidasa mutante
(XynB2^{Y509E}) y su inmovilización sobre soportes
comerciales naturales y sintéticos*

AUTOR: Gabriela V. Romero B

TUTORES: Lellys Mariela Contreras.

Trabajo presentado para optar al título de Doctor en Química Tecnológica

Naguanagua, mayo 2022

ACTA

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo, para examinar la TESIS DOCTORAL presentada por Gabriela V. Romero B., CI: 9.860.726 bajo el título : ESTUDIO FUNCIONAL DE UNA β -XILOSIDASA MUTANTE (XYNB2^{Y509E}) Y SU INMOVILIZACIÓN SOBRE SOPORTES COMERCIALES NATURALES Y SINTÉTICOS, a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de DOCTOR EN QUÍMICA TECNOLÓGICA, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído, como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 8 de agosto del 2022 a las 10:00 a.m., para que la autora defendiera en forma pública, lo que hizo en el salón de reuniones del Decanato de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo, en el Campus Bárbula de Valencia, mediante un resumen oral de su contenido en las modalidades presencial y online, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo.

2.- Finalizada la defensa doctoral, el jurado decidió APROBAR el trabajo, por considerar, sin hacerse solidario con las ideas expuestas por el autor, que la información generada contribuye de manera relevante al conocimiento general de la inmovilización de enzimas como una técnica muy válida para su utilización a nivel industrial. Por los resultados obtenidos, el jurado evaluador considera otorgar la Mención Publicación a la Tesis Doctoral.

En fe de lo cual se levanta el ACTA, a los ocho días del mes de agosto del año 2022, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo. Actuó como Tutor y Coordinador del jurado la Dra. Lellys M. Contreras M.


Dra. Elizabeth Ferrer
C.I. 7.101.850
Universidad de Carabobo (UC)


Dra. Gretty Villena Chávez
DNI 09753335
Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM)


Dr. Óscar Valbuena
C.I. 2.960.635
Universidad de Carabobo (UC)


Dr. Carlos Ciangherotti
C.I.13.960.275
Universidad Central de Venezuela (UCV)


Dra. Lellys M. Contreras M.
C.I. 10.146.766
Universidad de Carabobo



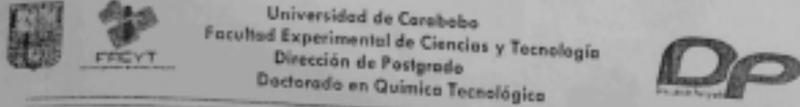
Dra. Lellys Mariela Contreras Moyeja
Profesora Titular del Departamento de Biología
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Universidad de Carabobo

Certifica:

Que la ciudadana MSc. Gabriela V. Romero B, ha desarrollado bajo mi dirección, el trabajo que lleva por título: “Estudio funcional de una β -xilosidasa mutante (XynB2^{Y509E}) y su inmovilización sobre soportes comerciales naturales y sintéticos”, expuesto en la presente memoria, para optar al grado de Doctor en Química Tecnológica, línea de Investigación: Bioquímica y Biotecnología, considero que dicha tesis reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometida a la presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

A los 31 días del mes de mayo del 2022

CARTA DE APROBACION DEL PROYECTO



**ACTA DE APROBACIÓN
DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Quiénes suscriben:

Prof.(a) (Coordinador(a)) Lellys M. Guiteras M
Miembro Principal Prof: Elizbeth Ferrer
Miembro Principal Prof: Arnaldo Armado

En nuestra condición de miembros del Jurado Evaluador del proyecto de Trabajo de Grado o de
Tesis Titulado (a): "Estudio Funcional de una beta-xilosidasa
mutante (XynB2 YSD9E) y su inmovilización sobre
soportes naturales y sintéticos"

De la Especialización en: Maestría en: Doctorado en:

Química Tecnológica

Cuyo Ance es: GABRIELA ROMERO C.I. 9.860.726

Certificamos que hemos evaluado el referido Proyecto con el siguiente resultado:
APROBADO NO APROBADO

Firmas y Cédulas de identidad de los miembros del Jurado Evaluador:

Prof. (Coordinador) [Firma] C.I. N° 10.146.766
Miembro Principal Prof: [Firma] C.I. N° 11.809.738
Miembro Principal Prof: Elizbeth Ferrer C.I. N° 7.101.850

En Valencia a los 14 del mes 05 del año 2018



DEDICATORIA

A mis hijos, Tomás Antonio y Pedro Joaquín

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

Debo reconocer y agradecer el apoyo institucional que ha hecho posible que este trabajo rinda sus frutos:

En primer lugar, agradezco a la Universidad de Carabobo haberme concedido una Beca Sueldo y Año Sabático (Plan Conjunto), aprobado según oficio CD-004-534-2016, lo que me ha permitido, a través de la descarga de docencia, el tiempo necesario para la ejecución de la parte experimental de esta tesis doctoral.

Así mismo, debo agradecer la concesión de financiamiento por parte de Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), destinado a la realización de proyectos de I+D+i que, por su temática y objetivos, deben estar necesariamente incluidos en alguna de las prioridades temáticas de la Estrategia de Innovación de Andalucía 2014-2020, aprobado bajo el código UAL18-CTS-B032-A y que facilitó el desarrollo de parte de los experimentos implementados en esta investigación.

Igualmente, mi agradecimiento a la Universidad de Almería, quien consideró este proyecto dentro de lo estimado para la Investigación propia y el Plan de Transferencia 2020 (PPUENT2020 /006).

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, quienes me recibieron cordialmente para una estancia de investigación desde Diciembre del 2018 a mayo 2019. Con el auspicio del Laboratorio de Biocatálisis y Biorecursos fue posible la oportunidad de desarrollar los experimentos iniciales para los objetivos 4 y 5 de este trabajo.

Por último, pero no menos importante, esta investigación encuentra sus antecedentes en los trabajos realizados por mis tutores, quienes establecieron la línea de investigación a través de un financiamiento otorgado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH- 345-2012), de manera indirecta este trabajo se ha visto favorecido de ello y merece el reconocimiento y agradecimiento.

Resultados parciales de esta investigación fueron publicados durante el año 2021 como: *Characterization of Cross-Linked Enzyme Aggregates of the Y509E Mutant of a Glycoside Hydrolase Family 52 β -xylosidase from *G. stearothermophilus* en *Molecules*, 26(2), 451.*

AGRADECIMIENTOS

Es difícil recordar a todas las personas que de una forma u otra han contribuido a que esta etapa de mi formación termine de manera exitosa. Debo dar gracias a Dios, hoy y todos los días, la salud de mi familia y la mía me han brindado relativa paz para poder avanzar en este tiempo tan complicado.

A mis tutores: Mariela, mi tutora, ahora mi amiga, una mujer a quien admiro profundamente y de quien he aprendido acerca de rigurosidad científica, biotecnología y compromiso con la Academia, compartiendo conmigo todos sus conocimientos científicos y su forma de ver la vida, por su visión siempre positiva ante cualquier resultado bueno o malo, por tantas horas de dedicación. A Jeff, quien con paciencia y simpatía supo orientarme en el transcurso de todo este trabajo, su forma de ver la ciencia y el mundo hace que todo sea o parezca más sencillo, ¡el Team Aguila-Pollito vivirá por siempre! ¡GRACIAS!

Aura, mi amiga y colega, siempre pendiente de los avances de este trabajo, siempre dispuesta a escuchar todos mis desvaríos y dudas, ¡te debo un montón de café!

Gracias igualmente a la Dra. Carolina Aguirre, profesora de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, quien me cobijó durante la estancia de investigación en su laboratorio, acompañó en diferentes momentos y me orientó acerca de la mejor forma de desarrollar experimentos e hizo aportes valiosos desde su experiencia.

A los Doctores. Josefa M. Clemente J, Felipe Rodríguez-Vico y Francisco Las Heras-Vázquez de la Universidad de Almería, quienes apoyan este trabajo desde el principio, espero podamos encontrarnos para celebrar la culminación de esta investigación que también es de ustedes.

A Tomi, PJ, Nashi y Sara, ellos han estado siempre atentos a los avances de este trabajo; mi familia y amigos, que en los momentos de decaimiento han representado un consuelo y esa fuerza positiva que te impulsa a seguir.

Especial agradecimiento dentro de la FACYT a los profesores del programa doctoral, al personal del Laboratorio de Biotecnología en el que funciona AMBIOQUIM, a mis nuevos amigos Biólogos, Milagros, Marcelo, Luis y a la Licenciada Nexi Peraza por su incansable

trabajo dentro del área de postgrado. A Ruby, del Laboratorio de Biocatálisis y Biorecursos de la FC-UCSC, gracias por los cafecitos y la buena conversación en los días mas fríos! Ya nos volveremos a encontrar.

A todos quienes de una forma u otra hicieron un aporte, dando ánimos, incondicionales y que aprendieron a no preguntar ¿cuánto falta?

A todos, GRACIAS.

RESUMEN

La inmovilización de enzimas es un proceso de gran interés por los beneficios que representa recuperar y reutilizar un biocatalizador. La búsqueda de soportes con características especiales y las diferentes técnicas de inmovilización son el objeto de numerosas investigaciones, de allí que la propuesta principal de esta tesis doctoral haya sido inmovilizar el mutante de una β -xilosidasa de *G. stearothermophilus*, XynB2^{Y509E}, utilizando diferentes soportes y técnicas de inmovilización. XynB2^{Y509E} de *G. stearothermophilus* fue expresado de manera exitosa en *E. coli* C43 (DE3), la mutación Y509E produce pocos cambios en la estructura y conformación en comparación con la enzima silvestre expresada en las mismas condiciones con pequeñas variaciones en la concentración del inductor. En la caracterización bioquímica, XynB2^{Y509E} al igual que la enzima silvestre, se muestra estable en el rango de valores de pH entre 5,5 y 8, reteniendo más del 60% de su actividad luego de 1 h de incubación a 25°C. Respecto al efecto de la temperatura sobre la actividad se encontró un descenso de 5°C en la temperatura máxima de actividad del mutante Y509E cuando se compara con la forma silvestre, que puede explicarse por cambios en fuerzas estabilizadoras como puentes de hidrógeno, luego de la mutación. XynB2^{Y509E} fue inmovilizada de manera exitosa en forma de agregados enzimáticos entrecruzados, reteniendo más del $92,3 \pm 0,7$ % de su actividad de β -xilosidasa original. Aunque los valores de pH y temperatura para la actividad máxima después de la inmovilización se mantuvieron sin cambios (pH 6,5 y 65 °C), se encontró una mejora en la estabilidad frente al pH y en la termoestabilidad, así como un aumento importante en la estabilidad operacional después de la inmovilización. El análisis de los parámetros cinéticos muestra que el valor K_M de XynB2^{Y509E}-CLEAs obtenido fue ligeramente superior que la de XynB2^{Y509E} libre (1,2 frente a 0,9 mM). Como un hecho notable, la actividad de xilanas desarrollada por la mutación también se conservó después del proceso de inmovilización. La enzima XynB2^{Y509E} también fue inmovilizada sobre esferas de quitosano, utilizando dos métodos para ello: el atrapamiento y la formación de enlaces covalentes por modificación del soporte con glutaraldehído. La enzima inmovilizada por atrapamiento mostró mejoras en los parámetros de estabilidad operacional con respecto a la enzima libre: mantiene más del 80% de su actividad luego de su incubación por 1 h a pH 8, exhibe mayor termoestabilidad ya que preserva su actividad en más del 90% después de 1h de pre-incubación a 70°C, presenta un 45% de su actividad inicial tras 2 meses de almacenamiento a 4°C y 50% de la actividad enzimática original tras 10 ciclos de reuso. La enzima inmovilizada por enlace covalente sobre esferas de quitosano modificado con glutaraldehído muestra una estabilidad térmica superior a la enzima libre y a la enzima inmovilizada por atrapamiento ya que después de 1 h de incubación a 70°C preserva el 100% de su actividad, incluso conserva hasta el 30% de la actividad inicial luego de permanecer 1 h a 80°C. La retención de la actividad catalítica dual solo se mantuvo en la inmovilización por enlaces covalentes. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral sugieren que las formas de XynB2^{Y509E} inmovilizadas, como CLEAS y en quitosano, son más estables que la enzima libre, confirmando la idoneidad de la inmovilización como herramienta para incrementar la estabilidad operacional del biocatalizador.

ABSTRACT

Enzymes immobilization is an important process given the benefits to recover and reuse the biocatalyst. The search for immobilization supports with special characteristics and employing different immobilization techniques have been subject of numerous investigations, hence the main purpose of this doctoral thesis was to immobilize XynB2^{Y509E}, a mutant form of a β -xylosidase from *G. stearothermophilus*, using different supports and immobilization approaches. XynB2^{Y509E} from *G. stearothermophilus* was successfully expressed in *E. coli* C43 (DE3), the Y509E mutation produces few structural and conformational changes compared to the silvestre enzyme expressed under the same conditions, with small variations in IPTG concentration. The biochemical characterization of both XynB2^{Y509E}, and the silvestre enzyme, resulted in a stable activity within the pH range between 5.5 and 8.0, retaining more than 60% of its activity after 1 h of incubation at 25°C. Regarding the effect of temperature on the activity, a 5°C decrease of the maximum activity temperature of the Y509E mutant was measured, when compared to the silvestre form, duly explained by changes in stabilizing forces, such as hydrogen bonds, after mutation. XynB2^{Y509E} was successfully immobilized in the form of cross-linked enzyme aggregates, retaining $92.3 \pm 0.7\%$ of its original β -xylosidase activity. Although pH and temperature values responsible for maximum activity after immobilization remained unchanged (pH 6.5 and 65°C), pH stability and thermostability were improved, and operational stability after immobilization significantly increased. Kinetic parameters analysis shows that the K_M value of XynB2^{Y509E}-CLEAs calculated was slightly higher than that of free XynB2^{Y509E} (1.2 vs. 0.9 mM). Remarkably, xylanase activity developed by the mutant was also preserved after the immobilization process.

XynB2^{Y509E} enzyme was also immobilized on chitosan spheres using two methods: entrapment and covalent bond formation by modification of the support with glutaraldehyde. Entrapment immobilization of the enzyme showed improvements in operational stability parameters compared to the free enzyme, maintaining over 80% of its activity after incubation for 1 h at pH 8, and exhibiting a greater thermostability, by preserving more than 90% of its activity after 1 h of pre-incubation at 70°C for 1 h. Moreover, it presented 45% of its initial activity after 2 months of storage at 4°C and 50% of the original enzyme activity after 10 cycles of reuse. Covalent-bonding immobilized enzyme onto chitosan spheres modified with glutaraldehyde showed a superior thermal stability when compared to both, the free enzyme and the entrapment-immobilized enzyme, since after 1 h of incubation at 70°C, it preserves 100% of its activity. Furthermore, it even retains up to 30% of the initial activity after 1 h at 80°C. The retention of the dual catalytic activity was maintained only in the immobilization by covalent bonding. Results obtained suggest that the immobilized forms of XynB2^{Y509E}, as CLEAS or with chitosan, are stabler than the free enzyme, confirming immobilization as a suitable technique to increase operational stability of the biocatalyst.

CONTENIDOS

DEDICATORIA	5
RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES	6
AGRADECIMIENTOS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INDICE DE TABLAS	14
INDICE DE FIGURAS	14
ABREVIATURAS	17
CAPÍTULO 1.....	18
RESUMEN.....	18
EL PROBLEMA.....	18
Objetivos de la investigación	21
Justificación de la investigación	21
Revisión de la literatura.....	23
Xilano	23
β -xilosidasas	25
Obtención y purificación de enzimas recombinantes	29
Métodos biofísicos para el análisis de enzimas	30
Inmovilización enzimática	31
Soportes	34
Entrecruzamiento	35
Tipos de soporte	35
REFERENCIAS	37
CAPITULO II.....	43
ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPRESIÓN SOLUBLE Y PURIFICACIÓN DE XYNB2^{Y509E} DE <i>G. STEAROTHERMOPHILUS</i> PRODUCIDA EN UN SISTEMA DE <i>E. COLI</i>: SELECCIÓN DE LA CEPA, CONCENTRACIÓN FINAL DE IPTG, TEMPERATURA Y TIEMPO DE EXPRESIÓN	43

RESUMEN	43
INTRODUCCIÓN	43
MATERIALES Y MÉTODOS	45
Expresión y purificación	45
Electroforesis.	46
Actividad Enzimática	46
RESULTADOS	47
Purificación	49
DISCUSIÓN	51
REFERENCIAS	55
CAPÍTULO III	57
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ESTRUCTURAL DEL MUTANTE XYNB2^{Y509E} DE <i>G. STEAROTHERMOPHILUS</i> POR ANÁLISIS DE SU ESTRUCTURA POR FLUORESCENCIA Y DICROÍSMO CIRCULAR Y DE SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DUAL: TEMPERATURA Y PH DE MÁXIMA ACTIVIDAD, ESTABILIDAD TÉRMICA, CINÉTICA DE INACTIVACIÓN TÉRMICA, K_M Y V_{MAX}.	57
RESUMEN	57
INTRODUCCIÓN	57
MATERIALES Y MÉTODOS:	59
Sobreexpresión y purificación	60
Electroforesis	60
Cuantificación de proteínas	60
Actividad de β -xilosidasa	61
Actividad de xilanasa	61
Efecto del pH sobre la actividad	61
Efecto de la temperatura	62
Determinación de parámetros cinéticos	62
Fluorescencia	62
Medidas de fluorescencia en el estado estacionario	62
Medidas con la sonda ANS	63
Efecto de la temperatura	63
Dicroísmo circular	63
RESULTADOS y DISCUSIÓN	65
Actividad de XynB2 ^{Y509E} con diferentes sustratos	66
Efecto de pH y temperatura sobre la actividad enzimática de XynB2 ^{Y509E}	67
Efecto del pH	69
Efecto de la temperatura	71
Parámetros cinéticos	72
Fluorescencia en estado estacionario de XynB2 ^{Y509E}	73
Dicroísmo circular de XynB2 ^{Y509E}	80

CONCLUSIONES.....	93
REFERENCIAS	95
CAPÍTULO IV.....	100
PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGREGADOS DE ENZIMA ENTRECruzADOS (CLEAS) DEL MUTANTE XYNB2^{Y509E} DE <i>G. STEAROTHERMOPHILUS</i>.....	100
Resumen Gráfico	100
RESUMEN.....	100
INTRODUCCIÓN.....	101
MATERIALES Y MÉTODOS.....	102
Reactivos	102
RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	105
Caracterización bioquímica de XynB2 ^{Y509E} libre e inmovilizada en CLEAs	108
Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad y la estabilidad	110
pH óptimo y estabilidad a valores de pH	111
Parámetros cinéticos para XynB2 ^{Y509E} libre e inmovilizada en CLEAs	112
Reusabilidad	113
CONCLUSIONES.....	114
REFERENCIAS	115
CAPÍTULO V.....	118
SOPORTES DE QUITOSANO PARA LA INMOVILIZACIÓN DE XYNB2^{Y509E} POR ATRAPAMIENTO Y POR FORMACIÓN DE ENLACES COVALENTES.....	118
Resumen gráfico	118
RESUMEN.....	118
INTRODUCCIÓN.....	119
MATERIALES Y MÉTODOS.....	121
Rendimiento de la inmovilización y porcentaje de recuperación de la actividad	124
RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	127
Condiciones de preparación de la inmovilización de XynB2 ^{Y509E} por atrapamiento en esferas de quitosano	128
Condiciones para la inmovilización por formación de enlaces covalentes sobre esferas de quitosano activadas con glutaraldehído	132
Efectos de la inmovilización sobre la actividad y estabilidad	134
Efecto de la temperatura y termoestabilidad	134
Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad	137
Efecto de la inmovilización sobre los parámetros cinéticos	138

Estabilidad operacional de XynB2 ^{Y509E} inmovilizada en esferas de quitosano	139
CONCLUSIONES	141
REFERENCIAS	143
CONCLUSIONES GENERALES	147
RECOMENDACIONES	148
SUMARIO	149

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Tabla de purificación de XynB2 ^{Y509E} expresada por <i>E. coli</i> C43 (DE3)	50
TABLA 2. Actividad de β -xilosidasa y de xilanasas de XynB2 ^{Y509E} para diferentes sustratos	66
TABLA 3. Parámetros cinéticos de la actividad β -xilosidasa de XynB2WT y XynB2 ^{Y509E} calculados mediante el ajuste hiperbólico de Michaelis-Menten	71
TABLA 4. Parámetros cinéticos de la actividad de xilanasas de XynB2 ^{Y509E}	72
TABLA 5. Parámetros cinéticos de la actividad hidrolítica sobre p-NPX de XynB2 ^{Y509E} libre e inmovilizada por entrecruzamiento, calculados mediante el ajuste hiperbólico de Michaelis-Menten	112
TABLA 6. Parámetros cinéticos para la actividad β -xilosidasa de XynB2 ^{Y509E} libre e inmovilizada en esferas de quitosano.	138

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de la ruptura enzimática del xilano	24
Figura 2 Mecanismo de retención de la catálisis enzimática tipo β , tomada de: Http://www.cazypedia.org/index.php/glycoside_hydrolases	27
Figura 3 Esquema de la vista frontal del dímero descrito por Espina <i>et al.</i> (2014).	27
Figura 4. Expresión de XynB2 ^{Y509E} en dos diferentes cepas de <i>E. coli</i> . (a)	46
Figura 5 Expresión de XynB2 ^{Y509E} en <i>E. coli</i> C43 con variaciones en temperatura y concentración de IPTG.	47
Figura 6. Expresión de XynB2 ^{Y509E} en <i>E. coli</i> C43 con variaciones en Tiempo de	14

inducción, concentración 0,1 mM IPTG	48
Figura 7. Fracciones de la purificación de XynB2 ^{Y509E} , elución con buffer imidazol.	49
Figura 8. Purificación de XynB2 ^{Y509E} por Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC-Co).	65
Figura 9. Caracterización de la actividad β-xilosidasa de XynB2 ^{Y509E} purificada.	67
Figura 10. Caracterización de la actividad xilanasa de XynB2 ^{Y509E} purificada.	68
Figura 11. Espectros de la emisión de fluorescencia de XynB2 ^{Y509E} a tres diferentes pH después de excitar a 280 nm.	73
Figura 12. Variación de la energía promedio de la fluorescencia de XynB2 ^{Y509E} en función del pH.	74
Figura 13. Variación de la energía promedio de la fluorescencia (círculos negros) y de la intensidad de fluorescencia a 340 nm (círculos blancos) de XynB2 ^{Y509E} en función del pH.	75
Figura 14. Variación de la intensidad de fluorescencia a 480 nm de la unión a ANS por XynB2 ^{Y509E} en función del pH.	76
Figura 15. Desnaturalización térmica de XynB2 ^{Y509E} seguida por cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca a pH 6,5.	78
Figura 16. Desnaturalización térmica de XynB2 ^{Y509E} seguida por cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca a diferentes valores de pH	79
Figura 17. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de XynB2 ^{Y509E} .	80
Figura 18. Cambios estructurales seguidos por dicroísmo circular y cambios en la actividad de XynB2 ^{Y509E} inducidos por el pH.	82
Figura 19. Desnaturalización térmica de XynB2 ^{Y509E} a pH 6,5 determinada por CD. Se siguió el cambio en la elipticidad bruta a 222 nm.	83
Figura 20. Desnaturalizaciones térmicas por CD de XynB2 ^{Y509E} registrada a 1 °C/min (○) y a 1,5 °C/min (●) respectivamente.	85
Figura 21. Desnaturalización química de XynB2 ^{Y509E} a pH 6,5 seguida por fluorescencia y por actividad enzimática.	87
Figura 22. Cinética de la desnaturalización química de XynB2 ^{Y509E} a pH 6,5 seguida por fluorescencia. Registro tras 24 h (○) y 1 mes (●) de incubación con GdnCl.	89
Figura 23. Elipticidad a 222 nm durante las reacciones de desplegamiento (círculos abiertos) y repleglamiento (cuadrados abiertos) de XynB2 ^{Y509E} a pH 6,5.	91
Figura 24. Desnaturalización térmica de XynB2 ^{Y509E} a 2 M de GdnCl durante las reacciones de desplegamiento (curva negra) y repleglamiento (curva roja).	92
Figura 25. a. Precipitación de XynB2 ^{Y509E} con diferentes agentes precipitantes; b. Precipitación de XynB2 ^{Y509E} a diferentes tiempos usando sulfato de amonio al 90%; c. Concentración de glutaraldehído para la reacción de entrecruzamiento; d. Tiempo de entrecruzamiento usando 12.5 mM de glutaraldehído.	105

Figura 26. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los agregados entrecruzados de XynB ^{Y509E} , preparados a pH 6,5 (a) y pH 8,5 (b).	107
Figura 27. Efecto del tiempo de reacción sobre la actividad xilanasa (a) y sobre la actividad β-xilosidasa (b) mostrada por la forma soluble (□), y la enzima inmovilizada como CLEA preparada a pH 6,5 (♦) y pH 8,5 (■).	108
Figura 28. Efecto de la temperatura sobre la actividad β-xilosidasa y estabilidad de XynB2 ^{Y509E} libre e inmovilizada en CLEAs.	110
Figura 29. Efecto del pH sobre la actividad β-xilosidasa y estabilidad de XynB2 ^{Y509E} libre e inmovilizada en CLEAs.	111
Figura 30. Reusabilidad de los CLEAs de XynB2 ^{Y509E}	113
Figura 31. Representación gráfica del protocolo de la inmovilización de XynB2 ^{Y509E} por atrapamiento en esferas de quitosano	122
Figura 32. Representación gráfica de las interacciones en la inmovilización de XynB2 ^{Y509E} por formación de enlaces covalentes sobre esferas de quitosano activado con glutaraldehído	123
Figura 33. Estandarización de las condiciones de inmovilización del mutante XynB2 ^{Y509E} , por atrapamiento en esferas de quitosano.	130
Figura 34. Efecto de condiciones de preparación para activación de las esferas de quitosano sobre la actividad.	131
Figura 35. (a). Efecto de la temperatura sobre la actividad de XynB2 ^{Y509E} libre (■), XynB2 ^{Y509E} inmovilizada por atrapamiento en esferas de quitosano (o) y XynB2 ^{Y509E} inmovilizada en esferas de quitosano activadas con glutaraldehído (Δ). (b) Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de XynB2 ^{Y509E} libre (■), XynB2 ^{Y509E} inmovilizada por atrapamiento en esferas de quitosano (o) y XynB2 ^{Y509E} inmovilizada en esferas de quitosano activadas con glutaraldehído (Δ).	135
Figura 36. Efecto del pH sobre la actividad (a) y la estabilidad (b) de la enzima libre (■) e inmovilizada en quitosano por atrapamiento (o) y enlaces covalentes (Δ).	136
Figura 37. Estabilidad operacional de XynB2 ^{Y509E} inmovilizada en esferas de quitosano.	140

ABREVIATURAS

CD: Dicroísmo circular

CLEA: Crosslinked enzyme aggregates

***E. coli* C43:** *Escherichia coli* Cepa 43

GH52: Familia 52 de las glicosil hidrolasas

IMAC: cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC)

IPTG: Isopropil tiogalactósido

LB: Medio de cultivo Luria-Bertani

***o*-NPX:** *o*-nitrofenil xilopiranosido

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoruro

***p*-NPAF:** *p*-nitrofenil α -L-arabinofuranósido

***p*-NPG:** *p*-nitrofenil β -D-glucopiranosido

***p*-NPX:** *p*-nitrofenil xilopiranosido

PR: Proteína recombinante

SDS: Dodecil sulfato de sodio

Tampón CFG: tampón Citrato- Fosfato- Glicina

XynB2 WT: β -xilosidasa *silvestre* del *Geobacillus stearothermophilus*

CAPÍTULO I

RESUMEN

El estudio de enzimas con potencial uso industrial es, en la actualidad, el foco de numerosas investigaciones debido a la tendencia de preservar el medio ambiente a través del aprovechamiento de la biomasa, de la transición a procesos de química verde y del uso de biocatalizadores. En este capítulo se expone una revisión acerca de enzimas glicosilhidrolasas que degradan el xilano, características y mecanismos; también se definen algunos aspectos de lo relacionado con métodos en ingeniería de proteínas, además de un breve estado del arte de los métodos de inmovilización de enzimas, materiales y soportes utilizados, todo ello para dar sustento al objetivo principal de esta tesis doctoral.

EL PROBLEMA

La biomasa es un conjunto heterogéneo de materia orgánica, tanto por su origen como por su naturaleza y composición, que puede emplearse para obtener energía. La más abundante en la naturaleza es la biomasa de origen vegetal o biomasa lignocelulósica, formada principalmente por celulosa, lignina y hemicelulosa, constituyentes del entramado de la pared celular de la célula vegetal (Romero *et al.*, 2014). La degradación de este complejo se realiza tradicionalmente a través de métodos físicos y químicos (Hendriks & Zeeman, 2009; Knill & Keneddy, 2003), sin embargo, la tendencia mundial hacia la preservación del medioambiente y el ahorro de energía ha promovido la búsqueda y uso de biotecnología que facilite la ruptura del polímero en compuestos más pequeños y aprovechables (Sánchez-Ramírez *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2011).

En ese sentido, los estudios de aprovechamiento de la biomasa han sido dirigidos principalmente hacia su uso como alternativa potencial a los combustibles de origen fósil, ampliando las miras hacia la obtención de productos básicos para la industria química (Althuri *et al.*, 2017; Romero, 2010). La producción de etanol y otros productos bio-refinados a partir de la biomasa lignocelulósica incluye tres pasos: pretratamiento, sacarificación y fermentación (Althuri *et al.*, 2017). En la sacarificación, se produce la conversión de los polisacáridos de la pared celular en azúcares fermentables por hidrólisis enzimática (Goldbeck *et al.*, 2014), en la que participan de manera sinérgica un conjunto de enzimas hidrolasas (Juturu & Wu, 2012).

En este orden de ideas, las enzimas β -xilosidasas (EC 3.2.1.37) son un grupo de enzimas

que hidrolizan xilooligómeros cortos en unidades de xilosa. En la base de datos CAZy es posible encontrar que este tipo de enzimas se encuentran agrupadas actualmente en 11 familias diferentes de glicósido hidrolasas (GH) siendo estas: 1, 3, 5, 30, 39, 43, 51, 52, 54, 116 y 120 (Rohman *et al.*, 2019; Shallom & Shoham, 2003), y sus mecanismos de reacción involucran la inversión (GH43) o la retención (GH3, 39, 52 y 54) de la configuración del carbono anomérico (Dood & Cann, 2009). Las β -xilosidasas de fuentes termófilas tienen una gran utilidad en muchos procesos biotecnológicos (Quintero *et al.*, 2007), en particular las enzimas termo y alcalino estables pueden ser utilizadas en aplicaciones industriales donde las altas temperaturas y el pH alcalino sean parte integral del proceso (Soni *et al.*, 2017). Específicamente la β -xilosidasa de *G. stearotermophilus*, XynB2, perteneciente a la familia GH52 y obtenida a través de tecnología recombinante, ha sido caracterizada en distintas condiciones de actividad (Kurz *et al.*, 2014; Contreras *et al.*, 2008; Bravman *et al.*, 2001). Se han realizado modificaciones en residuos de XynB2, utilizando mutagénesis sitio dirigida para evaluar su estabilidad, así como potenciales cambios en su actividad catalítica (Huang *et al.*, 2014; Ben David *et al.*, 2007).

La obtención de estas enzimas a través de tecnología recombinante representa una opción interesante a nivel industrial pues permite la obtención de grandes cantidades de enzimas a bajo costo y en corto tiempo, pues para ello se utilizan sistemas cuyo mantenimiento, en muchos casos, es más barato que la obtención de la enzima en su forma natural (Guevara-Hernández, 2013). Debido a la facilidad para clonarlo, el sistema de *Escherichia coli* ha sido ampliamente utilizado en la expresión heteróloga de proteínas recombinantes (PR) (Chen, 2012; Ahmed *et al.*, 2009), de manera intra o extracelular, siendo la principal limitación que no todas las proteínas son secretadas de manera eficiente.

Sin embargo, la ventaja del uso de las PR es que se puede hacer mutagénesis sitio dirigida para modificar su secuencia de aminoácidos, algunos ejemplos de estas técnicas son: la PCR de extensión por sobreposición (OE-PCR: overlap extension – polymerase chain reaction, por sus siglas en inglés), mutagénesis de casete, el método de Kunkel entre otras. Esto permite cambiar la secuencia de aminoácidos y conferir o suprimir características específicas que se deseen estudiar, como la estabilidad térmica, la inmunogenicidad, propiedades estructurales o alguna otra de interés industrial (Palomares *et al.*, 2004). Algunas enzimas glicósido hidrolasas y hemicelulasas han sido modificadas

para la síntesis enzimática de oligosacáridos a través del reemplazo del residuo nucleofílico sin que se produzca la hidrólisis del producto. En el caso de las β -xilosidasas se han modificado residuos que mejoran su estabilidad a cambios de pH y temperatura y que además amplían su actividad (Ben David *et al.*, 2007, Bravman *et al.*, 2003).

En la actualidad las investigaciones están enfocadas en la inmovilización enzimática debido a que ofrece ventajas sobre la enzima libre tales como la estabilidad, reusabilidad o uso continuo en biorreactores (Sánchez-Ramírez *et al.*, 2014) y posible modulación de las actividades catalíticas (Mohamad *et al.*, 2015). De igual forma, se puede controlar la cantidad de enzima empleada en la reacción, optimizar la actividad de la enzima en función del pH y la temperatura y en algunos casos, la enzima inmovilizada puede estar protegida ante enzimas proteolíticas aumentando así la eficiencia del sistema. Sin embargo, la inmovilización también puede presentar ciertas desventajas dado que la actividad de la enzima puede verse afectada por el proceso de inmovilización o que la velocidad de reacción puede estar limitada por la velocidad de difusión de sustratos y productos hacia dentro y fuera del sistema (Sánchez –Ramírez *et al.*, 2014).

En referencia a los soportes utilizados para la inmovilización de enzimas las características deseables deben incluir hidrofiliidad, no reaccionar con la enzima, biocompatibilidad, resistencia a ataques microbianos, resistencia a las condiciones de la reacción para la que se requiere la enzima, accesibilidad y bajo costo (Mohamad *et al.*, 2015). La variedad de materiales que se disponen como soportes van desde nanopartículas magnéticas (Sánchez-Ramírez *et al.*, 2014), sílicas (Hartman *et al.*, 2013) hasta compuestos más simples y naturales como la quitina, polisacárido de amplia presencia en la naturaleza, que se ha utilizado con éxito en la inmovilización de enzimas (Krajewska, 2004) y fármacos (Mena *et al.*, 2015).

Establecida la importancia que tiene para la industria el uso de biocatalizadores que puedan ser reutilizados y el hecho de que no existen reportes de mutantes de XynB2 inmovilizados sobre soportes orgánicos o de otra naturaleza, en esta investigación se plantea el estudio funcional de la β -xilosidasa modificada por mutagénesis sitio dirigida de la tirosina 509 por un ácido glutámico (XynB2^{Y509E}) en su forma libre e inmovilizada en soportes naturales y comerciales.

Objetivos de la investigación

La creciente demanda mundial de la industria biotecnológica pone de manifiesto la necesidad de mejorar la productividad, estabilidad, reutilización y vida útil de los biocatalizadores. Esta tesis doctoral tuvo por objetivo general estudiar la funcionalidad de la enzima mutante XynB2^{Y509E} y su inmovilización utilizando distintos métodos de inmovilización.

El abordaje de este objetivo general se ha desglosado en los siguientes objetivos específicos:

1. Estandarizar las condiciones de expresión soluble y purificación de XynB2^{Y509E} de *G. stearothermophilus* producida en un sistema de *E. coli*: concentración final de IPTG, temperatura de expresión, tiempo de expresión.
2. Caracterizar bioquímicamente el mutante de XynB2^{Y509E}, por análisis de su actividad enzimática dual: temperatura y pH de máxima actividad, estabilidad térmica, cinética de inactivación térmica, K_M y V_{max} para diferentes sustratos.
3. Determinar la estabilidad conformacional térmica y química del mutante de XynB2^{Y509E} a través de fluorescencia en el estado estacionario y por dicroísmo circular.
4. Evaluar la eficacia de soportes naturales (quitosano, quitosano activado) y/o comerciales para la inmovilización de XynB2^{Y509E} a través de atrapamiento y formación de enlaces covalentes.
5. Caracterizar las propiedades funcionales del mutante de XynB2^{Y509E} inmovilizado sobre los soportes preparados: temperatura y pH de máxima actividad, estabilidad térmica, estabilidad operacional.

Justificación de la investigación

El procesamiento biológico de biomasa y su aprovechamiento es una de las propuestas principales que los países desarrollados han adoptado como compromiso para revertir el efecto negativo sobre el medio ambiente producido por el uso de combustibles fósiles y promover el uso de fuentes de energía limpia y renovable (De Canio *et al.*, 2011). En los últimos años, la industria de combustibles y fuentes de energía se ha planteado la

producción de etanol de segunda generación a través del uso de enzimas, entre las que se cuentan las β -xilosidasas, que además de ofrecer posibilidades concretas como fuente de energía sostenible, impulsa transformaciones sociales y económicas planteadas en tratados internacionales (Araujo *et al.*, 2015). La adición de β -xilosidasas a cócteles enzimáticos ha demostrado mejorar la eficiencia en el proceso de descomposición de bagazo de caña de azúcar (Goldbeck *et al.*, 2014) y de maíz (Gao *et al.*, 2011) debido a la acción sinérgica de celulasas y hemicelulasas (Biely *et al.*, 2016; Álvarez *et al.*, 2016).

Específicamente las β -xilosidasas han sido ampliamente utilizadas a escala industrial, en el blanqueamiento de la pulpa de papel, como parte de una mezcla de enzimas para el tratamiento del papel reciclado (Kumar *et al.*, 2016) y en el procesamiento de pulpa de madera (Álvarez *et al.*, 2016). Igualmente se han utilizado en la industria de alimentos, en el mejoramiento de la masa de harina de trigo (Butt *et al.*, 2008) y en la clarificación de jugos y vinos (Espina *et al.*, 2014; Romo-Sánchez, 2013).

La obtención de estas enzimas a través del uso de tecnología recombinante representa una considerable disminución de los costos debido a la posibilidad de producir grandes cantidades de proteína con propiedades similares a la natural, en medios de cultivo de bajo costo y con una tasa de expresión alta (Espina *et al.*, 2014; Contreras *et al.*, 2008). Otra ventaja del uso de enzimas recombinantes es la posibilidad de practicar mutaciones sitio dirigidas que pueden optimizar el funcionamiento de la enzima para procesos de condiciones extremas de pH y temperatura.

Por razones técnicas y/o económicas, muchos procesos químicos catalizados por enzimas requieren el uso repetido de las mismas o biocatalizadores que puedan ser utilizados por largos períodos de tiempo (Fajardo *et al.*, 2011). En este orden de ideas, la inmovilización se define como un procedimiento capaz de dar un uso continuo a los biocatalizadores de manera tal que pueda controlarse, no solo la ubicación de las enzimas sino también modificar sus propiedades selectivamente. En el caso de las enzimas que participan en la degradación de la biomasa lignocelulósica, la inmovilización de enzimas representa una oportunidad científica y tecnológica para mejorar u optimizar las técnicas de inmovilización lo que permitiría ofrecer nuevas perspectivas para su aplicación en diversas áreas industriales.

Revisión de la literatura

Xilano

Es el polisacárido más importante en células vegetales y el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, por lo que constituye aproximadamente 1/3 del carbono orgánico renovable sobre la tierra (Marriot *et al.*, 2015). El xilano es el principal componente de la hemicelulosa, un carbohidrato polimérico complejo que incluye xilano, xiloglucano (heteropolímero de D-xilosa y D-glucosa), glucomanano (heteropolímero de D-glucosa y D-manosa), galactoglucomanano (heteropolímero de D-galactosa, D-glucosa y D-manosa) y arabinogalactano (heteropolímero de D-galactosa y D-arabinosa). Junto con la celulosa (1,4- β -glucano) y la lignina (compuesto polifenólico complejo), forman los principales constituyentes de la pared celular vegetal (Dood & Cann, 2009).

Debido a la heterogeneidad y complejidad descrita, la hidrólisis completa del xilano requiere una gran variedad de enzimas que actúen de manera sinérgica: las endo-1,4- β -D-xilanasas (EC 3.2.1.8) rompen aleatoriamente el esqueleto; las enzimas β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37) rompen monómeros de xilosa de los extremos no reductores de xilooligosacáridos y xilobiosa mientras que la remoción de grupos laterales es catalizada por enzimas α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.139), acetilxilano esterasas (EC 3.1.1.72) y esterasas del ácido ferúlico (EC 3.1.1.73) (Moreira & Filho, 2016; Juturu & Wu, 2013). En la figura 1 se observa la participación de las diferentes enzimas sobre la estructura del xilano.

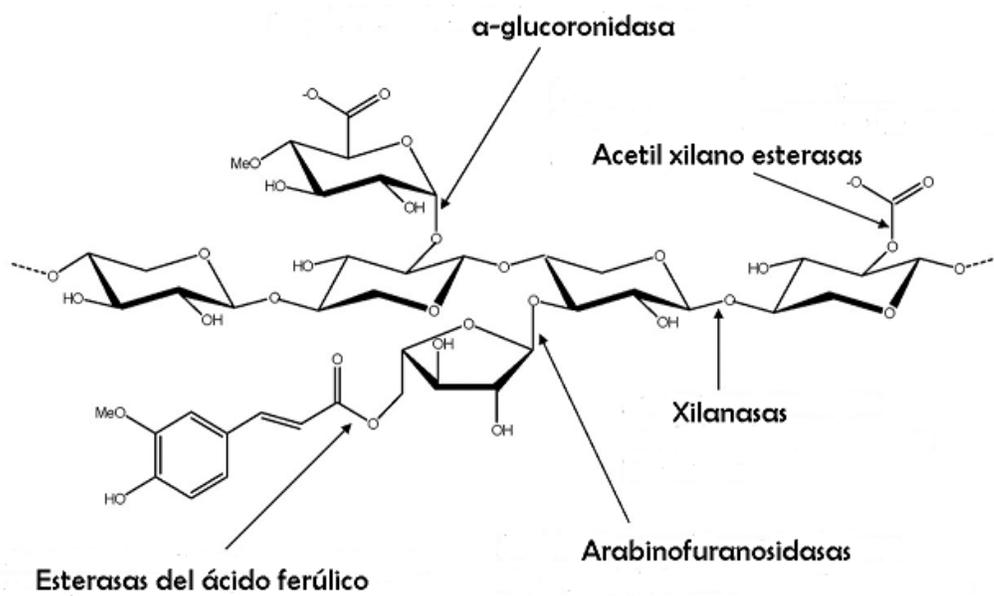


Figura 1 Esquema de la ruptura enzimática del xilano

β -xilosidasas

Las β -xilosidasas son hemicelulasas que participan en la hidrólisis xilooligosacáridos, un proceso esencial para la utilización completa de xilano el cual es un componente importante de la biomasa lignocelulósica (Juturu & Wu, 2012). Estas enzimas son fundamentales para la degradación completa del xilano, tanto por la ruptura de enlaces glicosídicos como por su participación en la degradación de productos de inhibición de xilanasas y celulasas (Fanchini *et al.*, 2016). De manera general son clasificadas por la Comisión de Enzimas (EC) como hidrolasas del grupo 3.

Por definición del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>), la xilano 1,4- β -D-xilosidasa cataliza la hidrólisis de residuos xilosil de los extremos no reductores de 1,4- β -D-xilooligosacáridos, incluyendo 1,4- β -D-xilobiosa. De acuerdo con la base de datos CAZY (http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html), las β -xilosidasas han sido agrupadas en once familias de glicósido hidrolasas, basando esta clasificación en similitudes de la secuencia aminoacídica. Existe otra clasificación que responde a la estructura plegada según la proporción de láminas (α/β) y las agrupa en clanes, sin embargo, aún existen muchas enzimas sin clasificar según estas características (Moreira & Filho, 2016; Jordan *et al.*, 2010).

Se han encontrado enzimas con actividad β -xilosidasa en bacterias (Shallom & Shoham, 2003), hongos (Polizeli *et al.*, 2005), entre otros. Con los avances tecnológicos cobra importancia la obtención de enzimas que puedan resistir los cambios de temperatura y pH de procesos industriales, por lo que el aislamiento a partir de organismos extremófilos ha sido propósito de numerosas investigaciones (Soni *et al.*, 2017). Específicamente de *Geobacillus stearothermophilus* se ha logrado el aislamiento de una β -xilosidasa de la familia GH52, la cual ha sido bien caracterizada biofísica y bioquímicamente (Contreras *et al.*, 2008; Bravman *et al.*, 2003; Bravman *et al.*, 2001).

Se conoce que los residuos que funcionan como nucleófilo catalítico y par ácido base en las β -xilosidasas de la familia GH52 son Glu335 y Asp495, respectivamente. El mecanismo de acción de estas enzimas se produce con retención de la configuración anomérica del sustrato con un mecanismo de doble desplazamiento o con una inversión de la configuración a través de un desplazamiento sencillo. Ambos mecanismos involucran un

estado de transición con formación del oxacarbonio y un par de ácidos carboxílicos en el sitio activo. La mayoría de las enzimas que degradan xilano trabajan vía doble desplazamiento y generalmente son descritas como endo-enzimas que rompen los enlaces glicosídicos internos de manera aleatoria o en posiciones específicas, otras son exo-enzimas que hidrolizan los enlaces glicosídicos terminales y liberan residuos de azúcares (Bravman *et al.*, 2001).

La glicosidasa “invertidora” (GH43) usa directamente el mecanismo de desplazamiento en el cual una molécula de agua directamente desplaza la aglicona a través de la participación directa de dos residuos carboxilo de aminoácidos de la enzima. En este mecanismo general, uno de esos grupos carboxilo actúa como base mientras que el otro actúa como ácido. De una manera similar, la catálisis por retención de la configuración (GH3, 39, 52 y 54) procede vía doble desplazamiento, un mecanismo que involucra un intermediario glicosil-enzima (Barker *et al.*, 2010). Durante el primer paso de la reacción de glicosilación, el catalizador ácido-base protona el oxígeno glicosídico concomitantemente con la ruptura del enlace y el ataque nucleofílico sobre el centro anomérico del sustrato, para formar un intermediario glicosil-enzima unido por enlaces covalentes. En el segundo paso (deglicosilación), el grupo catalítico ácido-base desprotona la molécula de agua entrante, la cual ataca el centro anomérico del sustrato, desplazando el azúcar (Bravman *et al.*, 2003b).

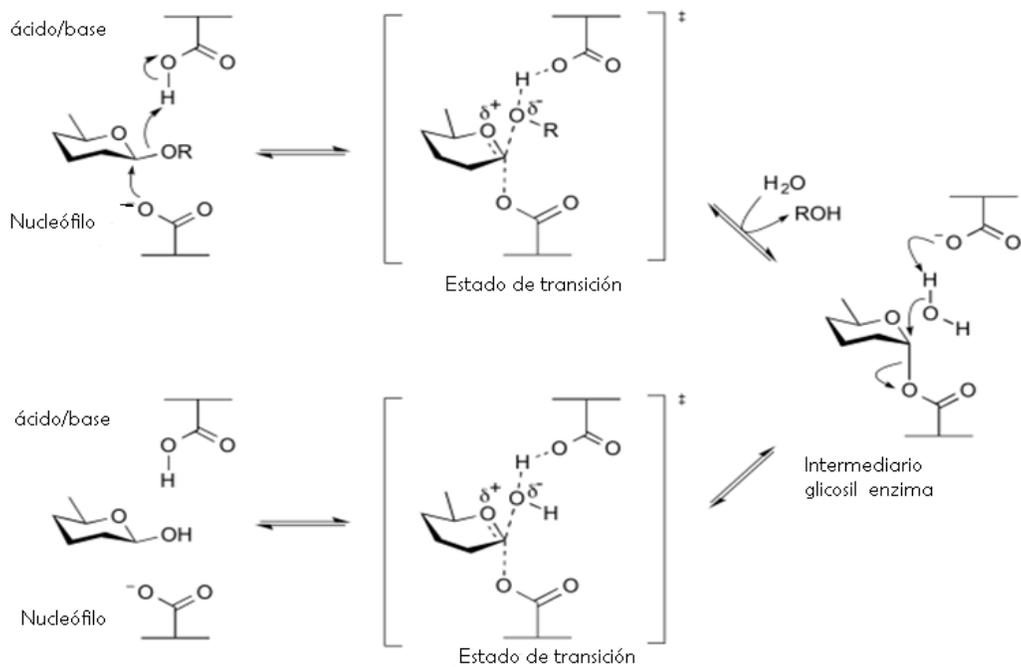


Figura 2. Mecanismo de retención de la catálisis enzimática tipo β (Bravman et al., 2003b)

Distintos investigadores han reportado las estructuras de varias β -xilosidasas, específicamente las de las familias GH3 y 43, sin embargo, de la glicosidohidrolasa de la familia 52 se conoce que es dimérica, con el sitio activo compartido entre ambos protómeros, además de presentar residuos aromáticos que no están involucrados con la actividad catalítica. La β -xilosidasa XynB2, aislada de *G. stearothermophilus*, posee 705 aminoácidos con una masa molecular de 79,9 kDa (Dann *et al.*, 2014; Contreras *et al.*, 2008). La enzima ha sido caracterizada bioquímicamente (Jordan *et al.*, 2013; Bravman *et al.*, 2003, 2001) y se conoce que está compuesta principalmente por hélices alfa (30%) y láminas beta en la estructura secundaria (Contreras *et al.*, 2008). Se ha elucidado su mecanismo de acción el cual resulta en la retención de la configuración del C anomérico (Bravman *et al.*, 2001) y a través de ensayos de mutagénesis sitio dirigida se determinó que los residuos catalíticos son Glu 335 y Asp 495 (Bravman *et al.*, 2003). Es una proteína cinéticamente termoestable con actividad óptima a pH 6,5 y 70°C (Kurz *et al.*, 2014; Contreras *et al.*, 2008) y mantiene hasta por 1 h de incubación a 60°C y rango de pH entre 5.0 y pH 6.5, alrededor del 60 % de su actividad máxima, lo que muestra su estabilidad (Huang *et al.*, 2014).

Espina *et al.*, 2014 publicaron la primera estructura tridimensional para una β -xilosidasa de la familia GH52, proveniente *Geobacillus thermoglucosidasius*, cuya estructura revela la similitud del plegamiento entre los miembros de esa familia (figura 3)

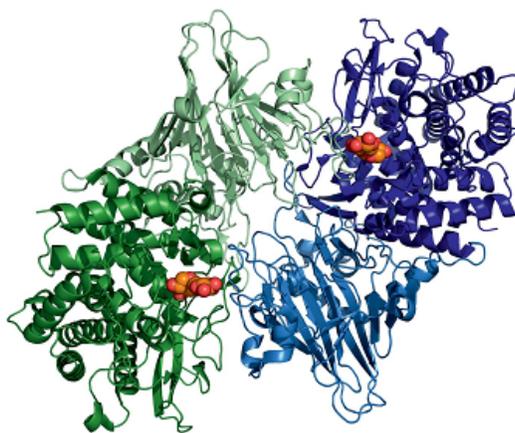


Figura 3. Esquema de la vista frontal del dímero descrito para XynB2 de *G. thermoglucosidasius* (Espina *et al.* 2014). Los dominios N-terminal son de color claro y los C-terminal de color oscuro. Se muestra a la xilobiosa (color naranja) en los sitios activos.

XynB2 ha sido sometida a mutagénesis sitio dirigida alterando residuos relacionados con el sitio activo, con el resultado de mutantes (E335G) con actividad glicosintasa (Ben Daviv *et al.*, 2007), o no relacionados como la mutación de la tirosina 509 por un ácido glutámico, rindiendo una nueva actividad de xilanasa (Huang *et al.*, 2014).

Obtención y purificación de enzimas recombinantes

Cada día es más frecuente que las enzimas industriales no se produzcan en los microorganismos donde se sintetizan inicialmente, sino que se expresen en hospedadores que ofrezcan ventajas en cuanto a velocidad de crecimiento, mantenimiento de cultivos, entre otros. El conocimiento del código genético hace posible que determinados péptidos y/o proteínas puedan ser “fabricados” por diversos organismos en los que no se producen de manera natural (Guevara *et al.*, 2013). A las enzimas producidas de esta manera se las conoce como enzimas recombinantes (ER). El procedimiento para producir una ER comienza con la introducción de la secuencia de ADN que codifica para la proteína de interés en el vector de sobreexpresión (plásmidos, virus, cósmidos). El vector contiene un origen de replicación que le permite copiarse dentro de la célula hospedera, una región promotora que permite la producción de la proteína de interés, un sitio de clonación múltiple (SCM), que es una región que contiene diversos sitios de restricción que permiten la inserción de ADN entre ellos y en algunos casos, genes de resistencia a antibióticos y genes reporteros, que facilitan la selección de las colonias de bacterias que tendrían el vector con la información genética insertada (Rosano & Cecarelli, 2014).

Estos hospedadores crecen mucho más rápido que la mayoría de los microorganismos y su purificación es más sencilla. Como sistema de expresión de proteínas recombinantes, es frecuente el uso de *E. coli*, por su fácil cultivo, rápido crecimiento y bajo costo de mantenimiento de las cepas (Belgasem & Salleh, 2015; Chen, 2012). Por otro lado, el ADN de la bacteria ha sido completamente secuenciado y esto facilita la purificación de la proteína deseada. En el caso de la sobreexpresión de enzimas de termófilos en microorganismos mesófilos, la única proteína resistente al calor será la recombinante

(Guisan, 2012). Por otro lado, las enzimas recombinantes pueden ser modificadas con dominios que estarán únicamente presentes en ella, lo que facilita su purificación utilizando soportes cromatográficos que sean capaces de adsorber los dominios añadidos. Tal es el caso de la cola de histidina, un dominio muy pequeño que se adsorbe sobre soportes que contienen quelatos metálicos (Young *et al.*, 2012).

Para impedir el crecimiento de células libres de plásmidos, se agrega un marcador de resistencia al plásmido, generalmente se utilizan genes de resistencia a antibióticos, en el caso de la resistencia a ampicilina, esta es conferida por el gen *bla*, que produce una enzima periplásmica que inactiva el anillo β -lactámico del antibiótico. Sin embargo, como la β -lactamasa se secreta continuamente, la degradación del antibiótico se produce igualmente y en un par de horas, la ampicilina está casi agotada, por lo que las células que no llevan el plásmido pueden aumentar en número durante el cultivo si no se controla el tiempo de crecimiento (Rosano & Cecarelli, 2014).

Métodos biofísicos para el análisis de enzimas

Las proteínas tienen cuatro niveles de estructura: primario, referido a la secuencia de aminoácidos; secundario, relacionado con la ordenación regular y periódica en el espacio de las cadenas polipeptídicas a lo largo de una dirección, siendo las más comunes hélices α y láminas β ; la estructura terciaria es el modo como se pliega de manera estrecha la secuencia de polipéptidos hasta formar la estructura globular en un espacio tridimensional y que se relaciona con la función propia de la proteína. Finalmente, la estructura cuaternaria se refiere a la forma en que se relacionan dos o más cadenas polipeptídicas de una proteína. La caracterización de estas conformaciones permite conocer a profundidad aspectos como sitio activo y estabilidad de una enzima con potencial uso industrial, por lo cual el uso de métodos espectroscópicos es frecuente en su caracterización funcional.

Una técnica que permite detectar la quiralidad de las estructuras moleculares y proporciona información acerca de las estructuras secundaria y terciaria de una proteína, es la espectroscopía de dicroísmo circular (DC), que detecta la quiralidad de la molécula, así como las cadenas laterales de la estructura (Miles *et al.*, 2021). Esta técnica se ha utilizado

ampliamente para discernir la estructura secundaria de las proteínas basándose en las transiciones electrónicas $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ de enlaces peptídicos y en algunos casos de cadenas laterales de aminoácidos aromáticos, que pueden contribuir de manera significativa al espectro que se genera con la excitación a longitudes de onda del ultravioleta lejano (UV) (~240 a 170 nm) y para monitorear el entorno de la estructura terciaria local de los residuos de aminoácidos aromáticos en la región del ultravioleta cercano (~300 a 260 nm), en función de su entorno físico o químico, igualmente la composición de aminoácidos, evaluar el efecto de posibles mutaciones además de las interacciones intermoleculares. Así mismo, el análisis de infrarrojo permite obtener información acerca de cadenas laterales y de los enlaces amida en la estructura secundaria (Barraza-Garza *et al.*, 2013).

Específicamente para la XynB2WT se conocen espectros de CD y FTIR a partir de los cuales se conoce la predominancia de hélices α y hojas β en la estructura secundaria. Gracias a estudios de fluorescencia intrínseca y de CD se determinó que XynB2 presenta un pK_a de $4,2 \pm 0,1$; con una conformación estable entre pH 6 y 9. Asimismo, la termoestabilidad que presenta la enzima, se podría explicar por la mayor proporción de aminoácidos cargados y residuos hidrofóbicos en comparación con otras proteínas de termófilos. Sin embargo, a pesar de la enorme estabilidad que presenta la enzima a altas temperaturas, una vez que la enzima se desnaturaliza por diversos factores, la actividad catalítica es irre recuperable debido a que los monómeros no son estables de forma aislada (Contreras *et al.*, 2008).

Inmovilización enzimática

La baja estabilidad térmica de las enzimas, así como un estrecho rango de pH para su funcionamiento y la pérdida después de su uso, son algunos de los problemas que enfrenta la biotecnología industrial (Es *et al.*, 2015). La inmovilización de enzimas es un proceso que favorece su uso como biocatalizadores industriales ya que permite la reutilización de la enzima y simplifica en muchos casos el diseño del proceso y el rendimiento de la reacción (Jesionowsky *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2013), debido a que en algunos casos mejora la estabilidad de la enzima a cambios de pH y temperatura propios de los procesos industriales (Fanchini *et al.*, 2016; Mateo *et al.*, 2007; Krajewska, 2004).

La inmovilización enzimática es un procedimiento que consiste en mantener la biomolécula unida o atrapada en un soporte físico, conservando su actividad catalítica y permitiendo el flujo de sustratos y productos (Bilal *et al.*, 2017; Fajardo *et al.*, 2011). Los métodos ensayados para la inmovilización de enzimas pueden ser químicos y físico-químicos (Sheldon & Van Pelt, 2013) y su elección dependerá de la naturaleza del soporte, de la enzima y de la aplicación y uso de la misma (Rehm *et al.*, 2016). Las enzimas pueden ser inmovilizadas sobre sustratos naturales y/o sintéticos, por medios químicos (uniéndolas al sustrato mediante enlaces covalentes) o físicos (fuerzas electrostáticas, iónicas, membranas) o pueden ser atrapadas o encapsuladas en algún material a través de la adición de agentes que formen una película protectora alrededor de la enzima inmovilizada, permitiendo el paso selectivo de reactivos y productos de pequeño tamaño (Rehm *et al.*, 2016).

Entre los métodos propuestos para la inmovilización de proteínas se encuentra la adsorción a través de interacciones físicas generadas entre el soporte y la enzima: fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas y puentes de hidrógeno. Las uniones son débiles y generalmente no alteran la estructura nativa de la enzima (Jesionowsky *et al.*, 2014). La ventaja de este tipo de inmovilización radica en que la naturaleza de la unión entre enzima y soporte permite deshacer el complejo una vez que decae la actividad de la enzima, con la regeneración del soporte que puede ser recargado con enzima fresca (Ali *et al.*, 2017; Brena *et al.*, 2006).

La adsorción puede ser no específica, por enlaces iónicos, adsorciones hidrofóbicas y por afinidad. El método más simple es el de adsorción no específica, que se fundamenta principalmente en las interacciones físicas por las que la enzima se une al soporte o matriz a través de enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas. La naturaleza de las fuerzas involucradas en la inmovilización no covalente permite que el proceso pueda revertirse cambiando las condiciones que afectan la fuerza de la interacción (pH, temperatura, polaridad de los solventes) (Brena *et al.*, 2006). El método consiste en poner en contacto la enzima en solución acuosa con un soporte adsorbente por un lapso de tiempo dado, para después lavar el soporte y eliminar la enzima que no fue inmovilizada (Fajardo *et al.*, 2011). La ventaja de este método radica en la simplicidad del proceso y el bajo costo que presenta, sin embargo, podrían presentarse problemas tales como

desprendimiento de la enzima del soporte cuando las uniones son relativamente débiles (Brena *et al.*, 2006).

El método de adsorción que implica la formación de enlaces iónicos se basa en interacciones proteína – ligando y ha sido utilizado principalmente en cromatografía de intercambio iónico. Es un método sencillo y reversible, pero es difícil hallar las condiciones bajo las cuales la enzima mantiene la fortaleza de la unión además de la actividad. Por otro lado, en las adsorciones hidrófobas no hay formación de enlaces sino interacciones impulsadas por entropía. Se basa en variables experimentales bien conocidas (pH, temperatura, concentración salina). La fortaleza de la unión depende tanto de la proteína como de la matriz o soporte. Finalmente, la inmovilización por afinidad se fundamenta en la complementariedad entre soporte y enzima. De este método destaca la interacción selectiva y altamente específica entre enzima y soporte. No obstante, su uso envuelve costos adicionales por el uso de ligandos específicos tales como anticuerpos (Brena *et al.*, 2006, Krajewska, 2004).

Por otra parte, también se ha utilizado como método de inmovilización el atrapamiento de enzimas en el interior de geles microporosos que se forman en presencia de la enzima, por ejemplo, en el entrecruzamiento químico de acrilamida y entrecruzamiento iónico de polímeros de alginato en presencia de iones calcio. Los complejos formados tienen una porosidad pequeña que no permite la salida de las enzimas desde la estructura microporosa, pero sí permiten la entrada y salida de sustratos y productos. Esta metodología de inmovilización no mejora significativamente las propiedades de la enzima, sin embargo, puede estabilizar enzimas multiméricas y se evitan procesos de interacción intermoleculares indeseables. Además, ofrece una encapsulación eficiente y estabilidad mecánica para la enzima atrapada, facilitando su uso en procesos químicos, biomedicina, biocombustibles (Ali *et al.*, 2017; Guisan, 2012).

La inmovilización por enlaces covalentes involucra la interacción de los residuos aminoacídicos y otros grupos funcionales de las diferentes cadenas laterales con el material de soporte (Graebin *et al.*, 2016). Se ha reportado la inmovilización de enzimas por enlaces covalentes utilizando soportes de sílica gel silanizada, a la que se le han removido grupos aldehídos no reactivos, con el resultado de una enzima altamente estable y reactiva.

Asimismo, se ha publicado que las uniones covalentes sobre sílica mesoporosa y quitosan, han mejorado el tiempo de vida y la estabilidad térmica de la enzima. Muchas enzimas inmovilizadas a través de enlaces covalentes sobre diferentes soportes son utilizadas por la industria farmacéutica por sus efectos positivos sobre la estabilidad y la posibilidad de reutilizar el catalizador (Ali *et al.*, 2017).

En la literatura es posible encontrar reportes de la inmovilización de manera exitosa de glicósido hidrolasas de otras familias utilizando adsorción, atrapamiento y formación de enlaces covalentes (Graebin *et al.*, 2016), incluso de β -xilosidasas provenientes de hongos y bacterias, a través de la formación de enlaces covalentes (Guerfaly *et al.*, 2009; Abdel-Naby *et al.*, 1993; Oguntimein & Reilly., 1980) sin embargo no se tiene reporte de inmovilización de XynB2 recombinante ni de sus mutantes.

Soportes

Diversos materiales pueden ser utilizados como soporte para fijar enzimas. El costo, la disponibilidad, la estabilidad en condiciones específicas y parámetros fisicoquímicos como grupos funcionales presentes en la superficie, porosidad, tamaño de la partícula, son algunos criterios que limitarán la selección del soporte adecuado (Jesionowsky *et al.*, 2014). En general, los soportes utilizados para la inmovilización de enzimas por absorción pueden ser clasificados en dos grandes grupos: inorgánicos, como las sílicas, titania e hidroxipatitas; y soportes orgánicos, que incluyen compuestos de origen natural como la quitina, quitosano, celulosa, alginato y otros compuestos sintéticos (Zdarta *et al.*, 2018; Salazar-Leyva *et al.*, 2014; Jesiownosky *et al.*, 2014).

Es probable que la inmovilización de una enzima multimérica, como la β -xilosidasa GH52, sea problemática pues las interacciones para la inmovilización pueden resultar en la inactivación de la actividad catalítica por disociación de las subunidades, aunque actualmente hay algunos reportes de inmovilización de xilanasas bacterianas a través de enlaces covalentes multipuntos (Fernández –La Fuente *et al.*, 2009).

Entrecruzamiento

De manera fundamental, la inmovilización de enzimas utilizando la técnica de formación de agregados y entrecruzamiento (Cross linked enzyme aggregates, CLEAs) conlleva dos pasos: la precipitación de la enzima soluble y el entrecruzamiento de los agregados formados. En el primer paso la enzima soluble semipurificada es agregada por la adición de agentes precipitantes tales como sales o solventes orgánicos miscibles en agua, sin afectar la estructura terciaria de la proteína y por tanto su actividad (Talekar *et al.*, 2013). En un segundo paso, los agregados formados son químicamente entrecruzados utilizando un reactivo que permita la reacción de los grupos amino de los residuos de lisina expuestos en la superficie de la enzima. Después del entrecruzamiento químico es importante que el agregado entrecruzado permanezca insoluble, manteniendo su estructura, así como la actividad catalítica.

Tipos de soporte

Las propiedades de las enzimas inmovilizadas son definidas por las propiedades de la propia enzima y del material del soporte. La interacción enzima-soporte afecta las propiedades físico-químicas y cinéticas del catalizador, lo que puede ser decisivo para la aplicación práctica de la enzima. Por otro lado, un determinado soporte puede mejorar las propiedades intrínsecas de la proteína libre, ofreciendo un valor agregado al de la recuperación de la enzima al final del proceso. Aunque no existen soportes universales y cada uno ofrece particularidades para diversos tipos de enzimas, existen características generales que son deseables al momento de seleccionar un material para inmovilizar: alta afinidad por las proteínas, disponibilidad de grupos funcionales reactivos para reacciones directas con la enzima y para modificaciones químicas, hidrofiliidad, estabilidad mecánica y rigidez, la posibilidad de regenerarse y la facilidad de preparación de diferentes configuraciones geométricas que permita al sistema la permeabilidad y superficie disponible para la biotransformación deseada (Zdarta *et al.*, 2018; Krajewska, 2004).

Igualmente, y según el uso o destino de la enzima inmovilizada, el soporte debe ser no tóxico y biocompatible; asimismo y en sintonía con tratados internacionales en pro de la

conservación medioambiental, los materiales utilizados deberían ser biodegradables, económicos y fáciles de producir. Entre los soportes orgánicos utilizados para la adsorción de enzimas es particularmente interesante el de quitina-quitosano (Harish-Prashant *et al.*, 2007; Krajewska, 2004). La quitina y el quitosano son polímeros naturales, específicamente poliaminosacáridos que proveen fuerza y estabilidad a estructuras como exoesqueletos de crustáceos e insectos, así como moluscos y hongos (Luo & Wang, 2013) y que después de la celulosa y el xilano son los polímeros naturales más abundante en el planeta.

El quitosano es un polisacárido compuesto de unidades glucosamina unidas por enlaces β -1,4. Por su carácter hidrofílico, biodegradable y biocompatible se utiliza frecuentemente como recubrimiento en fármacos. Además, presenta propiedades químicas importantes ya que es un compuesto policationico, que forma hidrogeles por entrecruzamientos iónicos o químicos y presenta grupos reactivos hidroxilos y aminos que facilitan las interacciones iónicas. Frecuentemente se combina quitosano con otros materiales para mejorar su estabilidad (Es *et al.*, 2015; Sánchez-Ramírez *et al.*, 2014).

REFERENCIAS

1. Abdel-Naby, M.A. (1993). Immobilization of *Aspergillus niger* NRC 107 xylanase and β -xylosidase, and properties of the immobilized enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 38: 69. <https://doi.org/10.1007/BF02916413>
2. Ahmed, S., Riaz, S., Jamil, A. (2009). Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Applied Microbiology Biotechnology*, 84:19–35 DOI 10.1007/s00253-009-2079-4
3. Ali, S., Zafar, W., Shafiq, S., Manzoor, M. (2017). Enzymes Immobilization: An overview of techniques, support materials and its applications. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 6 (07).
4. Althuri, A., Chintagunta, A., Sherpa, K., Rajak, R., Kundu, D., Singh, J., Rastogi, A., Banerjee, R. (2017). Microbial enzymes and lignocellulosic fuel production. En Arindam Kuila and Vinay Sharma (eds.) *Lignocellulosic Biomass Production and Industrial Applications*, (135–170). Scrivener Publishing LLC.
5. Álvarez, C., Reyes-Sosa, F.M., Díez, B. (2016). Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microbial Biotechnology*, 9(2):149-56. doi: 10.1111/1751-7915.12346.
6. Araújo, C., Alves, V., Groposo, C., Machado de Castro, A., Pereira, N. (2015). Enzymes and accessory proteins involved in the hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Mycology: Current and Future Developments*, 1, 23-56
7. Barker, I., Petersen, L., Reilly, P (2010). Mechanism of xylobiose hydrolysis by GH43 β -xylosidase. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(46):15389-93. doi: 10.1021/jp107886e
8. Barraza-Garza, G., Martínez-Martínez L., Castillo-Michel, A., Cotte, H., Alvarez-Parrilla, E. (2013). La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista latinoamericana de química*, 41(3), 125-148. Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-59432013000300001&lng=es&tlng=en.
9. Belgasem, F., Salleh, H. (2015). Characterization of recombinant enzymes. En Amid, A. (ed.), *Recombinant enzymes—from basic science to commercialization*, 2015. DOI 10.1007/978-3-319-12397-4_1
10. Ben-David, A., Bravman, T., Balazs, Y., Czjzek, M., Schomburg, D., Shoham, G., Shoham, Y. (2007). Glycosynthase activity of *Geobacillus stearothermophilus* GH52 β -xylosidase: efficient synthesis of xylooligosaccharides from a-D-xylopyranosyl fluoride through a conjugated reaction. *ChemBioChem*, 8, 2145 – 2151. DOI: 10.1002/cbic.200700414
11. Biely, P. Singh, S., Puchart, V. (2016). Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnology Advances*, DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.09.001>
12. Bilal, M., Iqbal, H., Shuqi, G., Hu, H., Wang, W., Zhang, X. (2017). State-of-the-art protein engineering approaches using biological macromolecules: a review from immobilization to implementation view point. *International Journal of Biological Macromolecules*, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.182>

13. Bravman, T., Belakhov, V., Solomon, D., Shoham, G., Henrissat, B., Baasov, T., Shoham, Y. (2003b). Identification of the catalytic residues in family 52 glycoside hydrolase, a beta-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(29): 26742-26749.
14. Bravman, T., Zolotnitsky, G., Belakhov, V., Shoham, G., Henrissat, B., Baasov, T., Shoham, Y. (2003a). Detailed kinetic analysis of a family 52 glycoside hydrolase: A α -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Biochemistry*, 42, 10528-10536
15. Bravman, T., Zolotnitsky, G., Shulami, S., Belakhov, V., Solomon, D., Baasov, T., Shoham, G., Shoham, Y. (2001). Stereochemistry of family 52 glycosyl hydrolases: a β -xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6 is a retaining enzyme. *FEBS Letters*, 495: 39- 43
16. Brena, B., González-Pombo, P., Batista-Viera, F. (2006) Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: Guisan J. (eds) Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1051, Totowa, NJ: Humana Press
17. Butt, M., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z., Sultan M. (2008). Xylanases and their applications in baking industry. *Food, Technology and Biotechnology*, 46 (1) 22–31.
18. Chen, R. (2012). Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances*, 30: 1102–1107.
19. Contreras, L., Gómez, J., Prieto, J., Clemente-Jiménez, J., Heras-Vázquez, F., Rodríguez-Vico, F., Blanco, F., Neira, J. (2008). The family 52 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* is a dimer: structural and biophysical characterization of a glycoside hydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1748(12): 1924-1934.
20. De Canio, P., De Bari, I., Romano, P. (2011). Latest Frontiers in the biotechnologies for ethanol production from lignocellulosic biomass. Biofuel Production - Recent Developments and Prospects, Dr. Marco Aurelio Dos Santos Bernardes (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/19825. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/biofuel-production-recent-developments-and-prospects/latest-frontiers-in-the-biotechnologies-for-ethanol-production-from-lignocellulosic-biomass>
21. Dood, D., Cann, I. (2009). Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Global Change Biology Bioenergy*, 18; 1(1): 2–17. doi:10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x
22. Es, I., Goncalves, J., Correa, A. (2015). Principles, techniques and application of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology Biotechnology*. 99:2065-2082. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25616529>
23. Espina, G., Eley, K., Pompidor, G., Schneider, T., Crenell, S., Danson, M. (2014). A novel β -xylosidase structure from *Geobacillus thermoglucosidasius*: the first crystal structure of a glycoside hydrolase family GH52 enzyme reveals unpredicted similarity to other glycoside hydrolase folds. *Acta Crystallographica*, 70: 1366-1374.
24. Fajardo, R., Osuna, J., VillaVelázquez, C., Escalante, P., Ibarra, V. (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Acta Química Mexicana*, 3 (6).

25. Fanchini, C., Romero-Fernández, M., Orrego, A., Martins, S., Costa, B., Cano, E., Guisan, J.M. (2016). Immobilization and stabilization of β -Xylosidase from *Penicillium janczewskii*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, DOI 10.1007/s12010-016-2331-1
26. Fernandez-Lafuente, R. (2009). Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 405–418.
27. Gao, D., Uppugundla, N., Chundawat, Sh., Yu, X., Hermanson, S., Gowda, K., Brumm, P., Mead, D., Balan, V., Dale, B. (2011). Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Biotechnology for biofuels*, 4:5. doi:10.1186/1754-6834-4-5
28. Goldbeck, R., Damásio, A., Gonçalves, T., Machado, C., Paixão, D., Wolf, L., Mandelli, F., Rocha, G., Ruller, R., Squina, F. (2014). Development of hemicellulolytic enzyme mixtures for plant biomass deconstruction on target biotechnological applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, DOI 10.1007/s00253-014-5946-6
29. Graebin, N., Schöffler, J., de Andrades, D., Hertz, P., Ayub, M., Rodrigues, R. (2016). Immobilization of glycoside hydrolase familie GH1, GH13, and GH70: state of the art and perspectives. *Molecules*, 21, 1074; doi:10.3390/molecules21081074
30. Guerfali, M., Maalej, I., Gargouri A., Belghith, H. (2009). Catalytic properties of the immobilized *Talaromyces thermophilus* β -xylosidase and its use for xylose and xylooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 57 (1–4): 242-249
31. Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A., Jiménez-Gutiérrez, L.R., Sotelo-Mundo, R.R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Biotecnica*, XV (3), 8-17
32. Guisán, J. (2012). Purificación e inmovilización de enzimas industriales. En: Monografía XXXV: Biocatálisis aplicada a la obtención de fármacos y productos de alto valor añadido. Madrid. DOI: <http://dx.doi.org/ES/monoranf.v0i0.13151>
33. Gupta, R., Mehta, G., Khasa, Y.P., Kuhad, R.C. (2011). Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of celluloses. *Biodegradation*, 22(4),797-804. doi: 10.1007/s10532-010-9404-6.
34. Harish-Prashanth, K.V., Tharanathan, R.N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18: 117- 131
35. Hartmann, M., Kostrov, X. (2013). Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. *Chemical Society Reviews*. DOI: 10.1039/c3cs60021a
36. Hendriks, A.T., Zeeman, G. (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1):10-8. doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.027.
37. Huang, Z., Liu, X., Zhang, S., Liu, Z. (2014). GH52 xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*: characterization and introduction of xylanase activity by site directed mutagenesis of Tyr509. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(1):65-74. Disponible en <http://bit.ly/2vFiYjO>
38. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Recommendations on

- Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology etc. Disponible en <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/>
39. Jesionowski, T., Zdarta, J., Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*, 20 (5–6): 801–821. Disponible en <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10450-014-9623-y.pdf>
 40. Jordan, D., Wagschal, K. (2010). Properties and applications of microbial β -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 86:1647–1658. DOI 10.1007/s00253-010-2538-y
 41. Jordan, D. B., Vermillion, K. E., Grigorescu, A. A., & Braker, J. D. (2013). Rehabilitation of faulty kinetic determinations and misassigned glycoside hydrolase family of retaining mechanism β -xylosidases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 537(2), 176-184.
 42. Juturu, V., Wu, J. (2013). Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88: 353–363
 43. Juturu, V., Wu, J.C. (2012). Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1219-1227. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.006>
 44. Knill, C., Kennedy, J. (2003). Degradation of cellulose under alkaline conditions. *Carbohydrate Polymers*, 51, 281–300
 45. Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35:126–139.
 46. Kumar, V., Marín-Navarro, J., Shukla, P. (2016), Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(2),34. doi: 10.1007/s11274-015-2005-0.
 47. Kurz, L., García, V., Wilkesman, J., Contreras, L. (2014). Enzymatic characterization of the recombinant β -xylosidase XynB2. *Journal of Medical and Biological Sciences*, 1:14-19
 48. Luo, Y., Wang, Q. (2013). Recent advances of Chitosan and Its Derivatives for Novel Applications in Food Science. *Journal of Food Processing & Beverages*, 1(1): 13.
 49. Marriott, P.E., Gómez, L.D., McQueen-Mason, S.J. (2015). Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. *New Phytologist*, 209(4):1366-81. doi: 10.1111/nph.13684.
 50. Mateo, C., Palomo, J., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J., Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1451–1463. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022907000506>
 51. Mena-Giraldo, P., Pérez-Buitrago, S., Pina, R., Hoyo, L. (2015). Síntesis de N-succinil-quitosano y formación de nanomicelas para transporte de fármacos hidrófobos. *Revista de Investigaciones Aplicadas*, 9(2)
 52. Miles, A. J., Janes, R. W., & Wallace, B. A. (2021). Tools and methods for circular

- dichroism spectroscopy of proteins: A tutorial review. *Chemical Society Reviews*.
53. Mohamad, N.R., Marzuki, N.H., Buang, N.A., Huyop, F., Wahab, R.A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29, 205–220. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192
 54. Moreira, L.R., Filho, E.X. (2016). Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Doi: 10.1007/s00253-016-7555-z
 55. Oguntimein, G.B., Reilly, P. J. (1980). Purification and immobilization of *Aspergillus niger* β -xylosidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 22: 1127–1142. doi:10.1002/bit.260220603
 56. Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S., Ramírez, O. T. (2004). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods in Molecular Biology*, 267:15-52.
 57. Polizeli, M., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J., Amorim, D. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 67: 577–591. DOI 10.1007/s00253-005-1904-7
 58. Quintero, D., Velasco, Z., Hurtado-Gómez, E., Neira, J., Contreras, L. (2007). Isolation and characterization of a thermostable β -xylosidase in the thermophilic bacterium *Geobacillus pallidus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1174: 510–518.
 59. Rehn F., Chen, S., Rehn, B. (2016). Enzyme engineering for *in situ* immobilization. *Molecules*, 21, 1370; doi:10.3390/molecules21101370
 60. Rodrigues, R., Claudia Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R., Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemicals Society Reviews*, 42, 6290- 6307
 61. Rohman, A., Dijkstra, B. W., & Puspaningsih, N. N. T. (2019). β -Xylosidases: Structural diversity, catalytic mechanism, and inhibition by monosaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5524.
 62. Romero, A. (2010). Aprovechamiento de la biomasa como fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*, 104 (2), 331-345
 63. Romero, E., Montero, G., Toscano, L., Pérez, L., Torres, R., Beleño, M. (2014). Determinación de los principales componentes de la biomasa lignocelulósica; celulosa, hemicelulosa y lignina de la paja de trigo para su posterior pretratamiento biológico. Trabajo presentado en XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas Agricultura sustentable: Uso eficiente del agua, suelo y fertilizantes. Instituto de Ciencias Agrícolas UABC, Mexicali, Baja California, México. ISBN 978 0 9908236 1 2. Disponible en <https://goo.gl/QLYjjZ>
 64. Romo-Sánchez, S., Arévalo-Villena, M., García Romero, E., Ramírez, H.L., Briones Pérez, A. (2013). Immobilization of B-glucosidase and its application for enhancement of aroma precursors in muscat wine. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1381–1392.
 65. Rosano, G., Ceccarelli, E. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(172).
 66. Salazar-Leyva, J., Lizardi-Mendoza, J., Ramírez-Suarez, J., García-Sánchez, G.,

- Ezquerro-Brauer, J., Valenzuela-Soto, E., Carvallo-Ruiz, M., Lugo-Sanchez, M., Pacheco-Aguilar, R. (2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13 (1): 77-98. Disponible en <http://bit.ly/2uE8u77>
67. Sánchez-Ramírez, J., Martínez-Hernández, J.L., Segura-Ceniceros, E.P., Contreras-Esquivel, J.C., Medina-Morales, M.A., Aguilar, C.N., Iliná, A. (2014). Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Química Nova*, Vol. 37, No. 3, 504-512, <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140085>
68. Shallom, D., Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6:219–228
69. Sheldon, R., van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42: 6223- <http://pubs.rsc.org/-/content/articlehtml/2013/cs/c3cs60075k>
70. Soni, H., Rawat, H., Kango, N. (2017). Extremophilic Xylanases. En R.N. Krishnaraj (eds.), *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*, DOI 10.1007/978-3-319-54684-1_5
71. Talekar, S., Joshi, A., Joshi, G., Kamat, P., Haripurkar, R., & Kambale, S. (2013). Parameters in preparation and characterization of crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). *Rsc Advances*, 3(31), 12485-12511.
72. Young, C., Britton, Z., Robinson, A. (2012). Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*, 7, 620–634. DOI 10.1002/biot.201100155
73. Zdarta, J., Meyer A., Jesionowski, T., Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2), 92. DOI:10.3390/catal8020092

CAPITULO II

ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPRESIÓN SOLUBLE Y PURIFICACIÓN DE XYNB2^{Y509E} DE *G. STEAROTHERMOPHILUS* PRODUCIDA EN UN SISTEMA DE *E. COLI*: SELECCIÓN DE LA CEPA, CONCENTRACIÓN FINAL DE IPTG, TEMPERATURA Y TIEMPO DE EXPRESIÓN

RESUMEN

La ingeniería de proteínas ha demostrado su utilidad para entender y adaptar aspectos moleculares de las enzimas, permitiendo la modificación y manipulación de la secuencia aminoacídica que define su función. XynB2WT fue sometida a una mutación en Y509E y los cambios en referencia a las condiciones de sobreexpresión, producto de esta mutación fueron determinados. XynB2^{Y509E} fue expresada de manera exitosa en *E. coli* C43(DE3), en las condiciones que se describen en este capítulo, entre las cuales resalta el cambio en la concentración necesaria del inductor para la expresión de la proteína, en comparación con la concentración utilizada para la expresión de XynB2WT.

INTRODUCCIÓN

Las β -xilosidasas son enzimas que degradan xilo-oligómeros provenientes de la ruptura del biopolímero xilano, liberando unidades de xilosa que pueden participar en el proceso de fermentación, rindiendo productos de alto valor agregado. Se han aislado β -xilosidasas de bacterias, hongos y plantas (Knob *et al.*, 2010; Polizeli *et al.*, 2005), de ambientes mesófilos y termófilos, siendo éstas últimas de gran interés para el uso industrial debido a la capacidad de ejercer su efecto catalítico a temperaturas elevadas (Selvarajan & Veena, 2017). La base de datos CAZy clasifica estas enzimas como glicosil hidrolasas (GH) de distintos clanes, con base en la homología de los elementos estructurales y ramificaciones hidrofóbicas. Se reconocen varias familias, las cuales hidrolizan los enlaces glicosídicos β -1,4 de los xilósidos de los que se remueven residuos de D-xilosa de los extremos no reductores (Collins *et al.*, 2005).

La obtención de enzimas utilizando tecnología recombinante ha sido objeto de numerosos estudios dada la importancia que reviste su uso en aplicaciones industriales, particularmente en la obtención de biocombustibles de segunda generación (Ragauskas *et al.*, 2006). La sobreexpresión de proteínas recombinantes ofrece la ventaja de producir grandes cantidades de la proteína de interés con características similares a la proteína natural, de manera fácil y rápida, en sistemas homólogos o heterólogos (Guevara-Hernández *et al.*, 2013). El procedimiento consiste en introducir el ADN que codifica para la proteína de interés en un vector de sobreexpresión (plásmidos, virus). El plásmido contiene un origen de replicación que le permite copiarse dentro de la célula huésped, una región promotora que permite la producción de la proteína de interés y en algunos casos, genes de resistencia a antibióticos (Lara, 2011; Sorensen & Mortensen, 2005).

La selección de la célula huésped para la sobreexpresión de la proteína en estudio es el punto de partida de todo el proceso. Esto define la tecnología necesaria para desarrollar el proyecto, herramientas moleculares, equipos y reactivos. Los sistemas hospedadores, todos con fortalezas y debilidades, incluyen bacterias, levaduras, hongos filamentosos y algas unicelulares. Por ejemplo, si se requieren modificaciones post-traduccionales no podría utilizarse un sistema procariota (Rosano & Cecarelli, 2014). En el caso de enzimas β -xilosidasas, se ha utilizado de manera frecuente *E. coli* debido a su alta tasa de replicación, bajo costo y facilidad de aislar la proteína expresada. La mayoría de las proteínas que se encuentra bien descritas en las bases de datos han sido preparadas en un sistema de expresión de *E. coli* (Sorensen & Mortensen, 2005).

Específicamente, la β -xilosidasa de *G. stearothermophilus* (XynB2) es una proteína de la familia GH52 que ha sido bien caracterizada (Kurz *et al.*, 2014; Contreras *et al.*, 2008; Bravman *et al.*, 2003; Bravman *et al.*, 2001) y que además ha sido sometida a mutagénesis sitio-dirigida en las que el resultado ha sido una enzima con actividad de transglicosidasa (Ben David *et al.*, 2007) o con actividad dual de β -xilosidasa y xilanasas (Huang *et al.*, 2014) lo que la hace de gran interés para fines industriales.

En este primer capítulo se documentan los resultados obtenidos respecto a las condiciones óptimas de sobreexpresión de la β -xilosidasa mutante XynB2^{Y509E}, en relación con la cepa de expresión, concentración del inductor IPTG, la temperatura óptima y tiempo de expresión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los materiales utilizados fueron de alta pureza. 4-nitrofenil β -D- xilopiranosido, 2-nitrofenil β -D-xilopiranosido, 2-mercaptoetanol (2ME), fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), imidazol y el medio LB fueron de la marca registrada Sigma-Aldrich. La acrilamida, el azul de bromofenol y azul brillante de Comassie R-250 utilizados fueron de la marca de Fisher. Bis-acrilamida, dodecil sulfato de sodio (SDS), glicerol, isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), marcador de peso molecular V849 y tris-base fueron de la marca Promega.

Expresión y purificación

Se utilizó el plásmido pJAVI100 para transformar células competentes de *E. coli* C43 (DE3) y B121 (DE3). pJAVI100, además de poseer el gen correspondiente a XynB2^{Y509E}, incluye un gen de resistencia a ampicilina y un marcador de cola de 6 histidinas antes del codón de finalización. Las células competentes frescas se colocaron en hielo durante 10 min con 2ME, luego fueron transformadas con 1,5 μ L del plásmido e incubadas 30 min en hielo. Transcurrido el tiempo se realizó un choque térmico de 42 °C por 45 s, con posterior incubación en hielo durante 2 min. Luego se recuperaron las células en 1 mL de medio LB y se incubaron a 37°C por 1h a 200rpm.

Los cultivos fueron concentrados por centrifugación (5000 rpm) y sembrados en 15 mL medio LB suplementado con ampicilina, e incubado toda la noche a 37 °C con agitación (200rpm). Una alícuota de 2 mL de cada cultivo anterior fue utilizado para inocular 200 mL de medio LB-ampicilina (0,05g ampicilina /l). El crecimiento bacteriano fue promovido por agitación constante a 200 rpm y 37 °C y monitoreado por su medición de la absorbancia a 600 nm hasta una DO entre 0,5-0,6 u.a. Una vez alcanzada esa DO el cultivo se inoculó con diferentes concentraciones de IPTG (1; 0,5 y 0,1 mM). Se hicieron ensayos simultáneos a

22 y 37 °C, durante 18 h, manteniendo la agitación (200 rpm). Pasado el tiempo, las células fueron colectadas por centrifugación a 6000 rpm por 10 min y preservadas a -20 °C.

Las células preservadas a -20 °C fueron resuspendidas en 30 mL de tampón de lisis (50 mM NaCl, 5 mM imidazol, 20 mM Tris (pH 8.0), 0.1%, 1 mM 2ME, 1 mM PMSF), evitando la formación de burbujas. La muestra fue sonicada por 10 ciclos, cada uno de 45 s con 15 s de pausa, todo el proceso se hizo a 4 °C. El lisado fue centrifugado a 10000 rpm por 30 min y el sobrenadante se preservó refrigerado hasta su purificación.

El sobrenadante se filtró en papel de filtro Fisherbrand de porosidad media. La purificación de XynB2^{Y509E} se hizo por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC). La resina utilizada fue una de cobalto His pur (TALON) que es específica para la purificación de proteínas con cola de histidina. La columna con la resina se equilibró con tampón de lavado (100 mM NaCl, 30 mM imidazol, 20 mM Tris, 1 mM 2ME). Se hizo pasar por esta columna todo el sobrenadante filtrado. La columna se lavó con 5 volúmenes de tampón de lisis, y la proteína XynB2^{Y509E} fue eluída con tapón de elución (500 mM NaCl, 500 mM imidazol, 20 mM Tris, 1 mM 2ME). Se recolectaron fracciones de 1 mL a las que se les midió la absorbancia a 280 nm y se unieron las fracciones con absorbancias entre 0,5 y 1 u.a.

Electroforesis.

La electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes se desarrolló de acuerdo con el protocolo descrito por LaemmLi (1970), utilizando un gel de poliacrilamida al 12% y en la cámara de corrida Mini-Protean III Bio-Rad Laboratories ®.

Actividad Enzimática

La actividad enzimática en las diferentes fracciones fue determinada de acuerdo con el método basado en la liberación de p-nitrofenol proveniente del sustrato p-nitrofenil xilopiranosido (p-NPX), con inactivación de la enzima por adición de Na₂CO₃ 1 M, luego de 5 min de reacción. Se midió la absorbancia a 410 nm y se utilizó el coeficiente de extinción molar de p-NPX (18 mM⁻¹.cm⁻¹) para el cálculo de la actividad. La unidad de actividad de β-xilosidasa se definió como la liberación de 1 μmol de p-nitrofenol en 1 min.

RESULTADOS

Los resultados que se muestran en la figura 4 representan los ensayos realizados para la selección de la cepa de expresión. Se utilizaron dos diferentes cepas, la BL21 (DE3) (Figura 4a) y la C43 (DE3) (Figura 4b). La BL21 (DE3) dado que es deficiente de proteasas mientras que la C43 (DE3) es útil para la expresión de proteínas tóxicas.

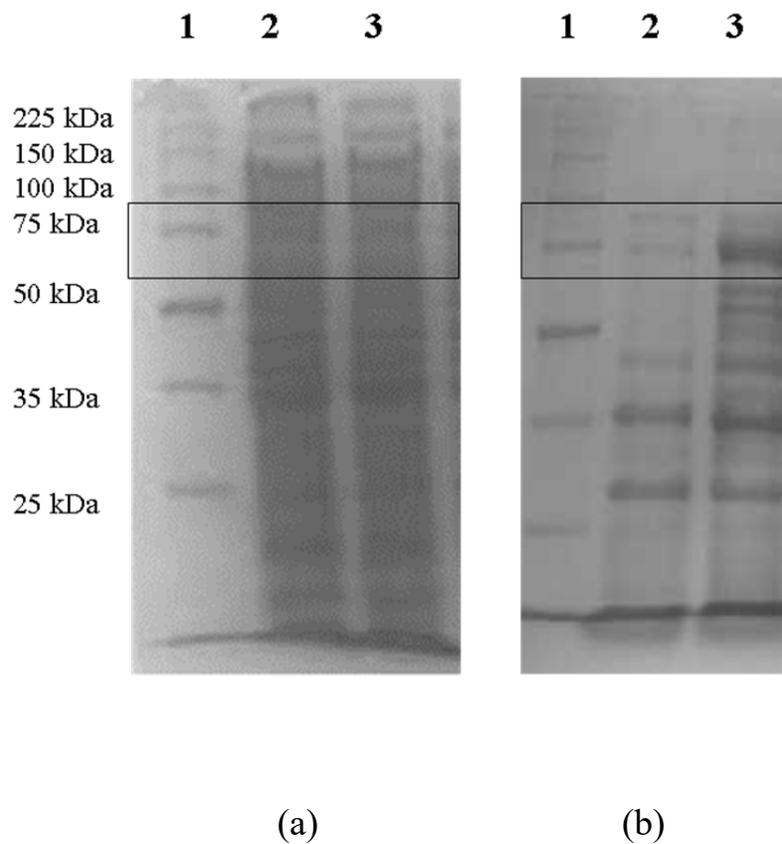


Figura 4. Expresión de $XynB2^{Y509E}$ en dos diferentes cepas de *E. coli*. (a): se presentan los sobrenadantes de la expresión de los plásmidos *pJAVI91* ($XynB2^{WT}$) y *pJAVI100* ($XynB2^{Y509E}$) en *E. coli* BL21 (DE3). (b): se presentan los sobrenadantes de la expresión de los plásmidos *pJAV91* ($XynB2^{WT}$) y *pJAVI100* ($XynB2^{Y509E}$), en *E. coli* C43 (DE3).

Se observan bandas más claras y de mayor grosor en el electroferograma de la expresión de XynB2^{Y509E} en la cepa C43 (DE3). Es decir, la C43 resultó ser la mejor cepa de expresión para XynB2^{Y509E}.

En la figura 5 se presentan los resultados de los cultivos de *E. coli* C43 (DE3) transformados con pJAVI100 y crecidos a distintas temperaturas y concentraciones de IPTG. Se pueden apreciar bandas más densas de proteína de 75 kDa en las condiciones de concentración 0,1 mM del inductor y crecimiento a 37 °C (carriles 5 y 8), por lo que se seleccionaron estas condiciones como las mejores para la expresión de XynB2^{Y509E}.

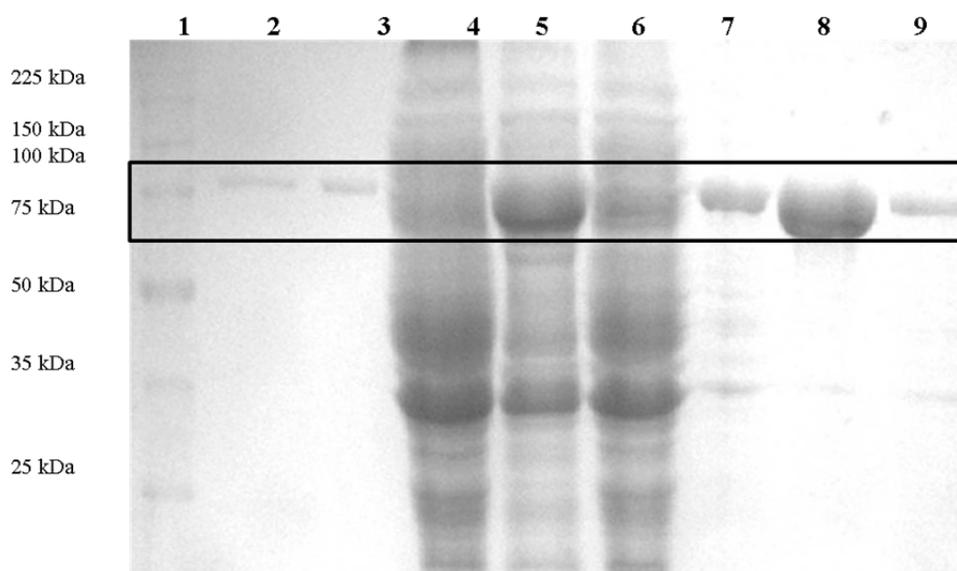


Figura 5. Expresión de XynB2^{Y509E} en *E. coli* C43 (DE3) con variaciones en temperatura y concentración de IPTG. Calle 1: Marcador de peso molecular. Calles 2 y 3: expresión de pJAVI 91 a 1mM IPTG 22 °C y 37 °C respectivamente. Calles 4 y 5: sobrenadantes de la expresión de pJAVI100 inducido con 0,1 mM IPTG a 22 °C y 37 °C respectivamente. Calle 6: sobrenadantes de la expresión de pJAVI100 con 0,5 mM IPTG a 22 °C. Calles 7 y 8: Fracción 2 de la purificación en IMAC-Co⁺² del sobrenadante de la expresión de pJAVI100 a 0,1 mM IPTG a 22 °C y 37 °C. Calle 9 pJAVI100 a 0,5 mM a 22 °C.

En la figura 6 se presenta el electroferograma del ensayo realizado para determinar el tiempo de inducción con IPTG a 0,1 mM. Se observa mayor expresión después de 18 h de inducción.

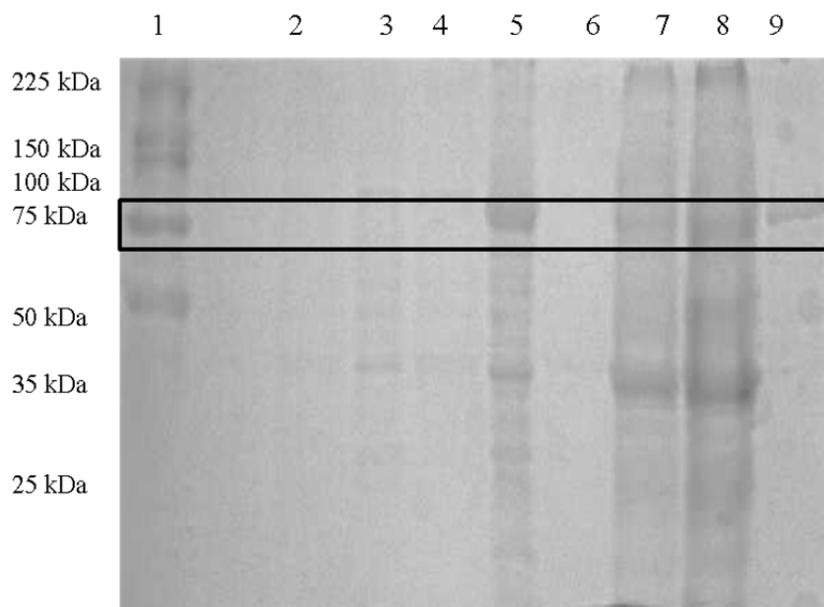


Figura 6. Expresión de XynB2^{Y509E} en E. coli C43 (DE3) con variaciones en tiempo de inducción, concentración 0,1 mM IPTG; Calle 1: marcador de masa molecular; Calle 2: tiempo cero de inducción; Calle 3: 2 h de inducción; Calle 4: 6 h de inducción; Calle 5: 18 h de inducción; Calle 6: medio LB libre de bacterias (control); Calle 7: Sobrenadante de la expresión; Calle 8: lisado no clarificado; Calle 9: proteína pura

Purificación

En la figura 7 se presenta electroferograma de fracciones de XynB2^{Y509E} purificadas por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC), específicamente utilizando una columna de cobalto (IMAC-Co²⁺). Se observan bandas puras de la proteína luego de un solo paso de purificación demostrando la eficiencia del procedimiento.

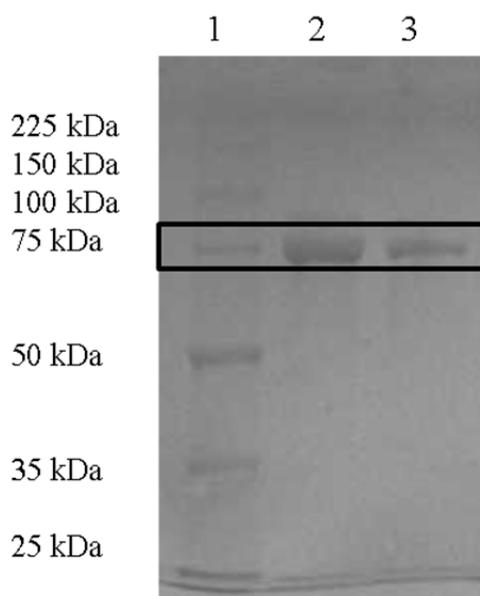


Figura 7. Fracciones de la purificación de XynB2^{Y509E}, elución con buffer imidazol. Calle 1: Marcador de masa molecular; Calles 2 y 3: Fracciones 2 y 3 de la elución post IMAC-Co⁺².

En la tabla 1 se observan los resultados del proceso de purificación de XynB2^{Y509E} expresada según las condiciones descritas. El uso de etiquetas de afinidad, como la cola de histidinas, permite la purificación a través de la elución desde columnas cromatográficas cargadas de resinas para la unión por afinidad con metales inmovilizados, lo que facilita la obtención de fracciones de alta pureza, necesarias para los ensayos de caracterización.

Tabla 1. Tabla de purificación de XynB2^{Y509E} expresada por *E. coli* C43 (DE3)

Paso	Vol (mL)	Proteína total ^c (mg/mL)	Actividad Total ^d (mM/min)	Actividad específica (mM/min.mg)	Factor de purificación (veces)	Rendimiento (%)
Lisado crudo^a	20	17,9	68,3	0,2	1	100
Lisado clarificado	15	4,8	58,2	0,8	4	85
IMAC-Co	5 ^b	2,7	53,5	4,0	20	79

- De 1,8 g de peso húmedo de células precipitadas a partir del crecimiento de 200 mL de cultivo bacteriano *E. coli*
- Mezcla de fracciones con actividad mayor a 0,5 u.a medidas a 280 nm
- Concentración de proteínas determinada a través del método de Bradford, utilizando BSA como proteína estándar
- Actividad enzimática medida como se describe en la sección de métodos

DISCUSIÓN

Un paso importante para alcanzar altas productividades de la proteína bajo estudio consiste en seleccionar la cepa de expresión adecuada. Para ello deben considerarse aspectos cinéticos, el genotipo y el fenotipo de las cepas. En general, se buscan cepas con baja tasa de mutación o de inserción de secuencias provenientes del plásmido. Las cepas derivadas de *E. coli* K-12 y B son las más empleadas. Los avances en el conocimiento de la fisiología de este microorganismo y en el desarrollo de herramientas moleculares han permitido la obtención de cepas diseñadas específicamente para la producción de proteína recombinante. En particular, la cepa BL21 es preferida en el ámbito industrial debido a que carece de las proteasas Lon y Omp-t lo que reduce considerablemente la degradación de la proteína recombinante dentro de la bacteria (Lara, 2011; Sorensen & Mortensen, 2005).

Muchas proteínas de interés comercial poseen estructuras terciarias y/o cuaternarias que requieren la formación de múltiples enlaces disulfuro u otras modificaciones

postraduccionales para alcanzar su conformación nativa o activa. Esto representa un problema en la expresión heteróloga debido a las diferencias en los mecanismos de plegamiento o el medioambiente celular, entre otros. Dichos inconvenientes pueden manejarse a través de varios mecanismos como disminuir la velocidad de producción, por ejemplo, reduciendo la concentración del inductor o disminuir la temperatura (Baneyx & Mujacic, 2004).

Los ensayos para las condiciones de expresión del plásmido pJAVI100 se diseñaron a partir de las condiciones reportadas para la proteína *silvestre* (Contreras *et al.*, 2008) y de lo publicado por Huang *et al.* (2014) para el mutante. Los resultados obtenidos a partir de las dos cepas estudiadas y de las distintas concentraciones de IPTG y variaciones de temperatura indican que las mejores condiciones para sobreexpresar XynB2^{Y509E} se consiguen en la cepa de *E. coli* C43 (DE3), al inducirse con 0,1 mM de IPTG durante 18h a 37 °C.

La expresión del plásmido pJAVI100 se hizo en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) y C43 (DE3) ya que ambas cepas contienen los elementos genéticos necesarios para su expresión como por ejemplo el profago λ DE3 que transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor lacUV5, inducible por IPTG (González & Fillat, 2018). El plásmido pJAVI100 proviene de una mutación puntual del gen *xynb2* contenido en el plásmido recombinante pJAVI91. El plásmido pJAVI91 deriva de pBSK (Contreras *et al.*, 2008) es decir la expresión recombinante de genes está bajo el control del promotor T7 que además será reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli* BL21 (DE3) y C43 (DE3). Los resultados del ensayo para la selección de la cepa de expresión indican que C43 (DE3) ofrece mayor capacidad de sobreexpresión de la proteína en comparación con BL21 (DE3). Dumon *et al.* (2004) estudiaron la capacidad de 3 cepas de *E. coli* para expresar distintas proteínas, entre ellas C43 (DE3), con resultados similares, y además evaluaron la estabilidad de los plásmidos en cada una de las cepas. Concluyeron que la cepa C43 (DE3) es más útil que su predecesora BL21 (DE3), para sobreexpresar proteínas que pueden resultar tóxicas para el hospedador.

En relación con la concentración del inductor IPTG, los primeros ensayos se realizaron partiendo de las condiciones establecidas para la expresión de XynB2 silvestre (pJAVI91), reportados por Contreras *et al.* (2008). Al no observarse expresión de la proteína mutante a 1 mM de IPTG se decidió ensayar con concentraciones menores, dada la posible toxicidad del compuesto. La concentración óptima de IPTG para lograr la sobreexpresión de XynB2^{Y509E} fue de 0,1 mM, lo que coincide con lo reportado por Huang *et al.* (2014), sin embargo, los resultados del ensayo sin el uso de inductor también son positivos, tal como lo refiere Bravman *et al.* (2001), aun cuando la cantidad de proteína producida es significativamente menor cuando se comparan los crecimientos de 18 h.

En lo que se refiere al tiempo de inducción se observa una banda muy leve en el tiempo de 6 h cuando se utiliza 0,1 mM de IPTG, Dada la dinámica de las actividades en el sitio de investigación, se considera que permitir el crecimiento y expresión hasta 18 h después de la inducción favorece la obtención de una buena cantidad de proteína soluble, sin la formación de cuerpos de inclusión u otros productos.

Finalmente, con respecto al proceso de purificación, es importante destacar la importancia de las etiquetas de afinidad. La proteína XynB2^{Y509E} recombinante expresada por *E. coli* C43 (DE3) es una proteína fusionada a una cola de 6 histidinas (poly-His), que se encuentra soluble en una muestra biológica compleja. Una de las aplicaciones más importantes de la cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC) es precisamente purificar proteínas recombinantes con colas de poly-His (Arora *et al.*, 2017). En esta tesis doctoral la matriz empleada en la IMAC fue la resina Talón que se encuentra cargada con Co⁺², y la elución de la proteína adsorbida a la resina se hizo con imidazol como agente competitivo. La figura 7 muestra que las fracciones eluidas de la IMAC solo presentan una banda que se ubica en el tamaño esperado para la proteína en estudio. Este resultado sugiere que XynB2^{Y509E} se purifica en un solo paso y también avala la robustez de la IMAC como técnica cromatográfica.

La resina de cobalto es una resina quelante tetradentada cargada de cobalto divalente para permitir la purificación específica, rápida y suave de proteínas recombinantes etiquetadas con histidina. Se considera que la resina de cobalto tiene la ventaja de utilizar menor

cantidad de imidazol en comparación con las de níquel, que han sido utilizadas en procedimientos similares (Salehzadieh *et al.*, 2012). Otra ventaja del uso de la etiqueta de histidina es la posibilidad de purificar sin utilizar calentamiento, método utilizado de manera tradicional para la purificación de enzimas de termófilos (Bravman *et al.*, 2001) lo que pudiera devenir en pérdida de la proteína o su actividad durante el proceso.

REFERENCIAS

1. Arora, S., Saxena, V., Ayyar, B. V. (2017). Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods*, 116, 84-94.
2. Baneyx, F., Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*, 22(11), 1399-1408.
3. Ben-David, A., Bravman, T., Balazs, Y. S., Czjzek, M., Schomburg, D., Shoham, G., Shoham, Y. (2007). Glycosynthase activity of *Geobacillus stearothermophilus* GH52 b-xylosidase: efficient synthesis of xylooligosaccharides from alpha-D-xylopyranosyl fluoride through a conjugated reaction. *Chembiochem*, 8(17), 2145-2151.
4. Bravman, T., Zolotnitsky, G., Belakhov, V., Shoham, G., Henrissat, B., Baasov, T., Shoham, Y. (2003). Detailed kinetic analysis of a family 52 glycoside hydrolase: A a-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Biochemistry*, 42, 10528-10536
5. Bravman, T., Zolotnitsky, G., Shulami, S., Belakhov, V., Solomon, D., Baasov, T., ... & Shoham, Y. (2001). Stereochemistry of family 52 glycosyl hydrolases: a β -xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6 is a retaining enzyme. *FEBS letters*, 495(1-2), 39-43.
6. Collins, T., Gerday, C., Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 29(1), 3-23.
7. Contreras, L. M., Gómez, J., Prieto, J., Clemente-Jiménez, J. M., Las Heras-Vázquez, F. J., Rodríguez-Vico, F., ... & Neira, J. L. (2008). The family 52 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* is a dimer: Structural and biophysical characterization of a glycoside hydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(12), 1924-1934.
8. Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., Vuillard, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21 (DE3), C41 (DE3), and C43 (DE3). *Protein expression and purification*, 37(1), 203-206.
9. González, A., Fillat, M. F. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de educación Bioquímica*, 37(1), 14-27.
10. Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A. A., Jiménez-Gutiérrez, L. R., Sotelo-Mundo, R. R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Biocencia*, 15(3), 8-17.
11. Huang, Z., Liu, X., Zhang, S., Liu, Z. (2014). GH52 xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*: characterization and introduction of xylanase activity by site-directed mutagenesis of Tyr509. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(1), 65-74.
12. Knob, A., Terrasan, C. F., Carmona, E. C. (2010). β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 389-407.

13. Kurz, L., García, V., Wilkesman, J., Contreras, L. M. (2014). Enzymatic characterization of the recombinant β -xylosidase XynB2. *Journal of Medical and Biological Sciences*, 1, 14-19.
14. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
15. Lara, A. R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 209-223.
16. Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(5), 577-591.
17. Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., ... & Tschaplinski, T. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311(5760), 484-489.
18. Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172.
19. Salehzadeh, A., Ofoghi, H., Arasteh, A. (2012). Purification of recombinant C-terminus polyhistidine tagged human calcitonin with cobalt-based and nickel-based affinity chromatography: A comparative study. *African Journal of Biotechnology*, 11(36), 8893-8897.
20. Selvarajan, E., Veena, R. (2017). Recent advances and future perspectives of thermostable xylanase. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 14(1), 421-438.
21. Sørensen, H. P., Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 115(2), 113-128.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ESTRUCTURAL DEL MUTANTE XYNB2^{Y509E} DE *G. STEAROTHERMOPHILUS* POR ANÁLISIS DE SU ESTRUCTURA POR FLUORESCENCIA Y DICROÍSMO CIRCULAR Y DE SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DUAL: TEMPERATURA Y PH DE MÁXIMA ACTIVIDAD, ESTABILIDAD TÉRMICA, CINÉTICA DE INACTIVACIÓN TÉRMICA, K_M Y V_{MAX} .

RESUMEN

XynB2^{Y509E} recombinante, expresada en *E.coli* C43(DE3), fue sometida a ensayos para su caracterización bioquímica y estructural. XynB2^{Y509E} mostró una mayor actividad catalítica de β -xilosidasa a pH 6,5, con un rango de actividad entre 5,5 y 7,5, sin cambios significativos en comparación con la enzima *silvestre*. En referencia a la actividad de xilanasas se observa un comportamiento similar a lo encontrado para la actividad de β -xilosidasa, observándose mayor actividad en valores de pH entre 6 y 7,5, siendo máximo a pH 6,5. En referencia a la estructura, este mutante comparte las mismas características reportadas para la forma XynB2WT, estructura secundaria con un 50% de estructura helicoidal y de hoja β , así como conformación tridimensional estable entre pH 6 y 8. Los valores de pKa, Tm y [GdnCl]_{1/2} estimados en los cambios conformacionales por pH, temperatura y agente caotrópico sugieren que el mutante XynB2^{Y509E} es menos estable que XynB2WT desde el punto de vista químico y térmico, sin embargo el mutante sigue siendo muy termoestable, lo cual unido a su actividad enzimática dual lo hace un candidato atractivo para valorar su inmovilización en diferentes soportes de cara a su futura aplicación industrial

INTRODUCCIÓN

El procesamiento biológico de biomasa y su aprovechamiento es una de las propuestas principales que los países desarrollados han adoptado como compromiso para revertir el efecto negativo sobre el medio ambiente, producido por el uso de combustibles fósiles, además de promover el uso de fuentes de energía limpia y renovable (De Canio *et al.*, 2011).

La lignocelulosa, principal y más abundante componente de la biomasa, está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina en diferentes proporciones dependiendo del tipo de material, de la especie y de la edad del cultivo de la planta (Álvarez, Reyes-Sosa, Díaz *et al.*, 2016; Ragauskas *et al.*, 2006). Debido a su abundancia representa una fuente sostenible

para la obtención de productos de alto valor agregado dentro de la industria química y de combustibles, proceso que pasa por la hidrólisis de sus componentes y que tradicionalmente se lleva a cabo a través de medios físicos y químicos que resultan contaminantes, por lo que el estudio de biocatalizadores específicos para esos sustratos cobra importancia en pro de favorecer mecanismos amigables con el ambiente.

El xilano es el polisacárido hemicelulósico más abundante en paredes celulares de plantas, representando hasta un tercio de su peso seco. La degradación eficiente del xilano se alcanza por la acción concertada y sinérgica de varias enzimas. La hidrólisis del xilano a xilo-oligosacáridos y finalmente a xilosa es mediada por enzimas β -D-xilanasas (EC 3.2.1.8) y 1,4- β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37); estas últimas se han clasificado en 11 tipos o familias según su secuencia primaria (CAZy database: <http://www.cazy.org/>) (Rohman *et al.*, 2019). Las 1,4- β -D-xilosidasas son glicosilhidrolasas (GH) que remueven residuos de xilosa de los extremos no reductores de los xilooligosacáridos cortos y xilobiosa, produciendo xilosa. Se han aislado enzimas GH de fuentes bacterianas y fúngicas (Malga *et al.*, 2019; dos Santos *et al.*, 2018; Sharma & Sharma, 2017), cobrando especial importancia las obtenidas a partir de organismos extremófilos, debido a las condiciones de pH y temperatura que son capaces de soportar (Soni *et al.*, 2017).

G. stearothermophilus posee una β -xilosidasa perteneciente a la familia GH52, la cual ha sido caracterizada en condiciones óptimas (Contreras *et al.*, 2008; Bravman *et al.*, 2001; 2003), de máxima actividad (Kurz *et al.*, 2014) y sobreexpresada exitosamente por tecnología recombinante.

XynB2 es una β -xilosidasa intracelular multidominio cuyas propiedades funcionales, estructurales y conformacionales fueron descritas por Contreras *et al.* (2008), investigación en la que se demostró que se trataba de una enzima dimérica utilizando ultracentrifugación analítica y cromatografía de filtración en gel, también se observó que el sitio activo era compartido entre ambos protómeros y en él participaban residuos aromáticos. Luego de ensayos de Dicroísmo circular (CD) y FTIR se logró definir que XynB2WT está compuesta principalmente por estructuras secundarias α -hélice (30%) y β -hoja (30%). Asimismo, Contreras *et al.*, (2008), reportaron la caracterización cinética de XynB2 con respecto a su

estabilidad térmica, describiéndola como cinéticamente termoestable, con una temperatura óptima de actividad de 70°C.

Por otro lado, XynB2 ha sido sometida a mutagénesis sitio-dirigida en las que el resultado ha sido una enzima con actividad de transglicosidasa (Ben David *et al.*, 2007) y xilanasa (Huang *et al.*, 2014), características que la hacen un candidato de gran interés para fines industriales (Seokho *et al.*, 2018), dado el alto valor agregado de los productos de la degradación del xilano (Michelin & Texeira, 2018). Entre los diferentes procesos industriales donde actúan las β -xilosidasas se pueden mencionar la descomposición de materia prima para producción de biocombustibles de segunda generación (Prajapajti *et al.*, 2019; Goldbeck *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2011); como coadyuvante en el blanqueamiento de pulpa de papel (Kmetzki *et al.*, 2020), alimentos y bebidas, alimentos para animales e industria farmacéutica, entre otros.

En este capítulo de la investigación se presenta la caracterización del mutante de XynB2^{Y509E}, por análisis de su actividad enzimática dual (β -xilosidasa y xilanasa): temperatura y pH de máxima actividad, estabilidad térmica y química, cinética de inactivación térmica, K_M y V_{max} para diferentes sustratos, además de los ensayos realizados para la caracterización estructural y funcional utilizando fluorescencia y dicroísmo circular a fin de elucidar los posibles cambios en la estructura causados por la mutación.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Los sustratos p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (p-NPG), p-nitrofenil- β -D-xilopiranosido (p-NPX), p-nitrofenil-L-arabinofuranosido (p-NPAf) y xilano de abedul, así como otros reactivos fueron de la casa comercial Sigma (St. Louis, USA). La acrilamida, el azul de bromofenol y azul brillante de comassie R-250 utilizados fueron de la marca de Fisher. Bis-acrilamida, dodecil sulfato de sodio (SDS), glicerol, isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), marcador de masa molecular V849, tris-base fueron de la marca Promega. Todos los reactivos utilizados fueron de alta pureza.

Mutagénesis de XynB2^{Y509E}

La mutagénesis sitiodirigida del gen *xynB2* fue desarrollada usando un kit de QuikChange II (Stratagene, La Jolla, CA, USA), siguiendo las instrucciones del protocolo establecidas

por el fabricante y usando el plásmido pJAVI91 como molde (Contreras *et al.*, 2008). El cebador para la mutación Y509E respondía a la siguiente secuencia

5'-GCGCGCAACAATTTAGAGTTGACAGGAAAAT-3'

5'-ATTTTCCTGTCAACTCTAAATTGTTGCGCGC-3'

La mutación fue verificada utilizando el método de secuenciación de nucleótidos marcados en un secuenciador ABI 377 DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El plásmido con la mutación se nombró pJAVI100.

Sobreexpresión y purificación

Células competentes de *E. coli* C43 (DE3) fueron transformadas con pJAVI100, contenido de la mutación Y509E de XynB2 y crecidas en medio LB (Sambrook *et al.*, 2001), incubadas a 37°C en agitador orbital a 200 rpm, hasta alcanzar una D.O de 0,4, momento en el que se agregó el inductor (IPTG; Isopropil B-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0,1 mM, permitiendo el crecimiento por 18 h a 37 °C. Las células se recuperaron por centrifugación a 5000 rpm por 10 min.

El paquete celular se resuspendió en 20 mL de tampón de lisis (tampón fosfato 50mM; NaCl 300mM; NaN₃ 0,02%; 2-mercaptoetanol 1mM; PMSF 1mM) cuidando no hacer burbujas y se sometió a 10 ciclos de sonicación por 45 seg c/u, en frío, para provocar la lisis. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 30 min, separando el sobrenadante del paquete celular y se preservó el sobrenadante en hielo hasta el momento de su purificación en una columna conteniendo resina de agarosa con cobalto como catión (TALON Metal Affinity Resins, Clontech), para una cromatografía de afinidad con metales inmovilizados.

Electroforesis

La pureza de la proteína se verificó con electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, bajo condiciones desnaturalizantes de acuerdo con el protocolo descrito por Laemmli (1970) en cámara de corrida (Mini-Protean III Bio-Rad Laboratories ®).

Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método de Bradford (Walker, 2002) para la cuantificación de proteínas, así como la medición de absorbancia de las fracciones puras a 280 nm. En este último caso, se utilizó el coeficiente de extinción molar de la proteína ($133.850 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) para calcular la concentración de XynB2^{Y509E} presente en cada fracción.

Actividad de β -xilosidasa

La actividad de β -xilosidasa y otras posibles actividades fueron determinadas por la medición del p-nitrofenol (pNP) liberado de los sustratos p-nitrofenil β -D-xilopiranosido (p-NPX), p-nitrofenil α -D-xilopiranosido (p-NP α X), p-nitrofenil β -D-glucopiranosido (p-NPG) y p-nitrofenil α -L-arabinofuranósido (p-NPAF) (Sigma). La reacción se inició con la adición de 5 μ l de la enzima y 45 μ l de tampón CFG (0,1 M, pH 6,5) a 50 μ l de cada sustrato 10mM en tampón citrato-fosfato-glicina 100 mM a 50 °C. Luego de 5 minutos la reacción fue detenida y el color desarrollado por la adición de 300 μ l de Na₂CO₃ 1M. La intensidad del color se leyó a 410nm en un espectrofotómetro SP-830 plus (Metertech). Se preparó una curva estándar usando p-nitrofenol; una unidad de enzima fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto, en las condiciones descritas y la actividad específica fue definida como unidades por mL de proteína. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford usando albúmina bovina como estándar. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Actividad de xilanasa

La actividad de xilanasa se comprobó con la medición de los azúcares reductores, empleando ácido 3,5-dinitrosalicílico de acuerdo con el método de Miller (1959) para su cuantificación, utilizando como sustrato una solución de xilano de abedul. La mezcla de la reacción consistió en 50 μ l de enzima (0,008 μ mol) y 50 μ l de xilano de abedul a distintas concentraciones en tampón citrato-fosfato-glicina 0,1M a pH 6,5 y se incubó durante 30 minutos a 50 °C. La reacción se detuvo por la adición de 0,1 mL de DNS y la mezcla se llevó a ebullición durante 15 minutos. La reacción se diluyó en 0,4 mL de agua y se midió la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro SP-830 plus (Metertech). Una unidad de actividad xilanasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcares reductores del xilano por minuto.

Efecto del pH sobre la actividad

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima fue determinado utilizando los sustratos p-NPX (2,2mM) y xilano (1%) de abedul preparados en tampón CFG en un rango de valores de pH entre 4,3 y 11, respectivamente. Para determinar la estabilidad a pH los ensayos fueron desarrollados a cada valor de pH (4-11), incubando la enzima con tampón CFG

preparado en el rango indicado, hasta 1 h, a 25 °C, luego se hicieron los ensayos según las condiciones estándar ya descritas.

Efecto de la temperatura

Para determinar la temperatura óptima de la enzima mutada, se midió la actividad a diferentes temperaturas dentro del rango 40 y 80 °C, con intervalos de 10 °C, sobre p-NPX 2,2 mM a pH 6,5. La estabilidad térmica de la enzima purificada se investigó preincubando por 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 min, en tampón CFG, (pH 6,5), en ausencia de sustrato a diferentes temperaturas (40-95 °C). El porcentaje de actividad residual se midió utilizando el ensayo estándar descrito previamente, después de enfriar la alícuota de enzima durante 5 minutos en baño de hielo, para cada valor de temperatura.

Determinación de parámetros cinéticos

Se estimaron por la medición de las velocidades iniciales utilizando diferentes concentraciones de sustrato p-NPX en el rango de 0,22 y 2,2 mM en tampón CFG (0,1 M a pH 6,5) a 50 °C por 5 min. Los valores de K_M y V_{max} fueron calculados a partir del ajuste hiperbólico entre las concentraciones de sustrato y las velocidades iniciales utilizando el programa Origin 8.0.

Los parámetros cinéticos de la actividad xilanasas se estimaron por la medición de las velocidades iniciales utilizando 0,006 μ moles de enzima purificada que reaccionaron con diferentes concentraciones del sustrato xilano de abedul, preparado en tampón CFG (0,1 M a pH 6,5) a 50 °C por 30 min. Los valores de K_M y V_{max} fueron calculados a partir del método de los dobles recíprocos, entre los inversos de las concentraciones de sustrato y de las velocidades iniciales.

Fluorescencia

Para las mediciones de fluorescencia se utilizó el fluorímetro Jasco FP-6500 fluorómetro (Japón) equipado con una lámpara de xenón de 450 W para excitación y un controlador de temperatura ETC-273. Se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm. La concentración de XynB2^{Y509E} fue de 2 μ M (en unidades del protómero) y la concentración final del tampón utilizado fue 100 mM.

Medidas de fluorescencia en el estado estacionario

Medidas de la fluorescencia intrínseca de XynB2^{Y509E}

Las muestras de XynB2^{Y509E} fueron excitadas a 280 y 295 nm a fin de excitar de manera diferencial triptófano y tirosina. La apertura fue igual a 3 nm para la excitación y de 5 nm para la emisión. Los experimentos de fluorescencia fueron leídos entre 300 y 400 nm. La señal fue registrada por segundo y el incremento de la longitud fue de 1 nm. Todas las lecturas fueron corregidas con blanco. Las desnaturalizaciones químicas, seguidas de fluorescencia o de CD, se llevaron a cabo a pH 6,5. Las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C, y 1 h más a 25 °C. En los experimentos de desplegamiento inducido por el pH, el valor de pH se midió con un electrodo fino en el pH metro GLP21 (Crison, España), tras finalizar los experimentos.

Medidas con la sonda ANS

La longitud de onda de excitación fue de 380 nm, y la emisión se midió de 400 a 600 nm. Las anchuras de las rendijas fueron de 1 nm para la excitación y de 10 nm para la emisión. La solución madre de ANS se preparó en agua y se diluyó para obtener una concentración final de 100 µM en el ensayo. En todos los casos, las soluciones blanco se restaron de los espectros correspondientes.

Efecto de la temperatura

La desnaturalización térmica medida por fluorescencia fue seguida por el cambio en la emisión a 340 después de la excitación a 280 nm. Los parámetros instrumentales y la concentración de proteína fueron los mismos que en las mediciones en estado estacionario. El calentamiento provocó la precipitación en todos los casos.

Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se recogieron en el espectropolarímetro CD J-815 150-S (Japón) equipado con un compartimiento de celda termostatazado con una unidad Peltier. El instrumento se calibró periódicamente con ácido (+) 10-camforsulfónico.

Espectros en estado estacionario

Los espectros isotérmicos de longitud de onda a diferentes valores de pH se adquirieron a una velocidad de barrido de 50 nm/min con un tiempo de respuesta de 4 s y se promediaron durante cuatro escaneos a 25 °C. Las mediciones de UV lejano se llevaron a cabo con una concentración de 2 µM de proteína y 100 mM del correspondiente tampón, en una celda de 0,1 cm de paso óptico. Cada experimento de desnaturalización por pH se repitió tres veces

con nuevas muestras.

En los experimentos de desnaturalización química, los espectros de CD en UV lejano se desarrollaron a 25 °C con una velocidad de exploración de 50 nm/min; se registraron y promediaron cuatro exploraciones, con un tiempo de respuesta de 4 s. El paso óptico de la celda fue de 0,1 cm, con una concentración de proteína de 2 µM. Los espectros se corrigieron restando la línea de base adecuada en todos los casos. Cada experimento de desnaturalización química se repitió al menos tres veces con nuevas muestras.

La actividad óptica bruta observada se expresó como elipticidad molar del residuo (θ) (grados. cm² dmol⁻¹) y la predicción de la estructura secundaria se hizo utilizando el programa CDNN *deconvolution* (disponible en <http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/>) (Böhm *et al.*,1992).

Desnaturalización térmica

La desnaturalización térmica se desarrolló calentando a 60 °C/h y un tiempo de respuesta de 8 s. Lo escaneos térmicos fueron registrados en el UV lejano (222 nm, en una celda con distancia óptica de 0,1 cm y una concentración total de proteína de 2 µM). Las condiciones fueron las mismas que las reportadas para los experimentos en estado estacionario. El calentamiento provocó la precipitación en todos los casos.

Análisis de las curvas de desnaturalización química por pH

Los experimentos de desnaturalización de pH fueron analizados asumiendo que ambas especies, protonadas y desprotonadas, contribuyen al espectro de fluorescencia

Ecuación 1

$$X = \frac{(Xa + Xb10^{n(pH-pKa)})}{(1 + 10^{n(pH-pKa)})}$$

Donde X es la propiedad física observada (elipticidad, intensidad de fluorescencia o $\langle \lambda \rangle$), Xa es la especie ácida, Xb es el valor de pH más alto, pKa es el pK aparente del grupo titulante y n es el coeficiente de Hill. El pKa aparente se obtuvo de tres mediciones diferentes, preparadas con muestras nuevas. El análisis del ajuste no lineal de los mínimos cuadrados (Ec. 1), se hizo usando la función de ajuste del programa Kaleidagraph (Abelbeck software).

Las curvas de desnaturalización con cloruro de guanidinio (GdnCl) fueron analizadas

utilizando un mecanismo de desplegamiento de 3 estados (pH 6,5), de acuerdo con el modelo de extrapolación lineal usado para otras proteínas oligoméricas (Contreras *et al.*, 2008).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

El estudio de enzimas glicosil-hidrolasas provenientes de microorganismos termófilos cobra especial relevancia para la investigación básica y aplicada, a la luz de su potencial uso en procesos industriales en los que las condiciones de pH y temperatura son en algunos casos extremas. Por otro lado, la posibilidad de mejorar la funcionalidad de estos biocatalizadores a través de mutagénesis sitio-dirigida, promoviendo la adición de funciones a las que posee la enzima nativa, abre las puertas a mejoras en los procesos de degradación de xilano, principal componente de la hemicelulosa.

La figura 8 refleja el resultado del proceso de expresión y purificación de XynB2^{Y509E}. Se presentan electroferogramas SDS-PAGE, de fracciones de XynB2^{Y509E} purificadas por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC), específicamente utilizando una columna de cobalto (IMAC-Co). Se pueden apreciar bandas densas de proteína a 75 kDa, masa molecular que se corresponde con la esperada para la proteína, sugiriendo que el experimento de expresión ha sido exitoso.

XynB2^{Y509E} fue exitosamente expresada en *E coli* C43 (DE3) y efectivamente purificada por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados en una resina de cobalto (IMAC-Co), tal como se observa en la figura 8, y como fuera reportado anteriormente para el tipo silvestre (Contreras *et al.*, 2008) y en el capítulo I de esta tesis cuando se definieron las condiciones de expresión y posterior purificación. En relación con esto último es importante resaltar la etiqueta de afinidad codificada en la secuencia del plásmido transformante, un péptido pequeño conformado por una cola de 6 histidinas (poly-His), que facilita el proceso de purificación con el uso de IMAC, de la que eluyen fracciones que presentan una sola banda correspondiente a la proteína en estudio, sin rastros de otras proteínas, por lo que es posible considerar un solo paso de purificación; sin embargo

investigadores han sugerido que las etiquetas de afinidad pueden alterar el comportamiento de la proteína de interés (Booth *et al.*, 2018).

Las calles 2 y 3 de la figura muestran la proteína sobreexpresada con un peso molecular aparente de 75 kDa, correspondiente a los valores reportados previamente (Contreras *et al.*, 2008). XynB2 es una proteína de 150 kDa, conformada por dos monómeros de 75 kDa, que son separados en las condiciones desnaturalizantes de la electroforesis. Dada la poca cantidad de bandas contaminantes presentes en esta etapa de purificación (calle 7), es posible considerar que la enzima se encuentra en un estado ideal de pureza para la naturaleza de los ensayos cinéticos y estructurales a desarrollar.

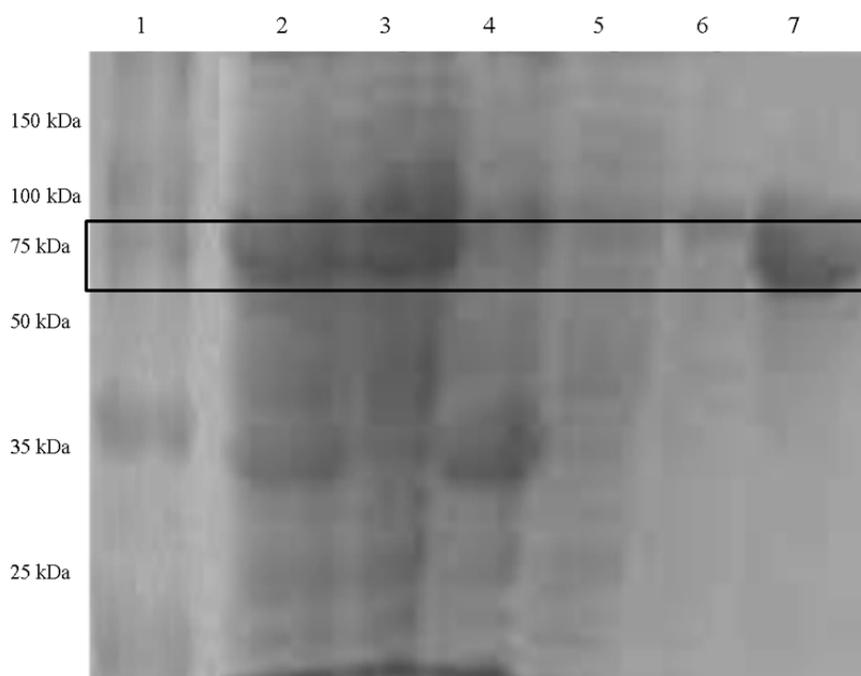


Figura 8. Purificación de XynB2^{Y509E} por Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC-Co). Calle. 1. Marcador de masa molecular; Calle 2. Lisado no clarificado; Calle 3. Lisado clarificado; Calle 4. Paquete celular resuspendido; Calle 5. Sobrenadante no unido; Calle 6. Sobrenadante unido inespecíficamente; Calle 7. Fracción I IMAC-Co.

Actividad de XynB2^{Y509E} con diferentes sustratos

La tabla 2 presenta los valores de actividad de β -xilosidasa de XynB2^{Y509E} con diferentes sustratos piranosidos, además de la actividad de xilanasa con xilano de abedul.

Tabla 2. Actividad de β -xilosidasa y de xilanasa de XynB2^{Y509E} para diferentes sustratos

Sustrato	Actividad (UI/mg)*
4-nitrofenil- β -D-xilopiranosido	0,83
2-nitrofenil- β -D-xilopiranosido	0,33
4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido	0,065
2-nitrofenil - β -D-galactopiranosido	0,003
4-nitrofenil α -L-arabinofuranósido	0,031
2- nitrofenil - α -D-glucopiranosido	Sin actividad
Xilano de abedul	0,009

*La actividad para cada uno de los sustratos se expresa en Unidades Internacionales/mg. Una unidad internacional se define como 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto.

Ensayos realizados en las condiciones descritas, 50 °C, tampón CFG (0,1M) pH 6,5.

Muchas xilosidasas, incluyendo miembros de otras familias, entre ellas las de las familias 3, 43 y 54, poseen actividad tipo arabinofuranosidasa, que puede explicarse probablemente por la similitud entre los grupos hidroxilo y la orientación espacial de los enlaces glicosídicos en las estructuras, de allí que se observe actividad arabinofuranosidasa, aunque en menor proporción que la del sustrato preferente (Bravman *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en este ensayo son similares a los presentados por Bravman *et al.* (2003) para la XynB2 silvestre, exceptuando la actividad de xilanasa desarrollada luego de la mutación (Huang, 2014). Estos resultados sugieren que el sustrato preferencial para el mutante XynB2^{Y509E}, es al igual que la silvestre, el p-NPX. Por ello, la caracterización bioquímica del mutante tanto libre como en las posteriores inmovilizaciones, en las que se persiguió preservar la actividad dual desarrollada por el mutante Y509E, se hizo sobre p-NPX.

Efecto de pH y temperatura sobre la actividad enzimática de XynB2^{Y509E}

En las figuras 9 y 10 se muestran los resultados de los ensayos para la caracterización del efecto de pH y temperatura sobre las actividades β -xilosidasa y xilanasa de XynB2^{Y509E} y su comparación con el funcionamiento de la enzima XynB2 silvestre. Para caracterizar la actividad de β -xilosidasa de XynB2^{Y509E} se utilizó el sustrato p-NPX ya que es el sustrato

preferencial de la forma XynB2 silvestre (Contreras *et al.*, 2008; Bravman *et al.*, 2003; Bravman *et al.*, 2001). La evaluación de la actividad de xilanasa de XynB2^{Y509E} se hizo sobre el xilano de madera de abedul, aunque Huang *et al.* (2014) han documentado solo actividad sobre xilano de madera de haya. A ese respecto es oportuno indicar que los xilanos proveniente de haya o abedul contienen principalmente 4-O-metil glucuronoxilano, que está compuesto por residuos de β -1-4-D-xilosa en la cadena principal y sustituido con ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico en la posición O2 por un enlace α -1-2 (Sharma *et al.*, 2020).

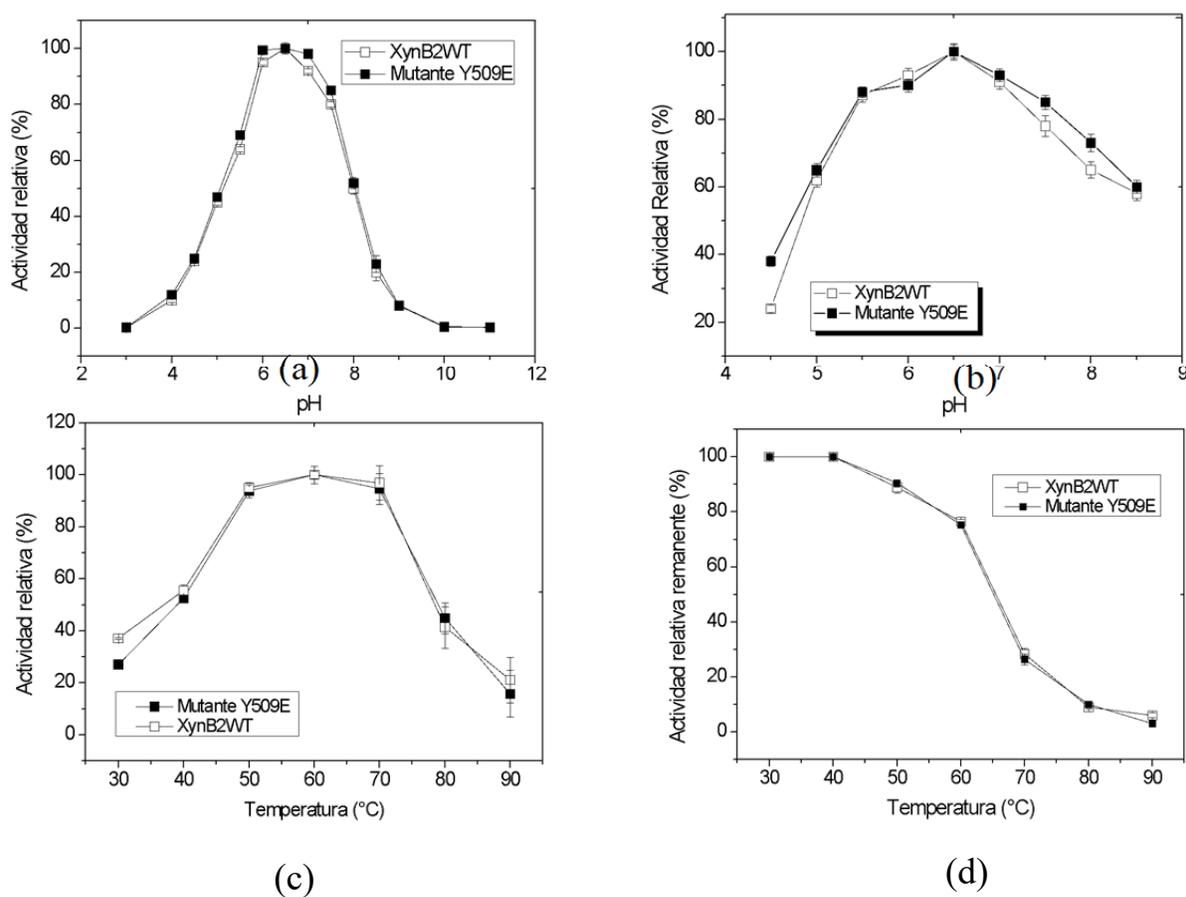


Figura 9. Caracterización de la actividad β -xilosidasa de XynB2^{Y509E} purificada: (a). **Efecto del pH en la actividad:** Se preparó sustrato p-NPX al 2,2 mM en tampón citrato-fosfato-glicina 0,1M ajustado al pH indicado y se desarrolló la reacción por 5 minutos a 50 °C; (b). **Efecto del pH en la estabilidad:** Luego de un período de incubación de 1 h a temperatura ambiente en tampón citrato-fosfato -glicina 0,1M al pH indicado, se midió la

actividad β -xilosidasa con *p*-NPX 2,2 mM a pH 6,5 por 5 minutos a 50 °C. (c). Efecto de la temperatura en la actividad: se midió la actividad a diferentes temperaturas dentro del rango 40 y 80 °C, con intervalos de 10 °C, sobre *p*NPX 2,2 mM a pH 6,5. Se consideró como 100% el valor de mayor actividad. (d). Efecto de la temperatura en la estabilidad medida por la actividad relativa remanente luego de 1 h de calentamiento a diferentes temperaturas. La actividad más alta en cada ensayo fue considerada el 100%.

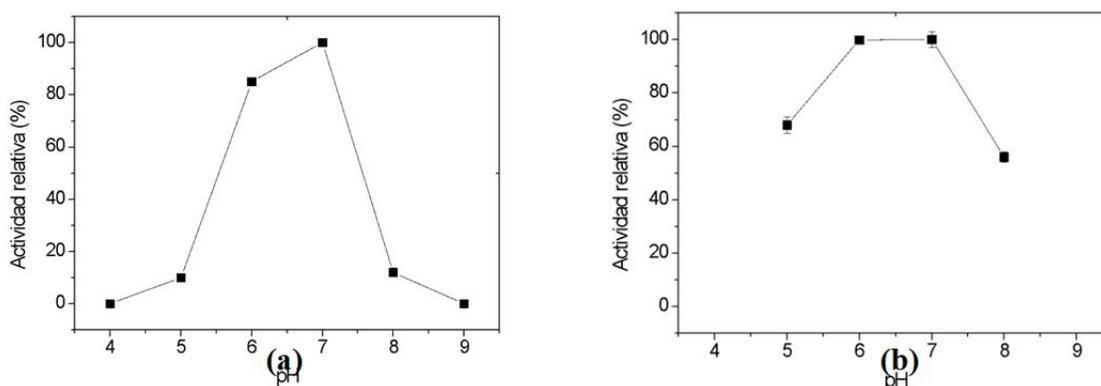


Figura 10. Caracterización de la actividad xilanasica de *XynB2*^{Y509E} purificada. (a). Efecto del pH sobre la actividad de xilanasica de *XynB2*^{Y509E}: se preparó sustrato xilano de abedul (1%) en tampón citrato-fosfato-glicina 0,1M, ajustado al pH indicado y se desarrolló la reacción durante 15 minutos a 50°C, según el método descrito. (b). Efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad xilanasica de *XynB2*^{Y509E}. El valor de actividad más alto fue considerado 100%

Efecto del pH

XynB2^{Y509E} mostró una mayor actividad catalítica de β -xilosidasa a pH 6,5, con un rango de actividad entre 5,5 y 7,5, sin cambios significativos en comparación con la enzima silvestre. El comportamiento del mutante de *XynB2* en forma de campana, reflejado en la figura 9a, se ha observado en otras glicosil hidrolasas (Ye *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2013) cuando se evalúa la actividad de la enzima en función del pH, lo que está relacionado con los grupos ionizables del sitio activo. Es importante resaltar la importancia de la selección de tampones que no produzcan interferencias con los parámetros medidos. Se ha reportado,

que el tampón Tris produce una inhibición competitiva con GH, lo cual podría originar malinterpretaciones en los resultados de caracterizaciones bioquímicas y cinéticas en estas enzimas (Jordan *et al.*, 2013).

A partir de estos ensayos se determinó el intervalo de pH para la actividad óptima con diferentes sustratos lo que permitió establecer las condiciones de pH para ensayos posteriores, seleccionándose el pH de 6,5 como común a todos los ensayos siguientes.

El intervalo de pH en el que se observa mayor actividad enzimática es limitado, con caídas significativas de actividad con apenas 0,50 unidades de pH de diferencia. Bravman *et al.* (2003) reportaron que, a valores de pH inferiores a 4 la enzima es inactiva y esto coincide con lo observado en la figura 9a donde se aprecia la ausencia de actividad por debajo de pH 4. Otras XynB2 provenientes de distintos organismos termófilos, muestran actividad en valores relativamente cercanos pero menores a los obtenidos en este trabajo (Shao *et al.*, 2011; Xue & Shao, 2004), incluso en estudios realizados con la enzima recombinante proveniente de la misma bacteria, el *Geobacillus stearothermophilus*, se reportan valores inferiores a 6,5 (Huang *et al.*, 2014), sin embargo aún bastante cercanos lo cual sugiere que el proceso de purificación empleado no altera significativamente la estabilidad química de la enzima, lo cual en ocasiones sucede al interferir la His-Tag con el sitio activo de la enzima (Booth *et al.*, 2018).

En cuanto a la estabilidad a variaciones de pH, XynB2^{Y509E} al igual que la enzima silvestre, se muestra estable en un amplio rango de valores reteniendo más del 60% de su actividad luego de 1 h de incubación a 25°, en tampón CFG con valores entre 5,5 y 8,5 (Figura 9b). Este comportamiento estable ha sido reportado para otras β -xilosidasas del género *Geobacillus* como la de *G. thermodenitrificans* (Anand *et al.*, 2013) y la de *G. stearothermophilus* (Huang *et al.*, 2014), y de manera general para β -xilosidasas, en la búsqueda de mejorar el desempeño de la enzima a través de la ingeniería de proteínas (Hong *et al.*, 2018).

En referencia a la actividad de xilanasa se observa un comportamiento similar a lo encontrado para la actividad de β -xilosidasa, observándose mayor actividad en valores de pH entre 6 y 7,5, siendo máximo a pH 6,5 (Figura 10a). La estabilidad por pH de la

actividad de xilanasa de XynB2^{Y509E} también se ensayó. Se encontró que mantiene el 100 % de su actividad luego de una h de incubación a pH 6-7 y que se preserva hasta un 60% a pH 5 (figura 10b). Este comportamiento apoya la hipótesis planteada por Huang *et al.* (2014) donde la mutación Y509E ampliaría el bolsillo catalítico, de forma que ahora sí se permitiría la interacción de sustratos más voluminosos. Sin embargo, esta hipótesis debe ser probada toda vez se puedan resolver las estructuras cristalinas de XynB2 silvestre y el mutante XynB2^{Y509E}. Esto será un aspecto importante para evaluar ya que, aunque no está documentada la actividad de XynB2 silvestre sobre xilano, en el artículo de Bravman *et al.* (2003) se indica que XynB2 es también capaz de liberar xilosa a partir de xilano de haya.

La estabilidad de Y509E en un amplio rango de valores de pH es importante porque implica que puede ser utilizada en procesos de hidrólisis enzimática como la producción de azúcares fermentables a partir de residuos agroindustriales pre-tratados. Por otro lado, la ganancia de la actividad dual ofrece la posibilidad de potenciar la actividad sinérgica dentro de cócteles enzimáticos utilizados en procesos para la obtención de xilooligosacáridos y xilosa de residuos de la industria agrícola (Knob *et al.*, 2010, Anand *et al.*, 2013).

Efecto de la temperatura

La estabilidad térmica de una enzima es un factor clave para su aplicación en procesos industriales. En este sentido, XynB2^{Y509E}, muestra una termoestabilidad menor que las de otras β -xilosidasas aisladas de termófilos (Anand *et al.*, 2013, Lama *et al.*, 2004), característica que puede ser optimizada a través de ingeniería genética o de la implementación de técnicas de inmovilización.

La actividad de β -xilosidasa para el mutante XynB2^{Y509E} fue máxima a 60 °C (Figura 9c) lo cual está en correspondencia con lo reportado previamente para esta variante (Huang *et al.* 2014). El hecho de que después de 1 h de incubación a esta temperatura máxima redunde en la pérdida de un 35% de actividad, nos hizo considerar 50 °C como la temperatura para ensayar la posible actividad de xilanasa presente en este mutante y fue el criterio para ensayar la actividad de β -xilosidasa. Algunos estudios refieren que la termoestabilidad de la proteína estaría relacionada con la relación proporcional entre residuos cargados y no

cargados. En secuencias de termófilos hay una proporción elevada de residuos cargados (Arg, Glu y Lys), así como residuos hidrofóbicos (Gli, Ile, Pro y Val), en relación con residuos sin carga (Asn, Gln y Tre), lo que se corresponde con las proporciones estudiadas en la enzima silvestre (Contreras *et al.*, 2008) y que no se afectan de manera significativa con la mutación de la tirosina 509 por el ácido glutámico. La pérdida de actividad catalítica causada por la temperatura se debe a la desnaturalización irreversible de la enzima, derivada de los procesos de desplegamiento y descompactación, que en consecuencia ocasionan daños estructurales al bolsillo catalítico de la proteína.

Parámetros cinéticos

Una vez determinada las condiciones de pH y temperatura donde XynB2^{Y509E} desarrolla su máxima actividad de β -xilosidasa se determinaron los parámetros cinéticos de K_M , V_{max} , K_{cat} y K_{cat}/K_M . En la tabla 3 se muestran los valores de estos parámetros para la actividad catalítica de XynB2 silvestre y del mutante Y509E.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la actividad β -xilosidasa de XynB2WT y XynB2^{Y509E}

Enzima	K_M (mM)	V_{MAX} (nmol/min)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($s^{-1}.mM^{-1}$)
XynB2WT	0,4 \pm 0,1	1,6 \pm 0,01	4,4	11
XynB2 ^{Y509E}	0,9 \pm 0,1	1,18 \pm 0,2	3,2	3,5

Los cambios observados en los parámetros cinéticos (Tabla 3), pueden ser justificados por cambios en el microambiente del bolsillo catalítico. Según Huang *et al.* (2014) la mutación Y509E, promovería la formación de enlaces de hidrógeno con el sustrato, lo que afectaría la combinación enzima-sustrato. Otras mutaciones reportadas (Ben David *et al.*, 2007) han originado nuevas actividades, lo que es indicativo de las potencialidades de XynB2 para ser sometida a otras mutaciones sitio-dirigidas en la búsqueda de optimizar sus características para aplicaciones industriales. En la tabla 4 se presentan los valores de las constantes cinéticas calculadas para la actividad de xilanasas de XynB2^{Y509E} con el método de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burke. El valor de K_M para la actividad de xilanasas es 5

veces menor que el reportado por Huang *et al.*, (2014), quienes utilizaron xilano de madera de haya. Para esta investigación se probaron 2 tipos de xilano, de haya y de abedul, se seleccionó este último porque ofrecía mejores características de solubilidad, así como mejores resultados en las pruebas preliminares de actividad, lo que podría explicar la diferencia cuando se comparan ambos resultados.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la actividad de xilanasa de XynB2^{Y509E}

Enzima	K _M (mg/mL)	V _{MAX} (pmol/seg)
XynB2 ^{Y509E}	0,9 ± 0,1	0,05 ± 0,01

En referencia a la estabilidad de la enzima para su preservación y almacenamiento, se han hecho ensayos a temperatura ambiente (25°C) y a 4 °C durante una semana, con pérdida considerable de la actividad (90%) luego de 1 semana bajo la primera condición. La enzima se preserva perfectamente al 100% de su actividad a 4°C, hasta 1 semana luego de la cual se observa un ligero decaimiento. Así mismo, la enzima fue sometida a un proceso de liofilización y almacenada a 4°C, luego del cual fue ensayada la actividad rehidratando las cantidades equivalentes en masa, con recuperación del 100% de la actividad. Este procedimiento pudo ser probado durante dos meses con total reproducibilidad de los resultados

Fluorescencia en estado estacionario de XynB2^{Y509E}

Fluorescencia intrínseca de XynB2^{Y509E} a diferentes pH

XynB2WT es una enzima que presenta múltiples residuos fluorescentes: 17 triptófanos (W) y 28 tirosinas (Y) (Contreras *et al.*, 2008). La forma mutante bajo estudio, XynB2^{Y509E} posee solo un residuo menos de tirosina respecto a la forma silvestre. Por ello es predecible que los cambios en la fluorescencia producida por pH, temperaturas y agentes caotrópicos sea similar a lo reportado para XynB2WT.

XynB2^{Y509E} posee 17 W y 28 Y por lo tanto la excitación se hizo tanto a 280 como a 295 nm para excitar diferencialmente los W y Y en el caso de 280 nm y a 295 nm para los W. En la figura 11 se comparan los espectros de emisión de la proteína a 3 diferentes pH después de excitarse a 280 nm. Se observa que la fluorescencia es máxima a pH 7, y que a pH ácidos o bajos ésta disminuye. A pH 7, el máximo de emisión se centra a 343 nm, por lo que se puede decir que la fluorescencia de XynB2^{Y509E} a pH 7 está dominada por los residuos de triptófano. El cambio al azul del máximo de emisión sugiere que los triptófanos o al menos uno de ellos están completamente ocultos en la estructura. Este comportamiento también ha sido observado para la XynB2WT (Contreras *et al.*, 2008). A pH 4, el máximo de emisión se desplaza aún más al azul (340 nm), sugiriendo que a este pH el ambiente que rodea a los residuos fluorescentes es más apolar.

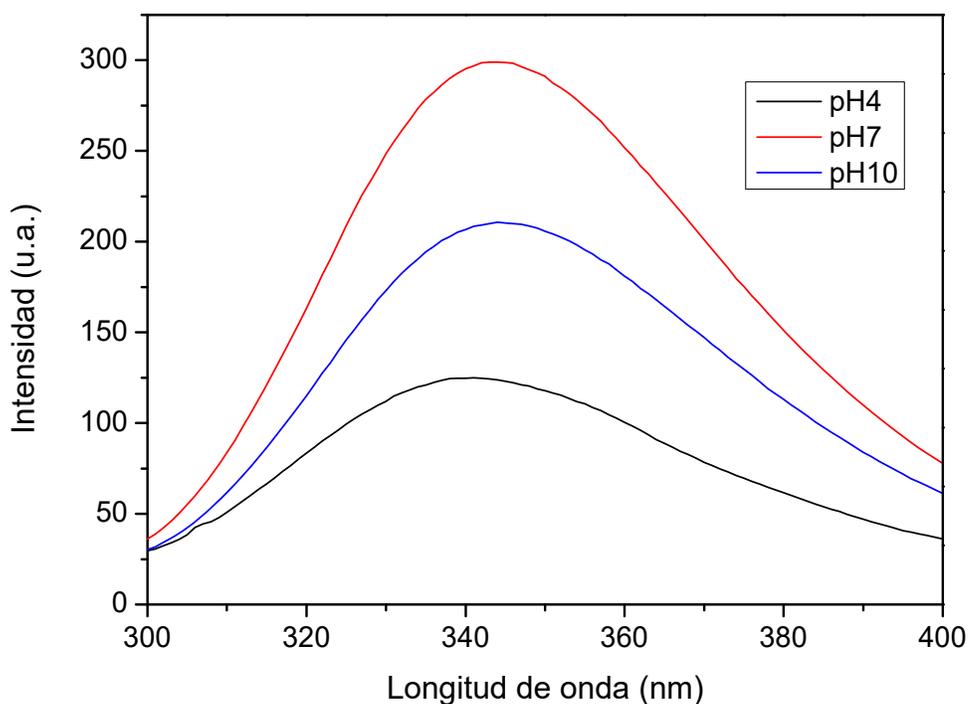


Figura 11. Espectros de la emisión de fluorescencia de XynB2^{Y509E} a tres diferentes pH después de excitar a 280 nm.

Para caracterizar mejor los posibles cambios que ocurren en la estructura terciaria de la proteína se determinó el espectro de fluorescencia de XynB2^{Y509E} a diferentes valores de pH dentro del rango de pH de 2 a 12. La figura 12 muestra como varía la energía media de la fluorescencia en función del pH después de excitar a 280 y 295 nm. En ella es posible observar que no existe un comportamiento diferencial entre los triptófanos y las tirosinas y que existen dos cambios en el ambiente que rodea a los residuos fluorescentes, uno que tiene lugar a pH 4 y otro a pH 11. La ausencia de línea de base de ambas transiciones impide hacer el ajuste apropiado para los pKa.

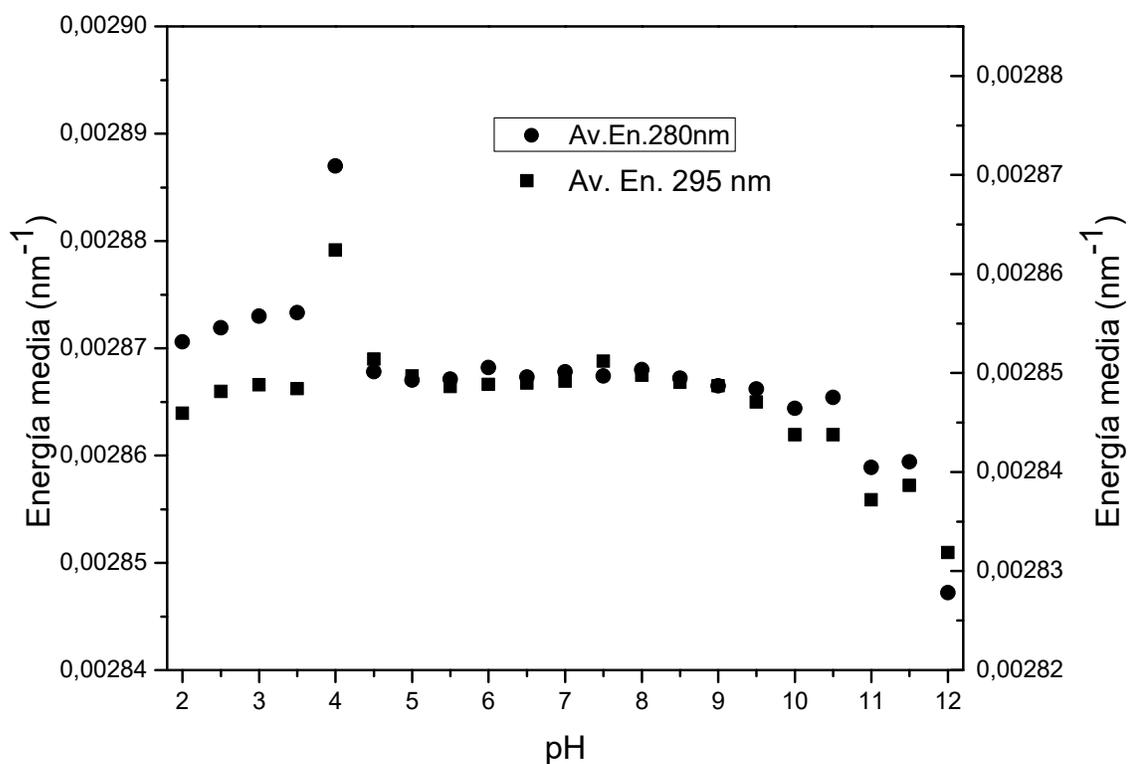


Figura 12. Variación de la energía promedio de la fluorescencia de XynB2^{Y509E} en función del pH.

Con la intención de obtener los pKa de estas transiciones, se estudió también como varía la intensidad del máximo de emisión en función del pH. La figura 13 muestra la superposición de la variación de la energía promedio con la variación de la fluorescencia a 340 nm. Se observa que la fluorescencia aumenta a partir del pH 4 siendo máxima a valores de pH cercanos a la neutralidad. Esta transición pudo ser ajustada dando como resultado un pKa de 4,45 un valor bastante similar al reportado para XynB2 silvestre de 4,29 (Contreras *et al.*, 2008). A partir del pH 8,5 la intensidad vuelve a disminuir, sin embargo, la ausencia de línea de base a pH superiores a 11 impide conocer este otro pKa.

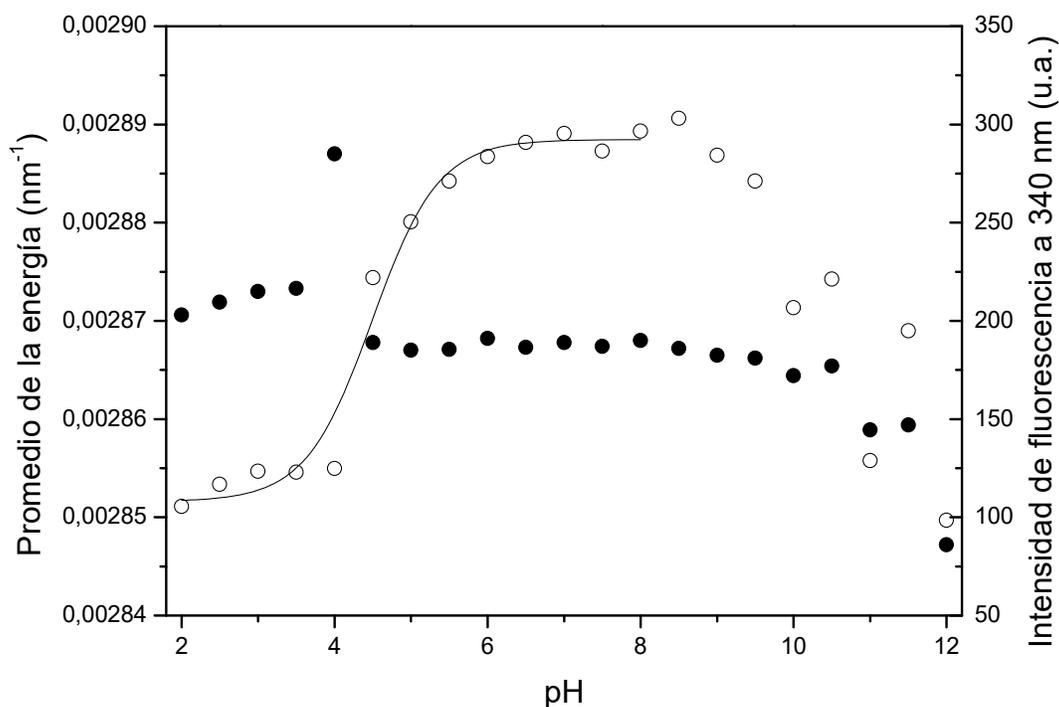


Figura 13. Variación de la energía promedio de la fluorescencia (círculos negros) y de la intensidad de fluorescencia a 340 nm (círculos blancos) de XynB2^{Y509E} en función del pH.

Unión de XynB2^{Y509E} a la sonda fluorescente ANS

Con la finalidad de conocer la presencia de parches hidrofóbicos en XynB2^{Y509E} se estudió la unión de la proteína a la sonda fluorescente en función del pH. La sonda ANS (1-

anilinaftaleno-8-sulfonato) es apenas fluorescente en un entorno acuoso, pero se vuelve muy fluorescente en disolventes orgánicos apolares o tras la adsorción en fases sólidas (Hawe *et al.*, 2008). La Figura 14 muestra una transición ácida para la intensidad de fluorescencia del ANS a 480 nm al variar el pH. Elegimos esta longitud de onda para monitorear los cambios en la desnaturalización del pH, porque es la longitud de onda máxima a pH ácidos (cuando hay unión entre la proteína y la sonda). El pKa estimado para esta transición fue de 3,88 indicando que, a pH inferiores a este valor, XynB2^{Y509E} expone parches hidrofóbicos al solvente. El valor de pKa para la titulación de XynB2^{Y509E} con ANS es ligeramente inferior al reportado para XynB2WT de 4,43 (Contreras *et al.*, 2008), sin embargo, el comportamiento global es el mismo ya que la transición tiene lugar a pH ácido.

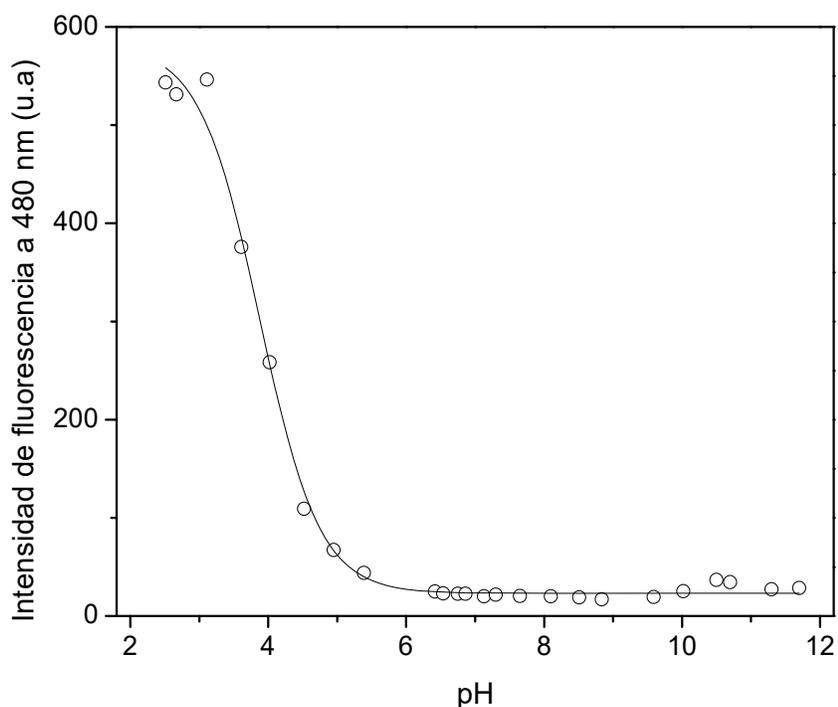


Figura 14. Variación de la intensidad de fluorescencia a 480 nm de la unión a ANS por XynB2^{Y509E} en función del pH.

Desnaturalización térmica de XynB2^{Y509E} por fluorescencia

Los resultados anteriores de la fluorescencia sugieren que la proteína tiene una estructura de tipo nativo bien plegada entre aproximadamente pH 6,0 y 8,0. Para probar aún más esos resultados, se llevó a cabo la desnaturalización térmica a pH 6,5 (a 2 μ M) ya que este es el pH óptimo y máximo de la actividad enzimática catalizada por la XynB2^{Y509E}. La figura 15 muestra que la desnaturalización térmica está caracterizada por una única transición. Al final del barrido de temperatura se observó que la proteína estaba agregada sugiriendo que el proceso de desnaturalización térmica fue irreversible. Esta característica hizo que el punto medio de desnaturalización térmica (T_m) sea aparente. El valor de T_m , es decir la temperatura a la que la fracción de proteína desplegada es igual a 0,5, fue de 339,5 K o 66,5 °C. Este valor es 10 °C menor que lo reportado para la XynB2WT (Contreras *et al.*, 2008), confirmando los resultados enzimáticos donde se observa que este mutante se desnaturaliza más rápido que su contraparte nativa.

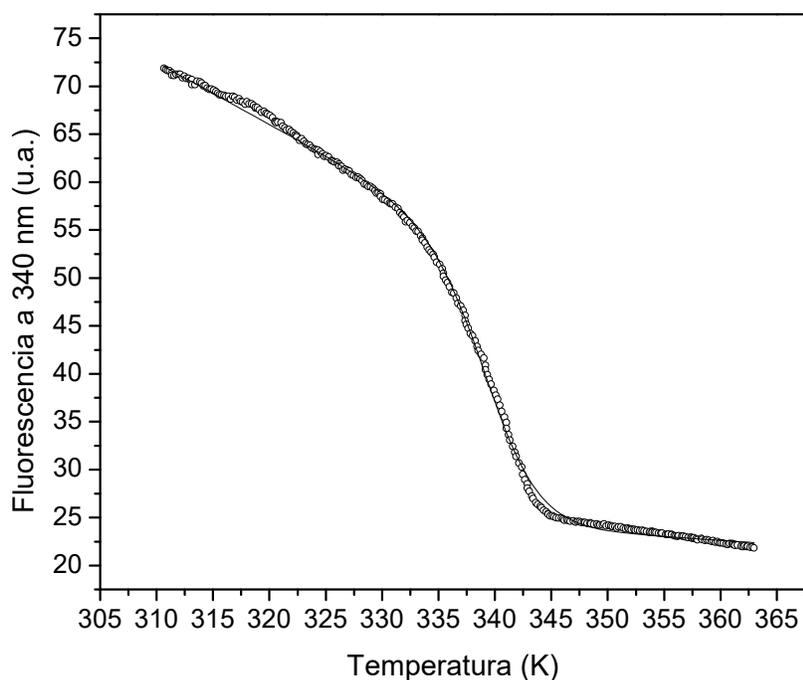


Figura 15. Desnaturalización térmica de XynB2^{Y509E} seguida por cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca a pH 6,5. Se muestran los valores obtenidos junto a su ajuste.

Además de estudiar la desnaturalización térmica en el pH óptimo de conformación y actividad también se estudió cómo varía la T_m aparente a pH ligeramente ácidos y básicos, es decir a valores de pH donde la enzima aún presenta actividad. La figura 16 muestra las curvas de desnaturalización de XynB2^{Y509E} a valores de pH de 5,4; 6,5; 6,8; 7,3; 7,6 y 8,9 respectivamente. En ella es posible observar que el punto medio de desnaturalización (T_m) se desplaza a menores valores de temperatura a valores de pH inferiores o superiores a 6,5 unidades, p.e. la T_m de 339,5 K a pH 6,5 (curva línea roja) disminuye a 335,2 K en pH 5,5 (curva línea negra) o a 332,4 K en pH 8,9 (curva línea fucsia). Dado que se observó una sola transición en todos los valores de pH donde la enzima presenta actividad, se puede concluir que la disociación térmica del dímero y el despliegue de un monómero ocurren de manera concomitante, tal y como ha sido reportado para su contraparte silvestre (Contreras *et al.*, 2008) y para otras proteínas oligoméricas (Neira *et al.*, 2021; Pozo-Dengra *et al.*, 2009).

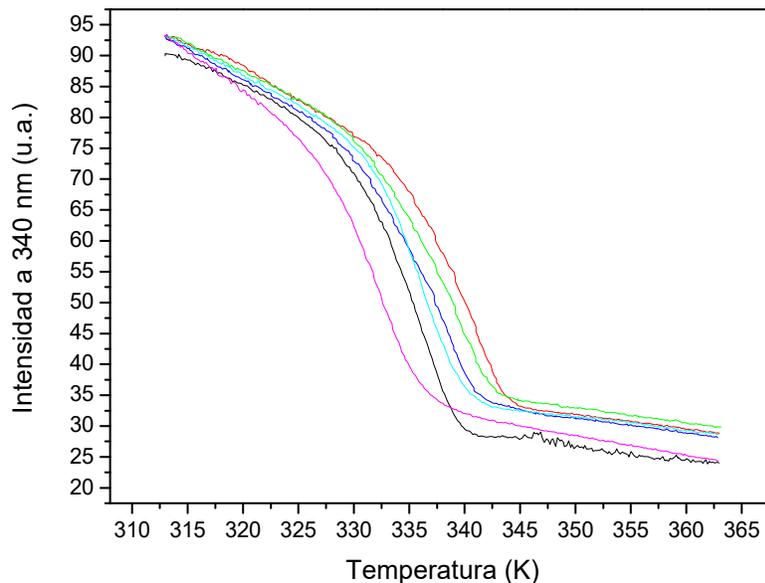


Figura 16. Desnaturalización térmica de $XynB2^{Y509E}$ seguida por cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca a diferentes valores de pH: 5,5 (—); 6,5 (—); 6,9 (—); 7,3 (—); 7,6 (—) y 8,9 (—).

Dicroísmo circular de $XynB2^{Y509E}$

Estructura secundaria de $XynB2^{Y509E}$

La estructura secundaria de $XynB2^{Y509E}$ fue examinada a 25 °C por CD utilizando procedimientos de desconvolución. La figura 17 muestra el espectro de la proteína a una concentración de 2 μ M en el UV lejano. Este espectro mostró un mínimo amplio entre 220 y 210 nm, siendo el mínimo a 210 nm ligeramente más intenso que el de 220 nm. La presencia de estos mínimos sugiere que en $XynB2^{Y509E}$ está dominada por las conformaciones de hélice α o de giro β junto con hoja β , lo cual está en concordancia con lo reportado para su contraparte *silvestre* (Contreras *et al.*, 2008). La desconvolución del espectro de CD fue posible utilizando el programa CDNN (Böhm *et al.*, 1992). Este programa reportó que $XynB2^{Y509E}$ contiene un 25,1% de estructura helicoidal, un 24,4% de hoja β , un 17,1% de giros β y un 33,2% de estructura de no ordenada, valores muy similares a lo reportado para $XynB2^{WT}$ (Contreras *et al.*, 2008). Este resultado es

esperable teniendo en cuenta que la forma mutada solo presenta un aminoácido diferente a la forma nativa. En ese sentido podemos indicar que la mutación Y509E es una mutación benigna a nivel de la conformación y estructura de XynB2.

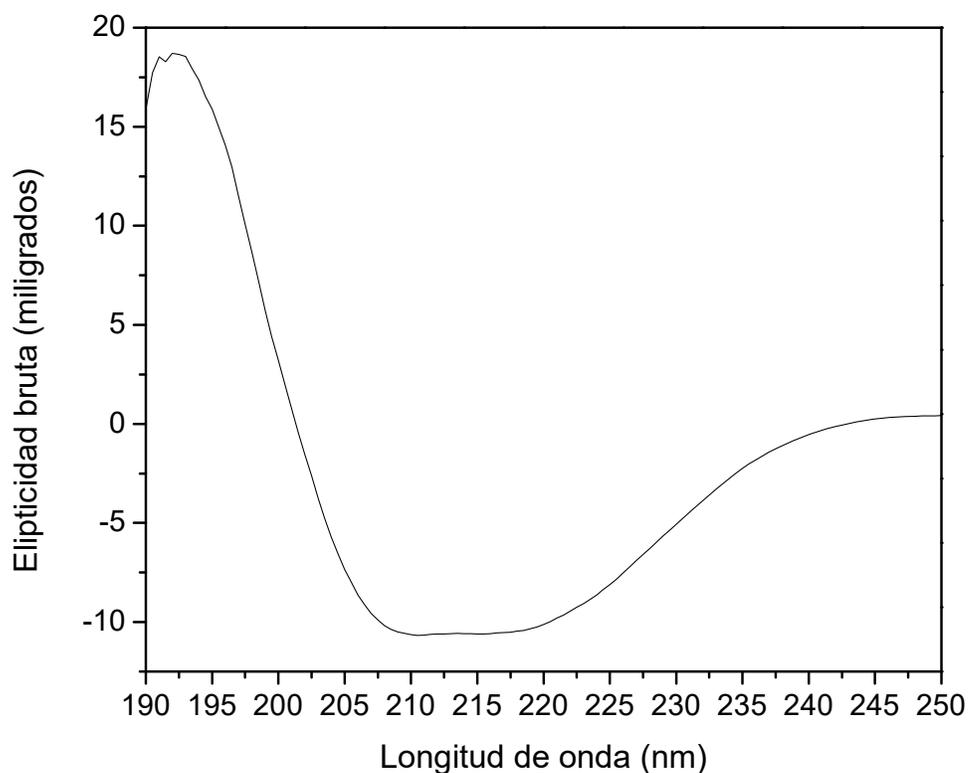


Figura 17. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de XynB2^{Y509E}. El espectro se adquirió en celda de 0,1 cm de paso óptico. Las condiciones fueron pH 6,5 (tampón de fosfato de sodio 100 mM), 25 °C y una concentración de 2 μM.

Cambios conformacionales XynB2^{Y509E} inducidos por pH

En esta tesis doctoral se utilizó el dicroísmo circular en el UV lejano para determinar los posibles cambios en la estructura secundaria de XynB2^{Y509E}. La razón es que la técnica de dicroísmo circular es sensible a la estructura secundaria de las proteínas (Kelly & Price, 2000). Los experimentos se llevaron a cabo a la misma concentración que los experimentos de fluorescencia (2 μM). La figura 18 muestra la variación en la elipticidad molar de

XynB2^{Y509E} en función del pH donde es posible observar una curva compleja caracterizada por varios cambios: a pH menores de 4 donde no hay actividad enzimática, hay una disminución de la elipticidad molar; aunque a pH 4 hay una pequeña ganancia de elipticidad molar ésta se pierde nuevamente a valores de pH 4,5 y 5,5 justo cuando comienza la actividad catalítica; la elipticidad molar se hace máxima a pH 6,5 (mismo pH de máxima actividad enzimática) permaneciendo básicamente inalterada hasta pH 9; a partir de pH 9 hay una disminución gradual en la elipticidad (en valor absoluto). Se utilizó la señal a 222 nm debido a que a este valor el espectro adquirido a pH 6,5 presenta un mínimo (Figura 17), a que esta presenta una mejor relación señal/ruido en comparación con el mínimo a 210 nm y al hecho que la estructura de hélice α absorbe a esta longitud de onda (Kelly y Price, 2000; Kelly *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se puede concluir que la desnaturalización de la proteína por pH, seguida por fluorescencia intrínseca y CD, fue similar en torno al pH donde hay actividad enzimática. La elipticidad a 222 nm (Figura 18) y la intensidad de fluorescencia a 340 nm (Figura 13) mostraron valores constantes en el intervalo de pH de 6 a 8,0, y cambiaron a valores de pH muy ácidos o básicos.

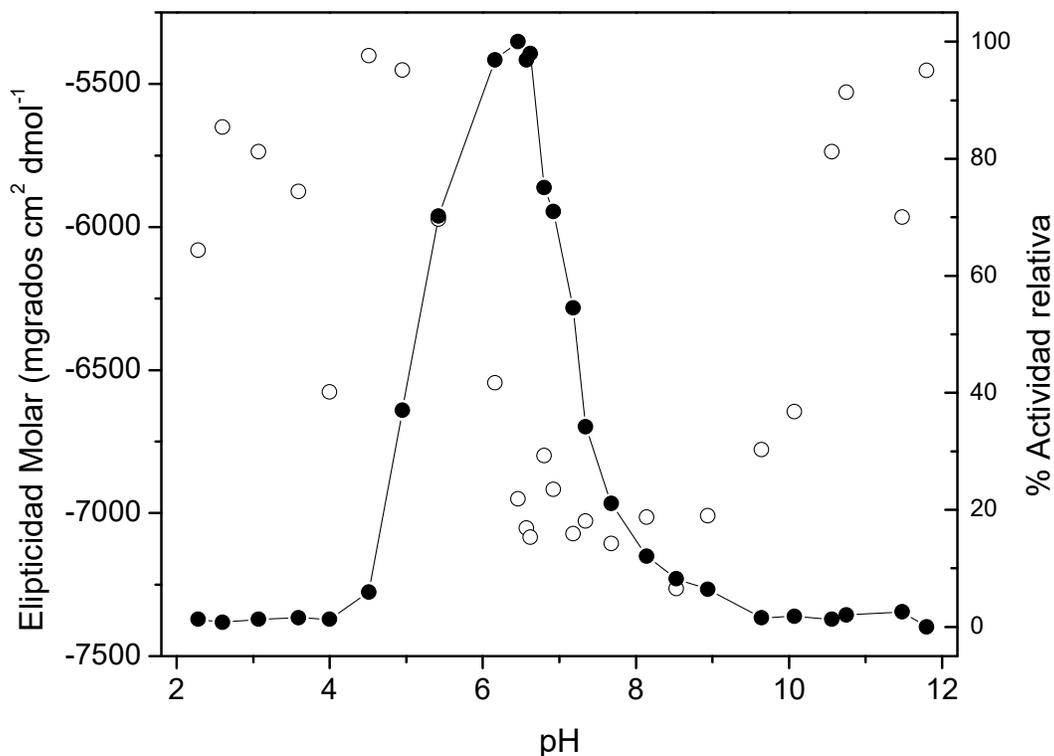


Figura 18. Cambios estructurales seguidos por dicroísmo circular y cambios en la actividad de XynB2^{Y509E} inducidos por el pH. El eje Y (izquierda) muestra los cambios de la elipticidad a 222 nm frente al pH. Los espectros se adquirieron en celdas de 0,1 cm de paso óptico. La concentración de proteína fue de 2 μ M (en unidades de protómero) y la concentración de tampón fue de 100 mM. El eje Y (derecha) muestra los cambios de la actividad de XynB2^{Y509E} sobre p-NPX frente al pH.

Desnaturalización térmica de XynB2^{Y509E} por dicroísmo circular

La desnaturalización térmica de XynB2^{Y509E} a su pH óptimo de actividad y conformación también fue estudiada CD en el ultravioleta lejano. Se encontró que la transición fue irreversible impidiendo estimar los parámetros termodinámicos que gobiernan el proceso de desplegamiento. La figura 19 muestra la curva de desplegamiento obtenida cuando 2 μ M de XynB2^{Y509E} se somete a calentamiento dentro del intervalo de temperatura de 60 a 100 °C (333 – 373 K) y a una velocidad de barrido igual a 1 °C/min (Figura 19). Se puede observar una curva con una transición que presenta un comportamiento sigmoide. La

transición después de finalizar el calentamiento, enfriar y volver a calentar resultó ser irreversible con una T_m aparente cercana a 350 K o 77 °C. Dado que la proteína XynB2WT a esta misma concentración y velocidad de barrido presenta una T_m aparente cercana a 80 °C se puede concluir con la mutación Y509E origina una forma enzimática menos estable térmicamente, confirmando también los experimentos de actividad recogidos en este capítulo.

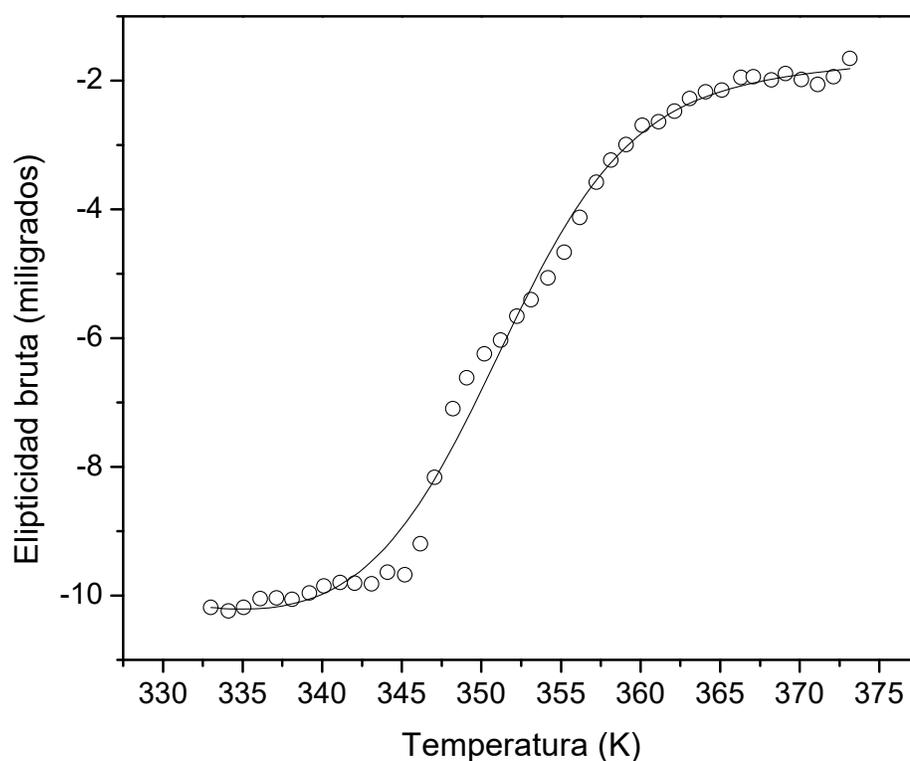


Figura 19. Desnaturalización térmica de $XynB2^{Y509E}$ a pH 6,5 determinada por CD. Se siguió el cambio en la elipticidad bruta a 222 nm.

El ajuste hecho a la transición de $XynB2^{Y509E}$ se hizo siguiendo el modelo en dos estados tal y como fue reportado por Contreras *et al.* (2008) para XynB2WT. Sin embargo, es oportuno indicar que la curva de desnaturalización para el mutante (Figura 19) también podría interpretarse como una curva con dos cambios de pendiente, una más fuerte que

inicia en 345 K y finaliza a 350 K, y otra menor que inicia en 351 K y termina en 360 K. Estos dos puntos de inflexión podrían representar un modelo de tres estados para la disociación del dímero del mutante: dímero, monómero e inactivo. La primera transición representaría la disociación del oligómero mientras que la segunda sería el desplegamiento irreversible del monómero. Se hizo el ajuste por separado de las dos posibles transiciones, sin embargo, solo fue posible ajustar la primera transición con una T_m aparente de 348,5 K o 75,5 °C, es decir 1,5 °C menos que cuando se hace el ajuste al modelo de dos estados. Una forma de discriminar entre estas dos opciones podría ser estudiar el desplegamiento aumentando la concentración de proteínas para confirmar que la posible 1era transición se desplaza a mayor temperatura y que la 2da transición queda inalterable. Sin embargo, es importante resaltar que, en cualquiera de los dos casos, el valor de T_m es menor a la reportada para XynB2WT ratificando la sugerencia de que la mutación Y509E afecta la capacidad termofílica de XynB2.

Con la finalidad de caracterizar mejor la estabilidad térmica del mutante Y509E se estudió la posible dependencia de su T_m aparente con la velocidad de barrido (Sánchez-Ruiz, 1992; Sánchez-Ruiz *et al.*, 1988a, Sánchez Ruiz *et al.*, 1988b). Para ello, XynB2^{Y509E} a una concentración de 2 μ M, se sometió también a desnaturalización térmica pero ahora aumentando la velocidad de barrido a 1,5 °C/min. La figura 20 muestra las curvas de desplegamiento de XynB2^{Y509E} obtenidas para 1 °C/min (la curva de la Figura 18 pero sin ajuste) y para 1.5 °C/min. En esta es posible observar que el punto medio de la transición se desplaza a mayor temperatura cuando la velocidad del barrido aumenta, sugiriendo que el proceso de desnaturalización térmica está bajo control cinético. Este mismo comportamiento también ha sido descrito previamente para la forma nativa de la proteína (Contreras *et al.*, 2008) y para muchas otras enzimas (Quezada *et al.*, 2017; Sánchez-Ruiz, 2010).

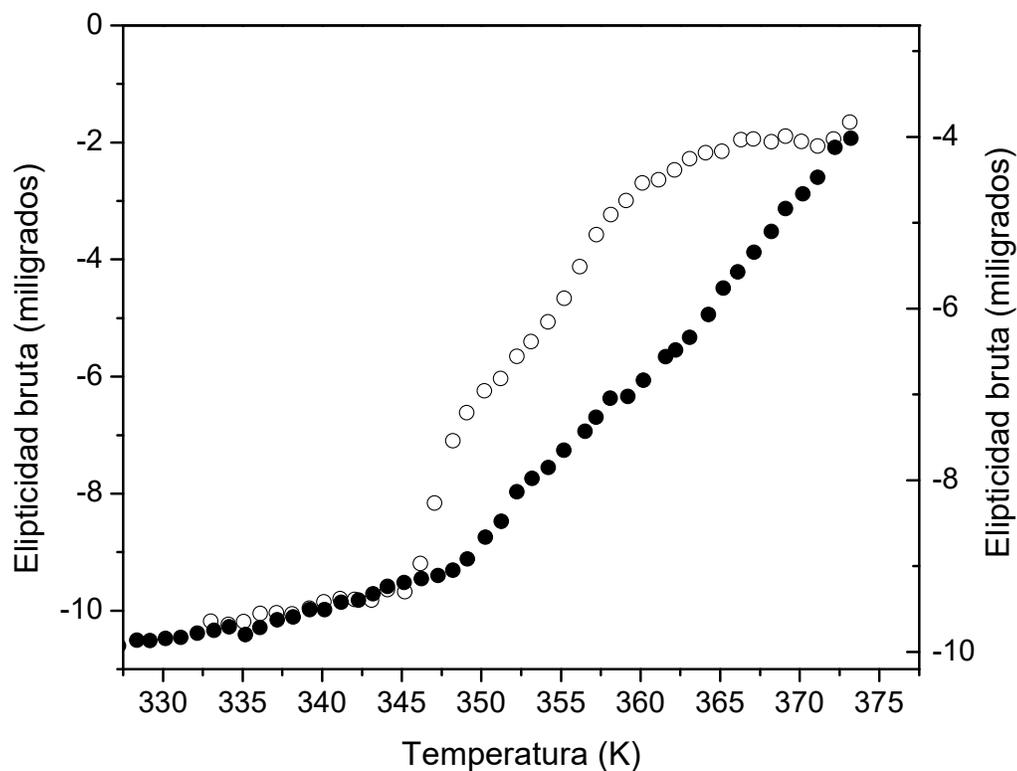


Figura 20. Desnaturalizaciones térmicas por CD de XynB2^{Y509E} registrada a 1 °C/min (○) y a 1,5 °C/min (●) respectivamente.

Las dos técnicas espectroscópicas utilizadas para caracterizar la conformación y estructura de XynB2^{Y509E} indican que ésta adquiere una estructura nativa con regiones bien plegadas dentro del intervalo de pH 5,5 – 9, aunque la actividad está principalmente restringida al intervalo 5,5 – 7 (actividad de más del 30% residual). Para finalizar, los resultados de la desnaturalización térmica de XynB2^{Y509E} sugieren que primero se pierde la estructura terciaria (T_m medida por fluorescencia igual a 66,5 °C) y luego la secundaria (T_m medida por CD 77 °C según modelo de dos estados o 75,5 °C según modelo de tres estados), lo cual está en correspondencia con lo que cabría esperar.

Desnaturalización química de XynB2^{Y509E} con cloruro de guanidinio seguida por fluorescencia y dicroísmo circular.

Dado que la estabilidad de XynB2^{Y509E} no pudo ser determinada por medio de desnaturalización térmica, se intentó calcularla a través de desnaturalización química seguida por fluorescencia y por dicroísmo circular. Se utilizó como agente desnaturalizante el cloruro de guanidinio (GdnCl) y los experimentos se desarrollaron a pH 6.5 ya que es el pH de máxima actividad y el valor donde la proteína está plegada correctamente. Se seleccionó solo cloruro de guanidinio ya que este fue el agente denaturalizante con el cual se caracterizó la estabilidad de la proteína *silvestre* (Contreras *et al.*, 2008).

Por fluorescencia intrínseca

La figura 21 muestra los resultados obtenidos para la desnaturalización por GdnCl de XynB2^{Y509E}. La técnica espectroscópica de fluorescencia reveló una curva con dos transiciones, mientras que la actividad muestra solo una que tiene lugar a una concentración menor que la primera transición por fluorescencia. Este comportamiento diferencial también ha sido reportado previamente para la XynB2WT. El ajuste de la curva de actividad puso de manifiesto que se pierde un 50% de actividad a concentraciones tan bajas de GdnCl de $0,92 \pm 0,01$ M. La actividad de XynB2^{Y509E} depende de la unión del sustrato p-NPX al sitio activo. Esta unión puede verse afectada por la disponibilidad de los residuos catalíticos como por la integridad estructural de la proteína. Dado que la actividad se pierde antes que ocurra cualquier cambio conformacional se sugiere que el agente GdnCl interactúa con los residuos presentes en la región del centro activo de la enzima tal y como se ha propuesto para otras enzimas como la glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa (Verma *et al.*, 2013) y la lisozima (Biswas *et al.*, 2018). El valor de $[GdnCl]_{1/2}$ para la pérdida de la actividad de β -xilosidasa de XynB2^{Y509E} fue menor al reportado para la XynB2WT.

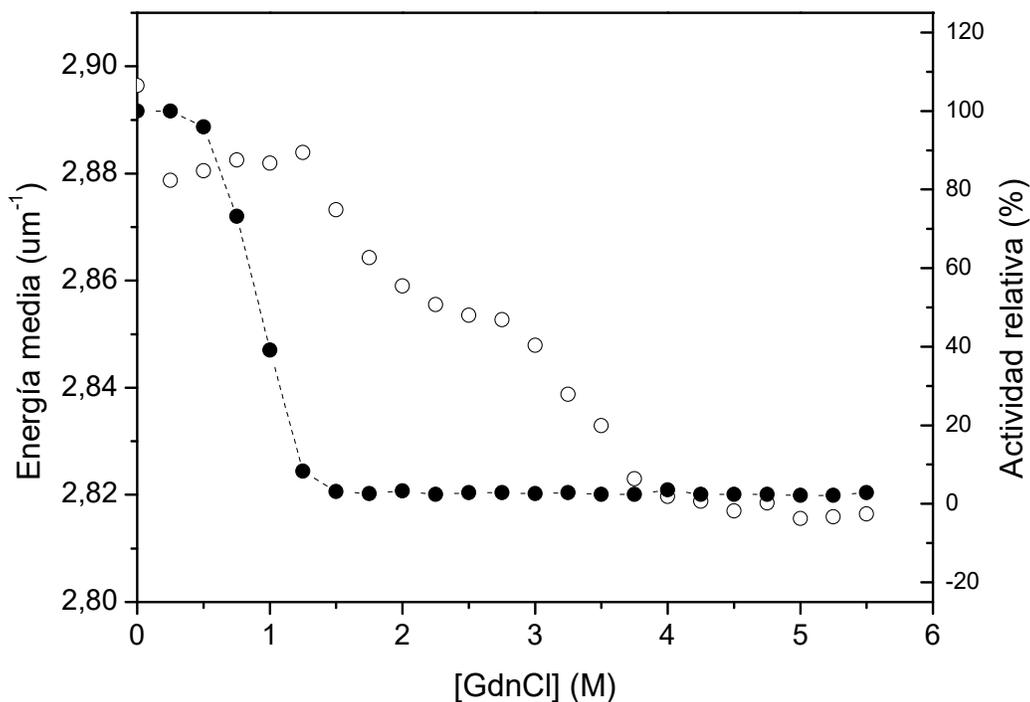


Figura 21. Desnaturalización química de XynB2^{Y509E} a pH 6,5 seguida por fluorescencia y por actividad enzimática. La línea se dibuja para guiar la pérdida de la actividad.

Las dos transiciones observadas en el cambio de la energía media de la fluorescencia de XynB2^{Y509E} en función de GdnCl también fueron ajustadas. La primera transición ocurre a una $[GdnCl]_{1/2}$ de $1,64 \pm 0,12$ M mientras que la segunda a $3,36 \pm 0,03$ M. Estos valores fueron menores a lo reportado para la forma *silvestre* de la enzima evidenciando que la mutación hace que le enzima sea menos estable frente a GdnCl.

La cinética de la desnaturalización química por GdnCl también ha sido documentada para la forma XynB2WT (Contreras *et al.*, 2008). Con la finalidad de determinar si las transiciones de desplegamiento observadas para el mutante también se desplazan con el tiempo, se hizo el experimento de desnaturalización química después de 3 semanas. La idea inicial era hacerlo a 1 mes pero problemas con el fluorímetro impidieron que se midiera al

mes de haberse preparado las muestras. La figura 22 muestra la comparación de las curvas obtenidas a través de la variación de la energía media en función de GdnCl para las muestras de 24 h de incubación con el agente desnaturizante (curva círculos abiertos) y tras 3 semanas (curva círculos negros). En la figura es evidente que la 1era transición, después de 3 semanas se desplaza a la izquierda, es decir el $[GdnCl]_{1/2}$ ocurre a concentraciones menores de 1,64 M. La ausencia de línea de base en los extremos de esta transición imposibilitó su ajuste y por lo tanto documentar su valor exacto. Respecto a la 2da transición los resultados sugieren que ésta permanece inalterable. El comportamiento de la cinética de la desnaturalización de XynB2^{Y509E} es algo diferente a lo reportado para la XynB2WT ya que después de 30 días, la 1era transición de XynB2WT (la del desplegamiento del dímero) permanece inalterable mientras que la 2da transición (la del desplegamiento del monómero) si fue dependiente del tiempo. Esta diferencia podría atribuirse al hecho que en nuestro caso la medida a los 30 días no fue posible. Sin embargo, podemos considerar esta diferencia como una evidencia más que el mutante XynB2^{Y509E} pareciera ser más inestable que su forma nativa.

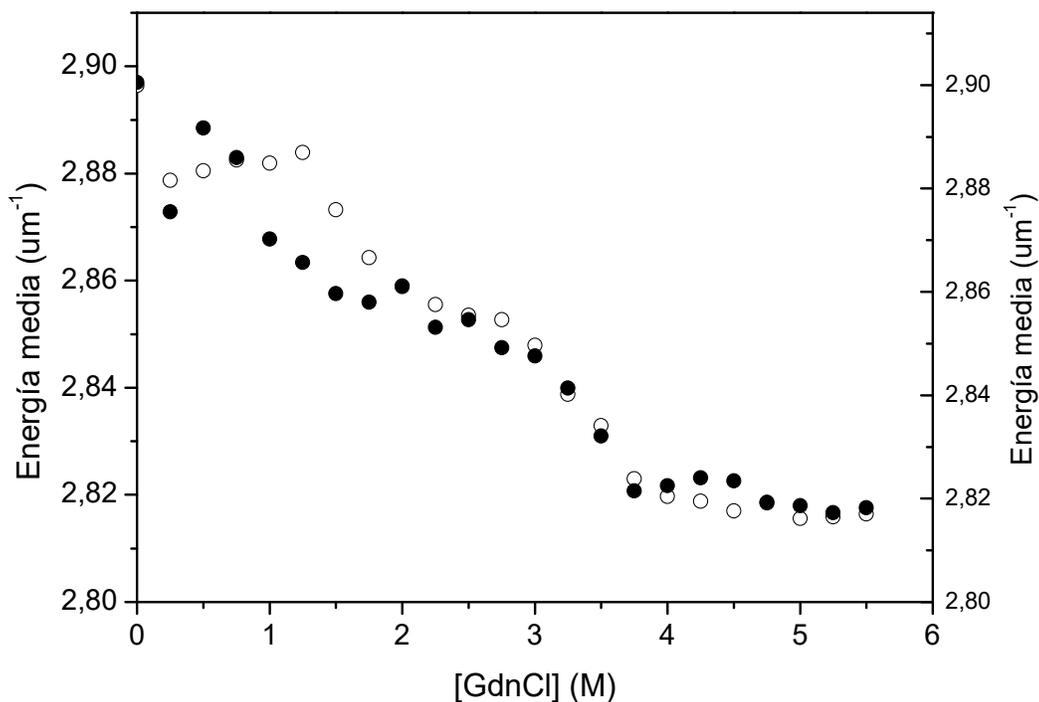


Figura 22. Cinética de la desnaturalización química de XynB2^{Y509E} a pH 6,5 seguida por fluorescencia. Registro tras 24 h (○) y tres semanas (●) de incubación con GdnCl.

Por dicroísmo circular

La desnaturalización química de XynB2^{Y509E} también se estudió por dicroísmo circular en el UV lejano (Figura 23). La elipticidad a 222 nm en la desnaturalización con cloruro de guanidinio mostró una curva ancha con dos suaves cambios de pendiente que podemos presumir son dos transiciones, una que ocurre a bajas concentraciones del desnaturalizante (1 – 2 M) y la otra que ocurre a mayores concentraciones (2 – 5 M). La ausencia de línea de base entre las transiciones impidió su ajuste y por lo tanto indicar el punto medio exacto a la que ocurren las dos transiciones. Es importante acotar que estas dos transiciones se hacen más evidentes cuando se aumenta la concentración de proteína, sin embargo, se decidió mostrar en esta tesis solo lo obtenida a 2μM (curva de círculos abiertos) ya que esa fue la

concentración utilizada para los experimentos de fluorescencia. Las dos transiciones observadas tanto por fluorescencia como por dicroísmo circular sugieren que el desplegamiento químico de XynB2^{Y509E}, debido a su gran tamaño, es complejo.

La figura 23 también muestra la curva para el experimento de replegamiento utilizando GdnCl como desnaturalizante (curva de cuadrados abiertos). La no superposición en todas las concentraciones de desnaturalizante utilizadas para las curvas de desplegamiento y replegamiento sugiere que el desplegamiento químico de XynB2^{Y509E} es irreversible, tal y como ha sido observado también en la forma XynB2WT. Por lo tanto, tampoco se pudo obtener una medida de la energía libre del plegamiento en ausencia GdnCl para el mutante bajo estudio. En esta figura es evidente que la reacción de plegamiento como de despliegue no siguen el mismo camino sugiriendo un comportamiento de histéresis (Yin *et al.*, 2007). Este comportamiento fue idéntico al observado en XynB2WT (Contreras *et al.*, 2008) y puede explicarse por un mecanismo similar. Es decir, existe una barrera cinética en la transición de reensamblaje entre monómeros y dímeros, y, por lo tanto, es diferente de la disociación de dímeros en monómeros. El análisis más detallado de las curvas entre 3 y 6M pone al descubierto que las dos curvas son prácticamente coincidentes lo cual permite proponer que los monómeros se desnaturalizan y se renaturalizan instantáneamente, pero se retrasa el ensamblaje adicional de dos monómeros para dar el dímero funcional.

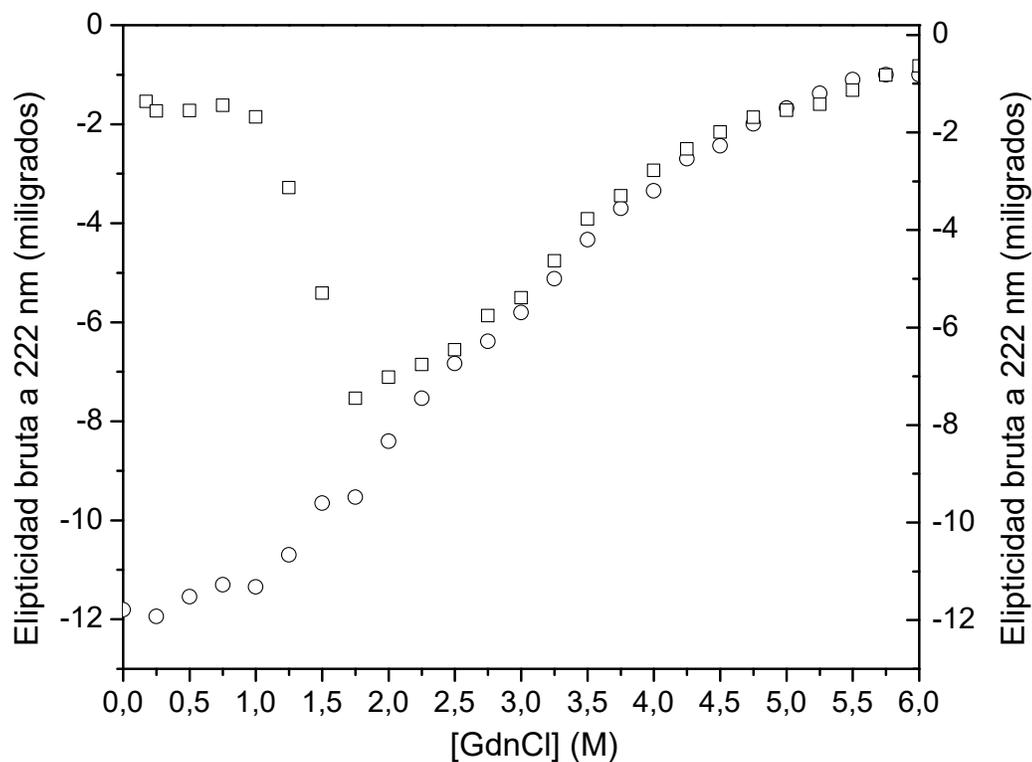


Figura 23. Elipticidad a 222 nm durante las reacciones de desplegamiento (círculos abiertos) y replegamiento (cuadrados abiertos) de XynB2^{Y509E} a pH 6,5.

Con la finalidad de tratar de caracterizar si XynB2^{Y509E} se encuentra plegada en las concentraciones de GdnCl donde se separan las curvas de desplegamiento y replegamiento, se llevaron a cabo desnaturalizaciones térmicas a las muestras de 2 M de GdnCl. La figura 24 muestra que XynB2^{Y509E} desplegada (curva negra) y replegada (curva roja) presentan transiciones sugiriendo que a esta concentración la proteína se encuentra en un estado plegado. Este estado podría ser un estado plegado intermedio no funcional que es diferente al estado nativo plegado debido a la ausencia de actividad enzimática. En la curva de renaturalización, la proteína en este estado intermedio parece no ser capaz de terminar de

replegarse a su forma nativa presumiblemente porque las superficies no se orientan de modo que puedan ocurrir las interacciones no covalentes débiles requeridas para el ensamblaje del dímero.

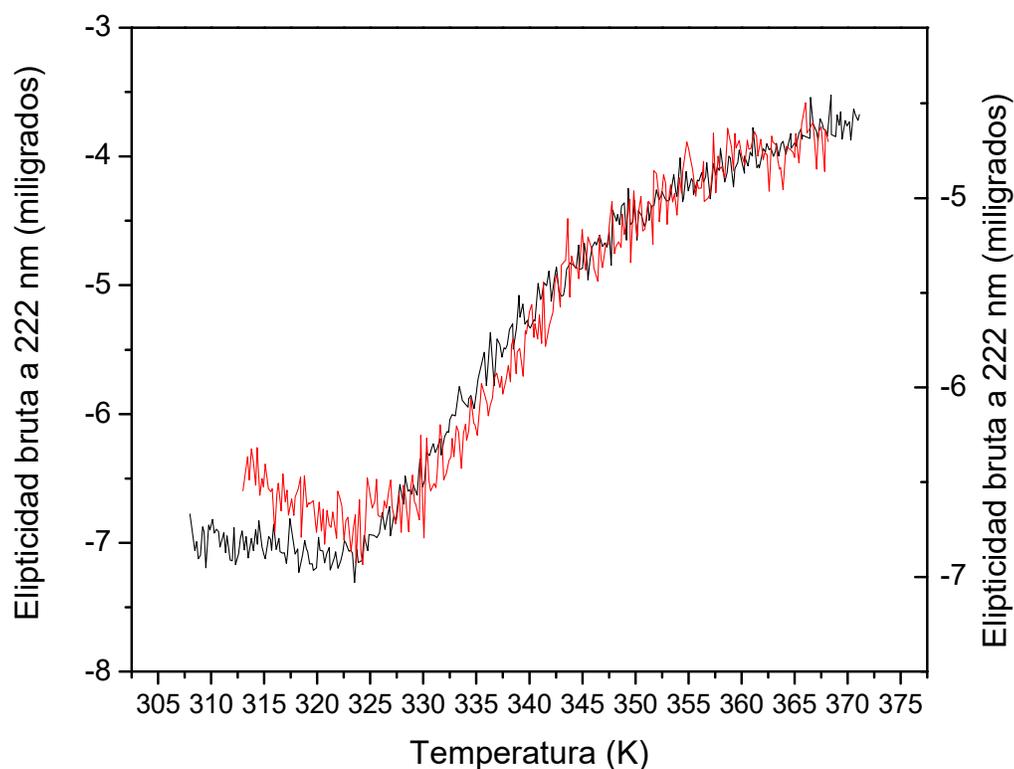


Figura 24. Desnaturalización térmica de XynB2^{Y509E} a 2 M de GdnCl durante las reacciones de desplegamiento (curva negra) y replegamiento (curva roja).

CONCLUSIONES

Se puede indicar que, en términos generales éste mutante comparte las mismas características reportadas para la forma XynB2WT: (1) una estructura secundaria con un 50 % de estructura helicoidal y de hoja β ; (2) una conformación tridimensional estable entre pH 6 y 8; (3) desnaturalización térmica irreversible que evidencia un orden lógico de pérdida de estructura ya que primero se pierde la terciaria y luego la secundaria y (4) una

desnaturalización química por GdnCl también irreversible con un comportamiento de histéresis. Los valores de pKa, Tm y [GdnCl]_{1/2} estimados en los cambios conformacionales por pH, temperatura y agente caotrópico sugieren que el mutante XynB2^{Y509E} es menos estable que XynB2 silvestre desde el punto de vista químico y térmico. A pesar de esta ligera disminución en la estabilidad, el mutante sigue siendo muy termoestable, lo cual unido a su actividad enzimática dual lo hace ser un candidato atractivo para valorar su inmovilización en diferentes soportes de cara a su futura aplicación industrial como aditivo en cócteles enzimáticos para la sacarificación de la basura lignocelulósica.

REFERENCIAS

1. Álvarez, C., Reyes-Sosa, F.M., Díez, B. (2016). Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microbial Biotechnology*, 9(2):149-56. doi: 10.1111/1751-7915.12346.
2. Anand, A., Kumar, V., Satyanarayana, T. (2013). Characteristics of thermostable endoxylanase and β -xylosidase of the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 and its applicability in generating xylooligosaccharides and xylose from agro-residues. *Extremophiles*, 17(3), 357-366.
3. Ben-David, A., Bravman, T., Balazs, Y. S., Czjzek, M., Schomburg, D., Shoham, G., Shoham, Y. (2007). Glycosynthase activity of *Geobacillus stearothermophilus* GH52 β -xylosidase: efficient synthesis of xylooligosaccharides from aD-xylopyranosyl fluoride through a conjugated reaction. *Chembiochem*, 8(17), 2145-2151.
4. Biswas, B., Muttathukattil, A. N., Reddy, G., Singh, P. C. (2018). Contrasting effects of guanidinium chloride and urea on the activity and unfolding of lysozyme. *ACS omega*, 3(10), 14119-14126.
5. Böhm, G., Muhr, R., Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5(3), 191-195.
6. Booth, W. T., Schlachter, C. R., Pote, S., Ussin, N., Mank, N. J., Klapper, V., ... & Chruszcz, M. (2018). Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability. *ACS omega*, 3(1), 760-768.
7. Bravman, T., Zolotnitsky, G., Belakhov, V., Shoham, G., Henrissat, B., Baasov, T., Shoham, Y. (2003). Detailed kinetic analysis of a family 52 glycoside hydrolase: a β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Biochemistry*, 42(35), 10528-10536.
8. Bravman, T., Zolotnitsky, G., Shulami, S., Belakhov, V., Solomon, D., Baasov, T., Shoham, G., Shoham, Y. (2001). Stereochemistry of family 52 glycosyl hydrolases: a β -xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6 is a retaining enzyme. *FEBS Letters*, 495: 39- 43
9. Contreras, L.M., Gómez, J., Prieto, J., Clemente-Jiménez, J.M., Las Heras-Vázquez, F.J., et al. (2008). The family 52 beta-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* is a dimer: structural and biophysical characterization of a glycoside hydrolase. *Biochim Biophys Acta*, 1748(12):1924-1934.
10. De Canio, P., De Bari, I., Romano, P. (2011). Latest frontiers in the biotechnologies for ethanol production from lignocellulosic biomass. *Biofuel Production: Recent Developments and Prospects*, 163.
11. dos Santos, T. C., dos Santos Reis, N., Silva, T. P., Bonomo, R. C. F., Aguiar-Oliveira, E., de Oliveira, J. R., Franco, M. (2018). Production, optimisation and

- partial characterisation of enzymes from filamentous fungi using dried forage cactus pear as substrate. *Waste and biomass valorization*, 9(4), 571-579. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9810-z>
12. Gao, D., Uppugundla, N., Chundawat, Sh., Yu, X., Hermanson, S., Gowda, K., Brumm, P., Mead, D., Balan, V., Dale, B. (2011). Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Biotechnology for biofuels*. 4:5. doi:10.1186/1754-6834-4-5
 13. Goldbeck, R., Damásio, A., Gonçalves, T., Machado, C., Paixão, D., Wolf, L., Mandelli, F., Rocha, G., Ruller, R., Squina, F. (2014). Development of hemicellulolytic enzyme mixtures for plant biomass deconstruction on target biotechnological applications. *Applied Microbiology Biotechnology*. DOI 10.1007/s00253-014-5946-6
 14. Hawe, A., Sutter, M., Jiskoot, W. (2008). Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharmaceutical research*, 25(7), 1487-1499.
 15. Hong, S., Kyung, M., Jo, I., Kim, Y. R., Ha, N. C. (2018). Structure-based protein engineering of bacterial β -xylosidase to increase the production yield of xylobiose from xylose. *Biochemical and biophysical research communications*, 501(3), 703-710.
 16. Huang, Z., Liu, X., Zhang, S., Li, Z. (2014). GH52 xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*: characterization and introduction of xylanase activity by site directed mutagenesis of Tyr509. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(1):65-74. Disponible en <http://bit.ly/2vFiYjO>
 17. Jordan, D. B., Vermillion, K. E., Grigorescu, A. A., Braker, J. D. (2013). Rehabilitation of faulty kinetic determinations and misassigned glycoside hydrolase family of retaining mechanism β -xylosidases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 537(2), 176-184.
 18. Kelly, S. M., Price, N. C. (2000). The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current protein and peptide science*, 1(4), 349-384.
 19. Kelly, S. M., Jess, T. J., Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1751(2), 119-139.
 20. Kmetzki, A. C. F., Henn, C., Moraes, S. S., Silva, N. F. S., Kadowaki, M. K. (2020). Physicochemical Characteristics of Fungal Xylanases and their Potential for Biobleaching of Kraft and Non-wood Pulps. *Annual Research & Review in Biology*, 34(4), 1-7. <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v34i430160>
 21. Knob, A., Terrasan, C. F., Carmona, E. C. (2010). β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 389-407.

22. Kurz, L., García, V., Wilkesman, J., Contreras, L.M. (2014). Enzymatic characterization of the recombinant beta-xylosidase XynB2. *Journal of Medical and biological sciences*, 1 (1). <http://bioscience.scientific-journal.com/articles/1/2.pdf>
23. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
24. Lama, L., Calandrelli, V., Gambacorta, A., Nicolaus, B. (2004). Purification and characterization of thermostable xylanase and β -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. *Research in Microbiology*, 155(4), 283-289.
25. Malgas, S., Mafa, M. S., Mkabayi, L., Pletschke, B. I. (2019). A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(12), 1-13.
26. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
27. Michelin, M., Teixeira, J. A. (2020). Biocatalyst systems for xylooligosaccharides production from lignocellulosic biomass and their uses. In: *Biomass, Biofuels, Biochemicals* (pp. 413-425). Elsevier.
28. Neira, J. L., Cámara-Artigas, A., Hernández-Cifre, J. G., Ortore, M. G. (2021). The histidine phosphocarrier kinase/phosphorylase from *Bacillus subtilis* is an oligomer in solution with a high thermal stability. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3231.
29. Pozo-Dengra, J., Martínez-Rodríguez, S., Contreras, L. M., Prieto, J., Andújar-Sánchez, M., Clemente-Jiménez, J. M., ... & Neira, J. L. (2009). Structure and conformational stability of a tetrameric thermostable N-succinylamino acid racemase. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 91(9), 757-772.
30. Prajapati, A. S., Panchal, K. J., Pawar, V. A., Noronha, M. J., Patel, D. H., Subramanian, R. B. (2018). Review on cellulase and xylanase engineering for biofuel production. *Industrial Biotechnology*, 14(1), 38-44.
31. Quezada, A. G., Díaz-Salazar, A. J., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., Piñeiro, Á., Costas, M. (2017). Interplay between protein thermal flexibility and kinetic stability. *Structure*, 25(1), 167-179.
32. Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A. & Tschaplinski, T. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311: 484-489.
33. Rohman, A., Dijkstra, B. W., & Puspaningsih, N. N. T. (2019). β -Xylosidases: Structural diversity, catalytic mechanism, and inhibition by monosaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5524.
34. Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.T. (1989). *Molecular cloning, a Laboratory Manual*. 2ed. Book1. New York, EE.UU., Cold Spring Harbor Laboratory Press

35. Sanchez-Ruiz, J. M. (1992). Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophysical Journal*, 61(4), 921-935.
36. Sanchez-Ruiz, J. M. (2010). Protein kinetic stability. *Biophysical Chemistry*, 148(1-3), 1-15.
37. Sanchez-Ruiz, J. M., Lopez-Lacomba, J. L., Cortijo, M., Mateo, P. L. (1988b). Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemistry*, 27(5), 1648-1652.
38. Sanchez-Ruiz, J. M., Lopez-Lacomba, J. L., Mateo, P. L., Vilanova, M., Serra, M. A., Aviles, F. X. (1988a). Analysis of the thermal unfolding of porcine procarboxypeptidase A and its functional pieces by differential scanning calorimetry. *European journal of biochemistry*, 176(1), 225-230.
39. Sharma, K., Khaire, K. C., Thakur, A., Moholkar, V. S., Goyal, A. (2020). Acacia Xylan as a Substitute for Commercially Available Xylan and Its Application in the Production of Xylooligosaccharides. *ACS omega*, 5(23), 13729–13738.
40. Shao, W., Xue, Y., Wu, A., Kataeva, I., Pei, J., Wu, H., Wiegel, J. (2011). Characterization of a novel β -xylosidase, XylC, from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 719-726.
41. Sharma, N., Sharma, N. (2017). Microbial xylanases and their industrial applications as well as future perspectives: a review. *Global Journal of Biology, Agriculture and Health Sciences*, 6, 5-12.
42. Shi, H., Li, X., Gu, H., Zhang, Y., Huang, Y., Wang, L., Wang, F. (2013). Biochemical properties of a novel thermostable and highly xylose-tolerant β -xylosidase/ α -arabinosidase from *Thermotoga thermarum*. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1-10.
43. Soni, H., Rawat, H. K., & Kango, N. (2017). Extremophilic xylanases. In *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*, (pp. 73-88). Springer, Cham.
44. Verma, A., Suthar, M. K., Doharey, P. K., Gupta, S., Yadav, S., Chauhan, P. M., Saxena, J. K. (2013). Molecular cloning and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Brugia malayi*. *Parasitology*, 140(7), 897-906.
45. Walker, J. (2002). The protein protocols. 2nd Ed. New Jersey. Humana Press. Disponible en http://www.aun.edu.eg/molecular_biology/Protein%20workshop/Protein%20Handbook.pdf
46. Xue, Y., Shao, W. (2004). Expression and characterization of a thermostable β -xylosidase from the hyperthermophile, *Thermotoga maritima*. *Biotechnology letters*, 26(19), 1511-1515.

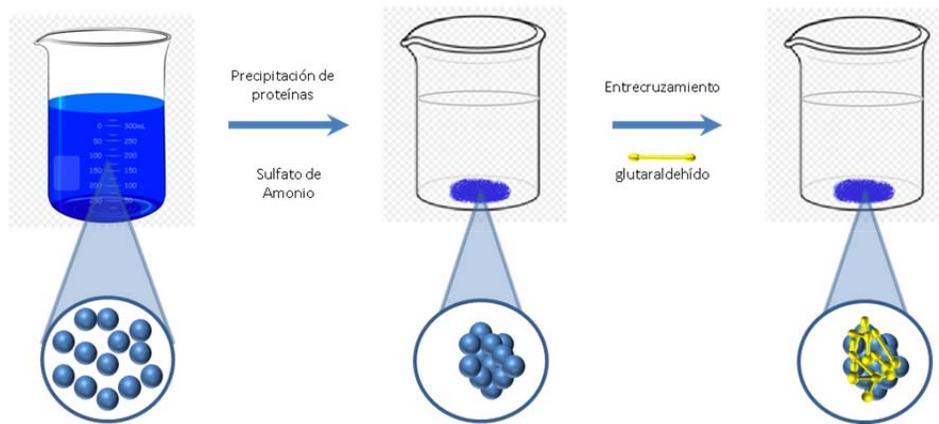
47. Ye, Y., Li, X., Zhao, J. (2017). Production and characteristics of a novel xylose-and alkali-tolerant GH 43 β -xylosidase from *Penicillium oxalicum* for promoting hemicellulose degradation. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
48. Yin, F. Y., Chen, Y. H., Yu, C. M., Pon, Y. C., Lee, H. J. (2007). Kinetic refolding barrier of guanidinium chloride denatured goose δ -crystallin leads to regular aggregate formation. *Biophysical journal*, 93(4), 1235-1245.

CAPÍTULO IV

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGREGADOS DE ENZIMA ENTRECruzADOS (CLEAS) DEL MUTANTE XYNB2^{Y509E} DE *G. STEAROTHERMOPHILUS*

Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of XynB2 mutant Y509E from G. stearothermophilus

Resumen Gráfico



RESUMEN

El mutante XynB2^{Y509E} de *G. stearothermophilus* con actividad de β -xilosidasa y xilanasas fue inmovilizado como un agregado de enzimas entrecruzado (CLEAs por sus siglas en inglés) precipitando la proteína con sulfato de amonio y promoviendo el entrecruzamiento con glutaraldehído. Los efectos del agente precipitante y del agente entrecruzante fueron caracterizados. Se encontró que un 90% de saturación con sulfato de amonio y 12,5 mM de glutaraldehído fueron las concentraciones óptimas para la formación de los CLEAs de la enzima. El entrecruzamiento se llevó a cabo durante 3 h a temperatura ambiente, y a pH 8,5 para favorecer la formación de un entrecruzado más amplio. Se recuperó una actividad de 92,3% mejorándose también las condiciones de estabilidad térmica y de pH de la enzima mutada inmovilizada frente a la enzima mutada libre. En referencia a los parámetros cinéticos se observa una ligera disminución de la constante de afinidad de la actividad de β -xilosidasa e interesantemente la inmovilización permite conservar la actividad de xilanasas desarrollada por la mutación.

INTRODUCCIÓN

La preparación de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs, cross linked enzyme aggregates) ha cobrado relevancia como una estrategia para la inmovilización enzimática, resultando una alternativa a los métodos tradicionales de inmovilización, los cuales al involucrar soportes sólidos podrían reducir la especificidad y la actividad del biocatalizador (Sheldon, 2007); además la formación de CLEAs presenta la ventaja de alta estabilidad, gran concentración de enzima y bajo costo de producción al no haber la necesidad de un soporte adicional (Sheldon *et al.*, 2006).

De manera fundamental, la inmovilización de enzimas utilizando la técnica de formación de agregados y entrecruzamiento (CLEAs), conlleva dos pasos: la precipitación de la enzima soluble y el entrecruzamiento de los agregados formados. En el primer paso, la enzima soluble pura o semipurificada es agregada por la adición de agentes precipitantes tales como sales o solventes orgánicos miscibles en agua, sin afectar la estructura terciaria de la proteína y por tanto su actividad (Talekar *et al.*, 2013). En un segundo paso, los agregados formados son químicamente entrecruzados utilizando un reactivo que permita la reacción de los grupos amino de los residuos de lisina expuestos en la superficie de la enzima. Después del entrecruzamiento químico es importante que el agregado entrecruzado permanezca insoluble, manteniendo su estructura, así como la actividad catalítica.

La β -xilosidasa de *G. stearothermophilus* (XynB2) de la familia GH52 ha sido bien caracterizada bioquímicamente y biofísicamente (Kurz *et al.*, 2014; Contreras *et al.*, 2008; Bravman *et al.*, 2003; Bravman *et al.*, 2001). Esta enzima también ha sido sometida a mutagénesis sitio-dirigida lo que ha permitido conocer los residuos catalíticos además de desarrollar actividades adicionales a las presentes en la enzima *silvestre*, por lo que es una plataforma útil para generar enzimas multifuncionales (Althuri *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2014; Ben-David *et al.*, 2007). Estas características de XynB2 de la familia GH52, la hacen un candidato de gran interés para fines industriales, sobre todo en la producción de biocombustibles de segunda generación (Vaz *et al.*, 2016; Mohamad *et al.*, 2015).

Huang *et al.* (2014), reportaron que la mutación de la tirosina 509 por un ácido glutámico en XynB2 da origen a una enzima mutada con actividad dual: la actividad natural de β -

xilosidasa más una novel actividad de xilanasa. Dado que la inmovilización posibilita el reciclaje del catalizador lo cual facilita la separación del producto de la actividad enzimática y además puede mejorar la estabilidad de la enzima a condiciones severas de pH y temperatura, este trabajo reporta la inmovilización de XynB2^{Y509E} como agregados entrecruzados y su caracterización enzimática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Sulfato de amonio y glutaraldehído 50% y otros reactivos de grado analítico fueron obtenidos de Merck y Scharlau.

Producción de XynB2^{Y509E}

La enzima XynB2^{Y509E} se obtuvo por inserción de plásmido pJAVI100 en células competentes de *E. coli* C43 (DE3). Luego de una inducción con 0,1 mM de IPTG, el crecimiento se hizo durante 18 h en medio LB a 37 °C con agitación a 200 rpm. El cultivo fue centrifugado y luego sometido a disrupción celular con tampón de lisis PBS, el lisado se llevó a centrifuga a 10000 rpm por 30 minutos. La enzima fue semipurificada por calentamiento a 45 °C durante 30 minutos y dializada contra tampón citrato-fosfato-glicina (CFG) (0,1 M; pH6,5) a 4°C toda la noche.

Ensayo β -xilosidasa

La actividad de β -xilosidasa de la enzima libre e inmovilizada se determinó a través del ensayo con 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosido (p-NPX) en una reacción a volumen final de 100 μ l, que contenía 5 μ l de enzima, 45 μ l de tampón y 50 μ l de sustrato pNPX (2,2 mM) durante 5 minutos a 50°C y pH 6,5 en tampón CFG. Luego de 5 minutos la reacción fue detenida y el color desarrollado se estabilizó por la adición de Na₂CO₃ 1M. La intensidad del color se leyó a 410 nm. Se preparó una curva estándar usando p-nitrofenol. Una unidad de enzima fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto y la actividad específica fue definida como unidades por mL de proteína. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Ensayo Xilanasa

La actividad de xilanasas de la enzima libre e inmovilizada fue medida a través de la cuantificación de los azúcares reductores, usando el método del ácido 3,5-dinitro salicílico (Miller, 1959). 50 µl de la enzima libre fueron incubados con 50 µl de xilano de abedul preparado al 1% en tampón CFG 0,1M pH 6,5. La reacción se dejó transcurrir con agitación durante 30 minutos a 50°C. Finalizado el tiempo se agregaron 100 µl de reactivo DNS y los tubos fueron calentados a 100°C durante 15 minutos. La reacción se diluyó en 400 µl de agua y se leyó a 540 nm. Para el CLEAs se ajustó el tiempo de incubación enzima-sustrato hasta 1 h, considerando que las interacciones enzima sustrato podrían ser ligeramente diferentes debido a la inmovilización. Una unidad de actividad de xilanasas fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de xilosa por minuto bajo las condiciones del ensayo (50 °C, tampón CFG 0,1M; pH 6,5)

Preparación del CLEA

4 mL de enzima semipurificada fueron precipitados con sulfato de amonio hasta una saturación de 90%. Luego de 30 minutos de agitación con barra magnética se añadió glutaraldehído lentamente en una concentración final de 12,5 mM. La reacción de entrecruzamiento se mantuvo durante 3 h a 25 °C, luego de las cuales la suspensión fue centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C. El CLEAs fue recuperado como un precipitado insoluble y se lavó 3 veces con 2mL de tampón CFG 0,1M pH 6,5 para eliminar el glutaraldehído sobrante y la enzima no ligada. Se reservó en cada paso el sobrenadante y las aguas del lavado para su posterior análisis. El inmovilizado se resuspendió en 4 mL de tampón CFG (0,1M, pH6,5). La actividad recuperada del CLEA fue calculada como se muestra a continuación:

Ecuación 2

$$\text{Actividad recuperada (\%)} = \left(\frac{\text{Actividad total del CLEA}}{\text{Actividad total de la enzima soluble}} \right) * 100$$

Optimización en la preparación del CLEA

Se probó el efecto de varios agentes precipitantes: Acetona, Butanol y Sulfato de amonio. Se ensayó la precipitación con distintas saturaciones de sulfato de amonio 70, 80 y 90%. El tiempo de precipitación hasta obtener la precipitación completa de la proteína de interés fue

ensayado a 30, 60 y 120 minutos sin diferencias significativas entre los procedimientos y el porcentaje de precipitación. Diferentes concentraciones de glutaraldehído como agente entrecruzante (12,5; 25 y 40 mM) y del tiempo de reacción de entrecruzamiento (2 y 3 h) también fueron estudiadas con la finalidad de obtener las condiciones óptimas de preparación del agregado entrecruzado.

Efecto de la temperatura

Para determinar la temperatura óptima de la enzima mutada soluble y en forma de CLEA, se llevó a cabo la actividad a diferentes temperaturas dentro del rango 40 y 80°C, sobre p-nitroxilopiranosido 2,2 mM a pH 6,5.

Estabilidad térmica de la enzima libre e inmovilizada

Se investigó preincubando la enzima mutada soluble y en forma de CLEA a diferentes temperaturas (40-95°C) durante 120 minutos. Seguidamente, se llevó a cabo la actividad enzimática bajo la condición estándar de actividad. El porcentaje de actividad residual se determinó a cada una de las temperaturas estudiadas.

Efecto del pH

El pH óptimo de la enzima soluble e inmovilizada fue determinado por la reacción con sustrato p-NPX (2,2mM) preparado en tampón CFG ajustado en un amplio rango de valores de pH desde 4,3 hasta 11. El efecto del pH sobre la estabilidad de las enzimas soluble y agregada fue probado incubando la enzima hasta 1 h en tampones preparados en un rango de valores de pH entre 4,3 y 11 y midiendo la actividad de β -xilosidasa según las condiciones estándar ya descritas.

Parámetros cinéticos de XynB2^{Y509E} libre e inmovilizada

Se estimaron por la medición de las velocidades iniciales utilizando diferentes concentraciones de sustrato p-NPX en el rango de 0,22 y 2,2 mM en tampón CFG (0,1 M a pH 6,5) a 50 °C por 5 min. Los valores de K_M y V_{max} fueron calculados a partir del ajuste hiperbólico entre las concentraciones de sustrato y las velocidades iniciales utilizando el programa Origin 8.0.

Reusabilidad del CLEA de XynB2^{Y509E}

La reusabilidad de la enzima agregada fue evaluada por la actividad repetida del agregado. La enzima inmovilizada (5 μ l) fue incubada con el sustrato por 5 minutos a 50 °C, el tubo

se enfrió rápidamente para detener la reacción y se sometió a centrifugación durante 3 minutos a 6000 rpm, se extrajo el sobrenadante para continuar la reacción según las condiciones descritas previamente y la enzima fue lavada 3 veces con tampón CFG (0,1M pH 6,5) para un nuevo ciclo de uso. El porcentaje de actividad residual fue calculado en referencia al primer ciclo.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Preparación de los CLEAs de XynB2^{Y509E} de G. stearothermophilus

El procedimiento de síntesis del CLEA inicia con la formación y precipitación de los agregados de proteínas, causada por diversos agentes precipitantes tales como solventes, sales, entre otros, sin alteración de la estructura terciaria. La formación de estos agregados ocurre por cambios en los estados de hidratación de las moléculas o alteración de las fuerzas electrostáticas en la solución. Luego, los agregados son transformados en una estructura más estable utilizando un agente entrecruzante, que establece enlaces covalentes entre moléculas de proteínas, lo que hace que sea insoluble (Sheldon, 2007).

Para la preparación de los agregados (precipitación de la proteína) se utilizó butanol, acetona y sulfato de amonio, todos hasta lograr una saturación del 80% (Figura 25a). Para la elección del agente precipitante se consideró la homogeneidad del precipitado y su recuperación. A pesar de que la precipitación con butanol fue efectiva, el precipitado quedó suspendido en una fase impidiendo su limpia y completa recuperación. El precipitado obtenido con acetona fue más limpio y fácil de recuperar que el obtenido con butanol, sin embargo, la enzima perdió actividad. La precipitación obtenida con sulfato de amonio fue homogénea y fácil de recuperar rindiendo además una enzima activa por lo que se decidió utilizar esta sal como agente precipitante. Para garantizar la precipitación completa de la proteína se incrementó la saturación final de sulfato de amonio al 90%.

Dado que el tiempo durante la fase de precipitación juega un papel fundamental en la recuperación de la actividad (Talekar *et al.*, 2013), también se evaluó el efecto del tiempo de agregación (Figura 25b). Para ello el proceso de agregación se llevó a cabo durante 30, 60 y 120 minutos. La eficiencia de estos procedimientos se midió por la cantidad de proteína y un ensayo de actividad de β -xilosidasa en el sobrenadante luego de la

precipitación. Se piensa que cuando el proceso de precipitación es lento, la enzima puede desnaturalizarse, mientras que si sucede rápidamente las moléculas chocan agregándose, existiendo mayor probabilidad de preservar la estructura terciaria. Otro factor que considerar en esta fase es la pureza de la proteína; algunos protocolos recomiendan agregar BSA para promover la agregación (Bibi *et al.*, 2015), sin embargo, la posibilidad de utilizar el extracto enzimático semipurificado por calentamiento fue suficiente para conseguir un buen agregado.

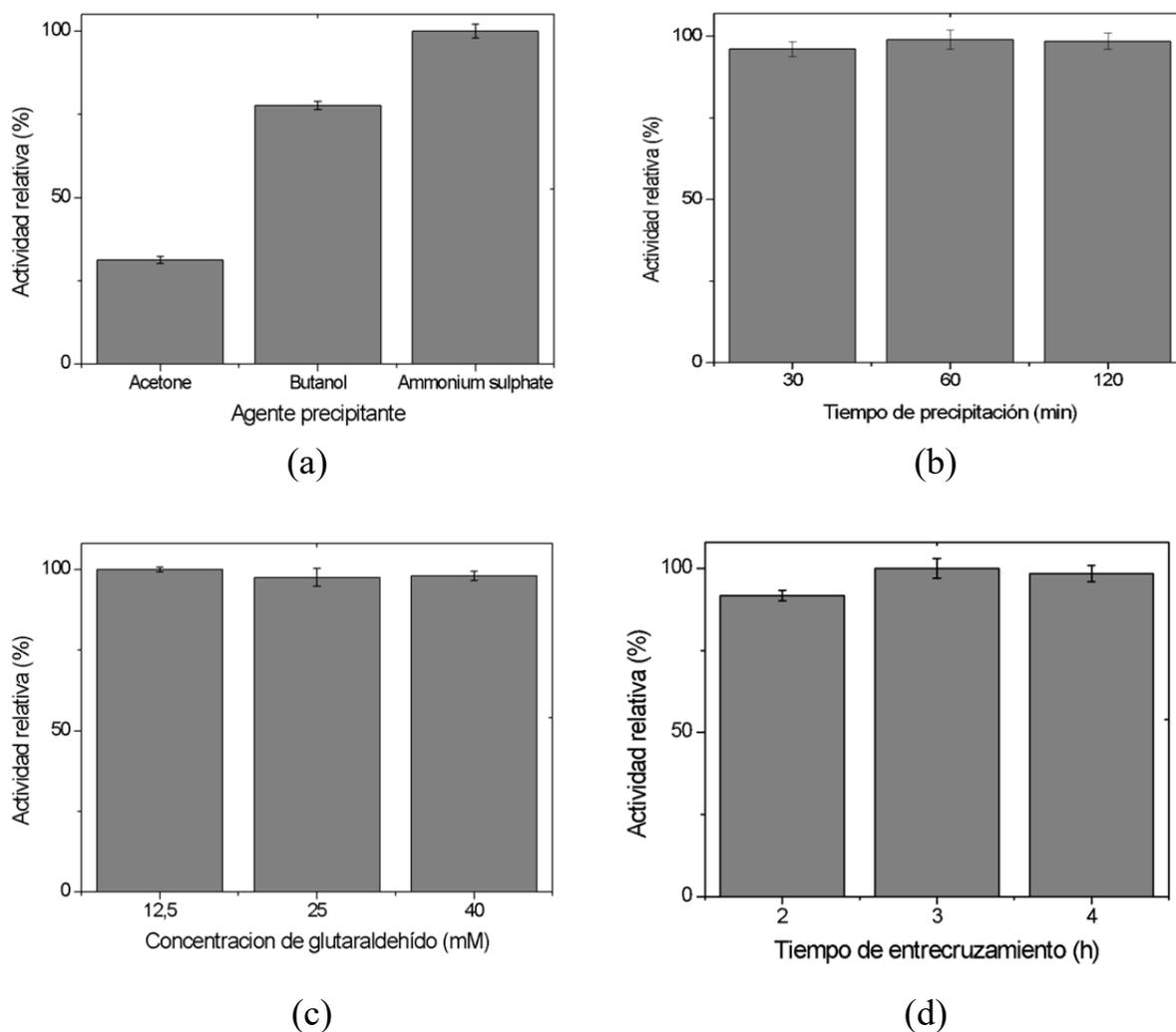


Figura 25. *a.* Precipitación de XynB2Y^{509E} con diferentes agentes precipitantes; *b.* Precipitación de XynB2Y^{509E} a diferentes tiempos usando sulfato de amonio al 90%; *c.*

Concentración de glutaraldehído para la reacción de entrecruzamiento; d. Tiempo de entrecruzamiento usando 12.5 mM de glutaraldehído. Todos los valores son el resultado de medias de 3 replicados y las barras de error representan el error estándar

En la etapa de entrecruzamiento con glutaraldehído, es decir en la reacción entre grupos amino desprotonados expuestos de los residuos de lisina de la superficie de la enzima y los grupos aldehídicos del entrecruzante, se evaluaron además de distintas concentraciones (12,5; 25 y 40 mM) (Figura 25c), diferentes tiempos de entrecruzamiento (2, 3 y 4h) (Figura 25d), así como condiciones de pH y temperatura durante la reacción. Con relación al pH se conoce que a valores de pH ácido el glutaraldehído está en su forma monomérica (Barbosa *et al.*, 2014), lo que produce un CLEA más compacto, mientras que a pH más alcalino se forman polímeros más grandes, con más espacio entre los agregados. Al ser XynB2^{Y509E} una enzima que tras la mutación desarrolló una actividad de β -xilosidasa y de xilanasas (Huang *et al.*, 2014), era importante considerar estas condiciones. Los primeros ensayos se realizaron sin ajustar el pH de la reacción con la concomitante pérdida de la actividad xilanasas. Por ello se planteó llevar a cabo el entrecruzamiento a pH de 8,5. La figura 26 muestra la microfotografía electrónica por barrido (SEM, por sus siglas en inglés) de los CLEAS de XynB2^{Y509E}, preparados a 2 diferentes valores de pH. La figura 26a muestra el agregado preparado a pH 6,5, con una superficie más densa, mientras que el agregado preparado a pH 8,5 (Figura 26b) se presenta como una estructura con más cavidades. En ambas condiciones las moléculas de la enzima se agregaron como esferas y de forma similar a las descritas por Schoevaart *et al.*, (2004).

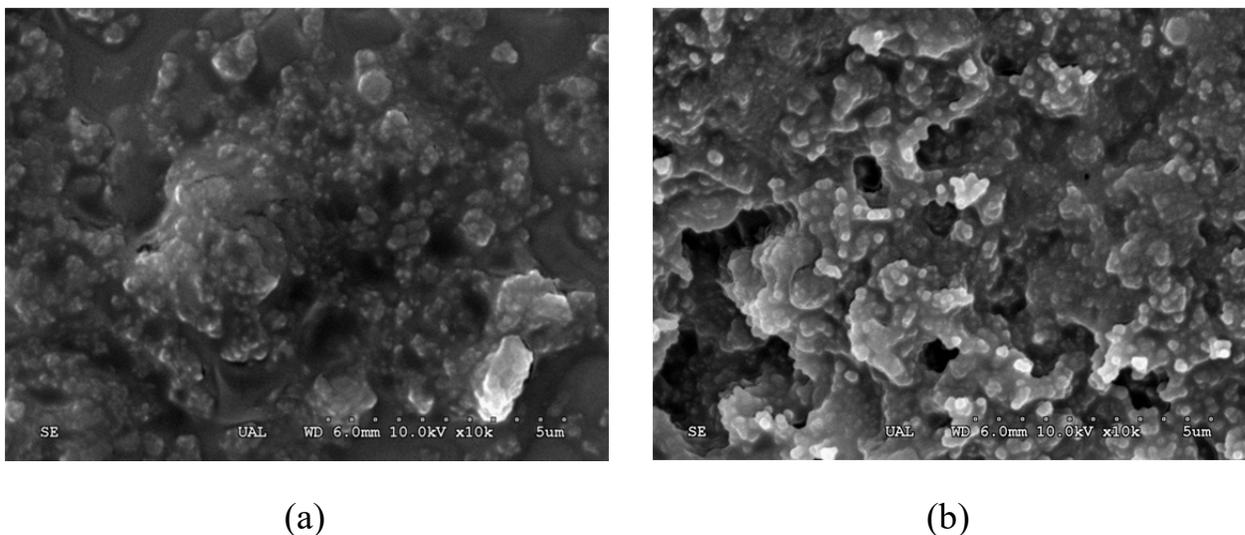


Figura 26. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los agregados entrecruzados de XynB^{Y509E}, preparados a pH 6,5 (a) y pH 8,5 (b).

A pH 6,5, el tamaño de los microagregados es mucho más pequeño (75 % menos), lo que sugiere que el valor de pH influye en la morfología y tamaño de los agregados. En estas condiciones se observa pérdida de la actividad xilanasa, lo que puede ser atribuido a problemas difusionales con la estructura supramolecular (Rojas *et al.*, 2019). A pH 8,5 se observa actividad de xilanasa, que puede explicarse por el incremento del tamaño del poro del agregado formado en esas condiciones. En resumen, las condiciones óptimas para la preparación de los agregados entrecruzados de XynB2^{Y509E} fueron la precipitación con saturación al 90% de sulfato de amonio por 30 minutos y entrecruzamiento utilizando una concentración de 12,5 µM de glutaraldehído a pH 8,5 durante 3 h. El rendimiento de la agregación bajo estas condiciones fue de 87,3%, lo que permite concluir que el proceso de entrecruzamiento fue efectivo y que permite altos valores de recuperación de la actividad enzimática.

Caracterización bioquímica de XynB2^{Y509E} libre e inmovilizada en CLEAs

Efecto del tiempo de reacción sobre la actividad xilanolítica

Para determinar el tiempo óptimo de reacción de las dos actividades enzimáticas ensayadas, se desarrollaron ensayos variando el tiempo de la incubación enzima sustrato. Para la actividad xilanasa se ensayó entre 30 y 180 minutos (Figura 27a) también fue necesario ajustar el tiempo de reacción de la actividad de xilanasa, el cual se vio incrementado de 30 min (enzima soluble) a 1 h (enzima en CLEA). El aumento en el tiempo de reacción para enzimas inmovilizadas respecto a su forma libre también se ha observado en otras enzimas inmovilizadas (Rodrigues *et al.*, 2013). La inmovilización de una xilanasa por atrapamiento en perlas de alginato originó que el tiempo de reacción se incrementara de 5 a 60 minutos (Bibi *et al.*, 2015). Este aumento en el tiempo de reacción podría deberse a que el sustrato requiere más tiempo para penetrar la trama del entrecruzado y poder tener acceso al sitio activo, de allí que la agitación sea un factor fundamental para favorecer la interacción CLEA-sustrato.

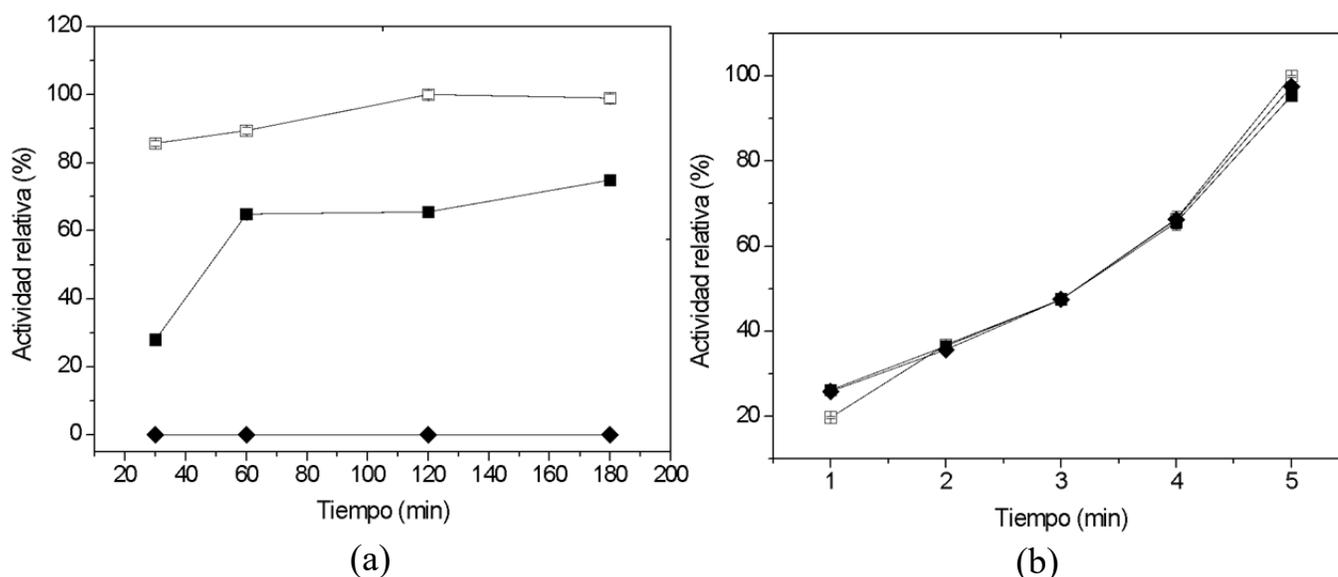


Figura 27. Efecto del tiempo de reacción sobre la actividad de xilanasa (a) y sobre la actividad β -xilosidasa (b), mostrada por la forma soluble (□), y la enzima inmovilizada como CLEA preparada a pH 6,5 (◆) y pH 8,5 (■). Concentraciones de sustrato: Xilano de abedul 1%; p-NPX (2,2 mM).

Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad y la estabilidad

El efecto de la temperatura sobre la actividad β -xilosidasa de XynB2^{Y509E} libre e inmovilizada se muestra en la Figura 28a. La temperatura máxima de reacción para las enzimas libres e inmovilizada es de 65 °C, sin embargo, la enzima inmovilizada es activa a un mayor rango de temperatura. Por ejemplo, a 75 °C la actividad residual de la enzima libre es de un 80% respecto al 90% que exhibe la inmovilizada. A 80 °C, la actividad residual de la inmovilizada es también mayor a la actividad de la enzima libre sugiriendo que la inmovilización protege a la enzima de la pérdida de su actividad por la temperatura. Similares resultados han sido reportados para otras enzimas, considerando la estabilidad operacional del agregado una de las principales razones para utilizar este tipo de inmovilización (Verma *et al.*, 2019).

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las dos formas de la enzima, libre y agregada, fue evaluado tras 1 h de incubación a distintas temperaturas en un rango entre 30 y 90 °C. Se observa (Figura 28b) que la preincubación a 50 °C de la enzima libre conlleva a una pérdida del 20% de su actividad relativa mientras que la enzima inmovilizada mantiene el 100% de actividad. Además, XynB2^{Y509E} retiene más del 75% de su actividad luego de ser incubada 1 h a 70 °C. Estas mejoras en la termoestabilidad de enzimas inmovilizadas en agregados entrecruzados ya han sido reportadas (Vrsanska *et al.*, 2018; Hormigo *et al.*, 2012), La estabilidad del agregado podría estar relacionada con la rigidez de la estructura lo que produce una desnaturalización más lenta por efecto de la temperatura; los enlaces covalentes formados entre los agregados enzimáticos debido al entrecruzamiento también podrían jugar un rol importante para la termoestabilidad.

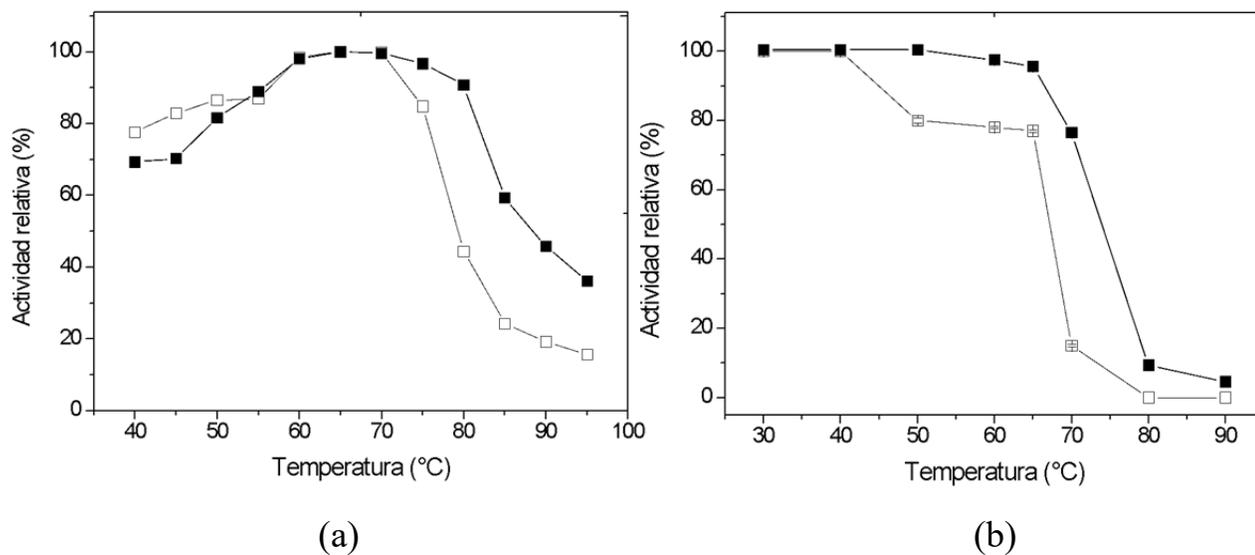


Figura 28. Efecto de la temperatura sobre la actividad de β -xilosidasa y estabilidad de $XynB2^{Y509E}$ libre e inmovilizada en CLEAs. (a) Efecto de la temperatura sobre la actividad de $XynB2^{Y509E}$ libre (□) e inmovilizada en CLEAs (■); las reacciones fueron desarrolladas en tampón CFG (0,1 M, pH 6,5) usando el ensayo cromogénico descrito en la sección de métodos. La actividad relativa fue referida en relación a la actividad más alta. (b) Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de $XynB2^{Y509E}$ libre (□) e inmovilizada en CLEAs (■); las reacciones se ensayaron a 50 °C después de que la enzima fuera incubada durante 1 h a la temperatura indicada. La actividad inicial, previa incubación, fue considerada como el 100%, usando las condiciones estándar descritas.

pH óptimo y estabilidad a valores de pH

Se investigó un amplio rango de valores de pH para determinar el pH máximo de la reacción catalizada por la enzima libre e inmovilizada. El entrecruzamiento no afecta el valor de pH óptimo ya que fue de 6,5 para ambas formas (Figura 29a). La inmovilización parece proteger a la enzima frente al pH ya que a pH 8.5 la enzima inmovilizada mantiene un 40% de su actividad, es decir más de un 10% de aumento respecto al valor para la enzima libre. La figura 29b muestra el efecto del pH sobre la estabilidad química de la proteína. Este gráfico pone en evidencia que la inmovilización hace que la enzima sea más

estable frente a valores extremos de pH; a pH igual a 9 la enzima inmovilizada posee un 60% de actividad mientras que la libre solo exhibe un 40% de actividad. Esta mayor tolerancia del agregado a valores básicos pudiera ser el reflejo de la estabilidad que confiere el entrecruzamiento a la proteína, evitando su desnaturalización.

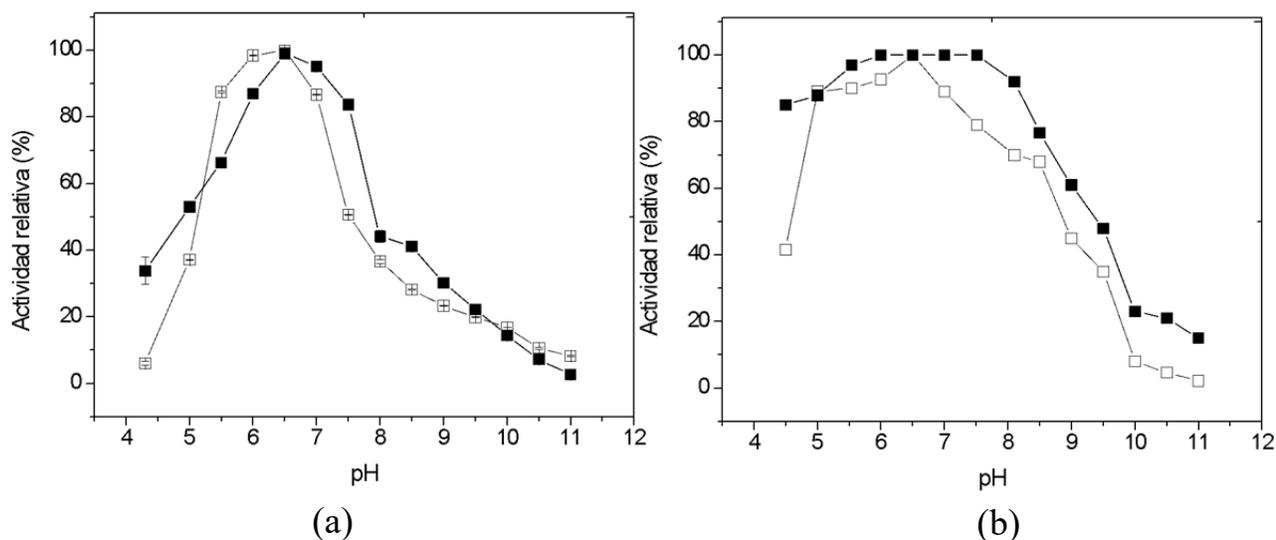


Figura 29. Efecto del pH sobre la actividad β -xilosidasa y estabilidad de $XynB2^{Y509E}$ libre e inmovilizada en CLEAs. (a) Efecto del pH sobre la actividad de $XynB2^{Y509E}$ libre (\square) e inmovilizada en CLEAs (\blacksquare); las reacciones fueron desarrolladas en tampón CFG (0,1 M, pH 6,5) usando el ensayo cromogénico descrito en la sección de métodos. La actividad relativa fue referida en relación a la actividad mas alta. (b) Efecto del pH sobre la estabilidad de $XynB2^{Y509E}$ libre (\square) e inmovilizada en CLEAs (\blacksquare); las reacciones se ensayaron a 50°C después de que la enzima fuera incubada durante 1 h al valor de pH indicado. La actividad inicial, previa incubación, fue considerada como el 100%, usando las condiciones estándar descritas.

De los ensayos de estabilidad a pH y temperatura se puede concluir que la estabilidad de la β -xilosidasa puede ser mejorada a través de la inmovilización utilizando la técnica de agregados entrecruzados.

Parámetros cinéticos para $XynB2^{Y509E}$ libre e inmovilizada en CLEAs

Los parámetros cinéticos para la actividad de β -xilosidasa de $XynB2^{Y509E}$ libre e inmovilizada fueron determinados calculando las velocidades iniciales a diferentes concentraciones de p-NPX, utilizado como sustrato. Se observó que los parámetros

cinéticos de ambas formas de la enzima pueden ser descritos bajo el modelo de Michaelis-Menten. Se observa un ligero aumento en el valor de K_M en la enzima inmovilizada en comparación con la enzima soluble (Tabla 5), mientras que V_{MAX} disminuye ligeramente. Esto se interpreta como una disminución de la afinidad de la enzima inmovilizada por el sustrato y que podría explicarse por una dificultad para acceder al sitio activo, lo que coincide con el cambio de reactividad observado para la actividad de xilanasa.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de la actividad hidrolítica sobre *p*-NPX de XynB2^{Y509E} libre e inmovilizada por entrecruzamiento, calculados mediante el ajuste hiperbólico de Michaelis-Menten

Parámetros	K_M (mM)	V_{max} (nmol*min ⁻¹)
<i>Enzima Libre</i>	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,2
<i>CLEA</i>	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,1

La actividad fue ensayada en tampón CFG (0,1M, pH 6,5) a 50 °C

Resultados similares han sido obtenidos en otros estudios para enzimas inmovilizadas en CLEAs (Xu *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2010), en los que se han reportado ligeros cambios en las propiedades cinéticas de las enzimas durante el proceso de inmovilización.

Reusabilidad

Una de las mayores ventajas de las enzimas inmovilizadas es la reusabilidad, que permite reducir los costos a través de disminuir la cantidad de enzima libre utilizada durante el proceso de biotransformación en el que se esté aplicando, en la escala industrial. La reusabilidad del CLEA de XynB2^{Y509E} fue evaluada por usos consecutivos en ciclos de ensayos. Como se muestra en la figura 30, la enzima mantiene un alto porcentaje de actividad hasta 5 ciclos de reutilización con una pérdida del 40% para el décimo ciclo, lo que podría ser atribuido a razones mecánicas que inevitablemente ocurren durante el pipeteo, al separar el sobrenadante del CLEA sólido, antes de proceder al lavado, entre otros. Estos resultados sugieren que el CLEA de XynB2^{Y509E} mantiene una buena

estabilidad operacional, sin embargo, es necesario evaluar esta actividad en otros sustratos (p.e. xilano) en orden de tener una visión más amplia de su utilidad en procesos industriales.

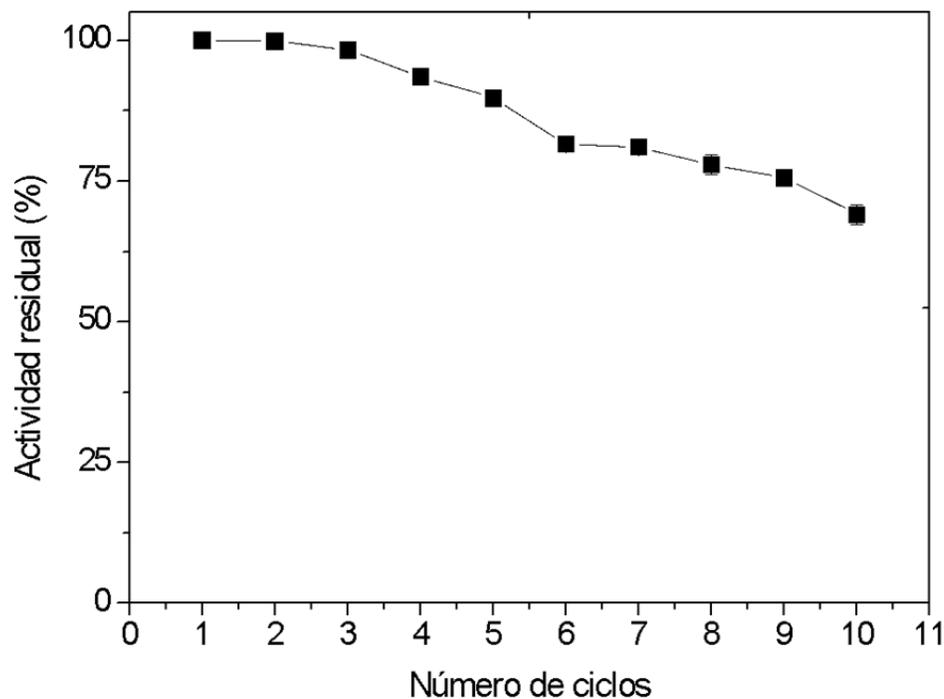


Figura 30. Reusabilidad de los CLEAs de *XynB2*^{Y509E}

CONCLUSIONES

La inmovilización de la β -xilosidasa recombinante de *G. stearothermophilus* *XynB2*^{Y509E} como agregado enzimático entrecruzado (CLEA) se desarrolló de manera exitosa, logrando la preservación de la actividad dual producida por la mutación. El agregado sintetizado en las condiciones descritas presenta mayor estabilidad térmica y química, así como mayor estabilidad operacional en comparación con la forma libre.

REFERENCIAS

1. Althuri, A., Chintagunta, A., Sherpa, K., Rajak, R., Kundu, D., Singh, J., Rastogi, A., Banerjee, R. (2017). Microbial enzymes and lignocellulosic fuel production. En Arindam Kuila and Vinay Sharma (eds.) *Lignocellulosic Biomass Production and Industrial Applications*, (135–170). Scrivener Publishing LLC.
2. Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., Fernandez-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *Rsc Advances*, 4(4), 1583-1600.
3. Ben-David, A., Bravman, T., Balazs, Y. S., Czjzek, M., Schomburg, D., Shoham, G., Shoham, Y. (2007). Glycosynthase activity of *Geobacillus stearothermophilus* GH52 β -xylosidase: efficient synthesis of xylooligosaccharides from α -D-xylopyranosyl fluoride through a conjugated reaction. *Chembiochem*, 8(17), 2145-2151.
4. Bibi, Z., Qader, S. A. U., Aman, A. (2015). Calcium alginate matrix increases the stability and recycling capability of immobilized endo- β -1,4-xylanase from *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29. *Extremophiles*, 19(4), 819–827. doi:10.1007/s00792-015-0757-y
5. Bravman, T., Zolotnitsky, G., Belakhov, V., Shoham, G., Henrissat, B., Baasov, T., Shoham, Y. (2003). Detailed kinetic analysis of a family 52 glycoside hydrolase: a β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Biochemistry*, 42(35), 10528-10536.
6. Bravman, T., Zolotnitsky, G., Shulami, S., Belakhov, V., Solomon, D., Baasov, T., ... & Shoham, Y. (2001). Stereochemistry of family 52 glycosyl hydrolases: a β -xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6 is a retaining enzyme. *FEBS letters*, 495(1-2), 39-43.
7. Contreras, L. M., Gómez, J., Prieto, J., Clemente-Jiménez, J. M., Las Heras-Vázquez, F. J., Rodríguez-Vico, F., ... & Neira, J. L. (2008). The family 52 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* is a dimer: Structural and biophysical characterization of a glycoside hydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(12), 1924-1934.
8. Dong, T., Zhao, L., Huang, Y., Tan, X. (2010). Preparation of cross-linked aggregates of aminoacylase from *Aspergillus melleus* by using bovine serum albumin as an inert additive. *Bioresource technology*, 101(16), 6569-6571.
9. Hormigo, D., García-Hidalgo, J., Acebal, C., de la Mata, I., Arroyo, M. (2012). Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of recombinant poly-3-hydroxybutyrate depolymerase from *Streptomyces exfoliatus*. *Bioresource Technology*, 115, 177-182.
10. Huang, Z., Liu, X., Zhang, S., Liu, Z. (2014). GH52 xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*: characterization and introduction of xylanase activity by site-directed mutagenesis of Tyr509. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(1), 65-74.

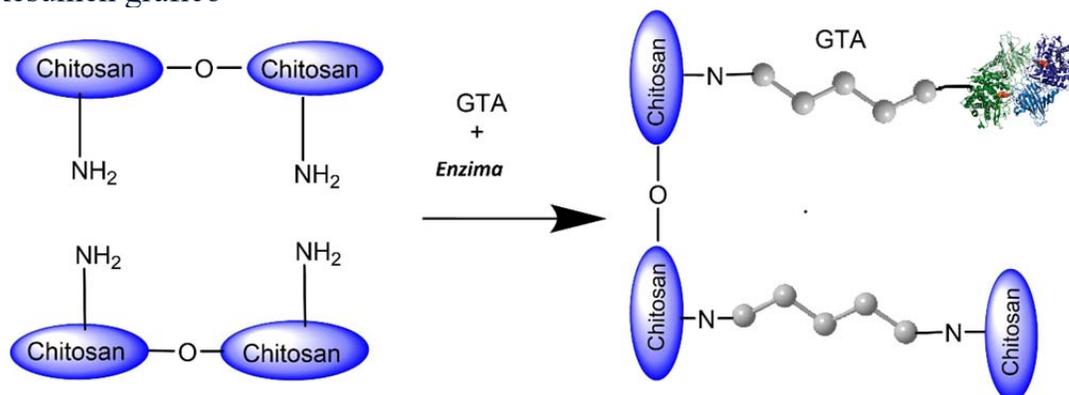
11. Kurz, L., García, V., Wilkesman, J., & Contreras, L. M. (2014). Enzymatic characterization of the recombinant beta-xylosidase XynB2. *Journal of Medical and biological sciences*, 14-19.
12. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
13. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205-220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
14. Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6290-6307.
15. Rojas, M. J., Amaral-Fonseca, M., Zanin, G. M., Fernandez-Lafuente, R., Giordano, R. D. L. C., Tardioli, P. W. (2019). Preparation of crosslinked enzyme aggregates of a thermostable cyclodextrin glucosyltransferase from *Thermoanaerobacter sp.* Critical effect of the crosslinking agent. *Catalysts*, 9(2), 120.
16. Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A. P. G., Van Rantwijk, F., ... & Sheldon, R. A. (2004). Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and bioengineering*, 87(6), 754-762.
17. Sheldon, R. A. (2007). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*, 35(6), 1583–1587, (2007). doi:10.1042/bst0351583
18. Sheldon, R. A., Schoevaart, R., & van Langen, L. M. (2006). Cross-Linked Enzyme Aggregates. *Methods in Biotechnology™*, 31–45. doi:10.1007/978-1-59745-053-9_3
19. Talekar, S., Joshi, A., Joshi, G., Kamat, P., Haripurkar, R., Kambale, S. (2013). Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). *RSC Advances*, 3(31), 12485. doi:10.1039/c3ra40818c
20. Van Pelt, S., Quignard, S., Kubáč, D., Sorokin, D. Y., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. (2008). Nitrile hydratase CLEAs: the immobilization and stabilization of an industrially important enzyme. *Green chemistry*, 10(4), 395-400.
21. Vaz, R. P., de Souza Moreira, L. R., Ferreira Filho, E. X. (2016). An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.08.006>
22. Verma, R., Kumar, A., Kumar, S. (2019). Synthesis and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of thermostable xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* X1. *Process biochemistry*, 80, 72-79.
23. Vršanská, M., Voběrková, S., Jimenez Jimenez, A. M., Strmiska, V., Adam, V. (2018). Preparation and optimisation of cross-linked enzyme aggregates using native isolate white rot fungi *Trametes versicolor* and *Fomes fomentarius* for the decolourisation of synthetic dyes. *International journal of environmental research and public health*, 15(1), 23.

24. Xu, D. Y., Yang, Y., Yang, Z. (2011). Activity and stability of cross-linked tyrosinase aggregates in aqueous and nonaqueous media. *Journal of Biotechnology*, 152(1-2), 30-36.

CAPÍTULO V

SOPORTES DE QUITOSANO PARA LA INMOVILIZACIÓN DE XYNB2^{Y509E} POR ATRAPAMIENTO Y POR FORMACIÓN DE ENLACES COVALENTES

Resumen gráfico



RESUMEN

Entre los soportes más utilizados para la inmovilización de enzimas se encuentra el quitosano, un polisacárido obtenido por desacetilación de la quitina. La β -xilosidasa de *G. stearothermophilus* ha sido caracterizada en condiciones óptimas y de máxima actividad y se ha descrito que la mutación Y509E resulta en el desarrollo de una actividad dual. Previamente, nuestro grupo ha reportado que la inmovilización del mutante XynB2^{Y509E} como CLEA's mejora su estabilidad operacional. Inmovilizar enzimas con actividad dual y preservar su función representa un reto dados los potenciales beneficios que reportaría para el sector industrial la degradación de la cadena principal del xilano utilizando solo una enzima. En ese sentido este trabajo tuvo por finalidad inmovilizar el mutante XynB2^{Y509E} en esferas de quitosano, por atrapamiento y por formación de enlaces covalentes. En la inmovilización por atrapamiento, el gel de quitosano en solución ácida homogeneizado con la proteína se agregó por goteo para formar esferas que se maduraron por 1 h. En la inmovilización por formación de enlaces covalentes, se formaron esferas solo de quitosano que se reforzaron con glutaraldehído durante 4 h en agitación, para la posterior inmovilización. En la inmovilización por atrapamiento se observó pérdida de la actividad de xilanasas y se encontró que la concentración de quitosano afecta la eficiencia del proceso, además, el tiempo de maduración de las esferas y el pH alcalino para precipitar las esferas mixtas afectan la actividad de β -xilosidasa de la enzima. En la inmovilización por enlaces

covalentes se encontró que el pH en la modificación con glutaraldehído y la unión de la proteína fueron los factores claves en la preservación de la actividad dual. La enzima inmovilizada por cualquiera de las dos estrategias mostró mejor estabilidad térmica y química que la enzima libre sugiriendo que la inmovilización protege a la enzima de la pérdida de su actividad. Respecto a la cinética de la reacción, aunque ambas formas de la enzima inmovilizada siguen el modelo de Michaelis-Menten, la K_M aparente fue mayor a la de la enzima libre. Finalmente, la enzima inmovilizada por enlace covalente exhibió la mejor estabilidad operacional preservando más del 80% de la actividad después de 2 meses a 4°C y sin perder su actividad tras 10 ciclos de reutilización

INTRODUCCIÓN

El uso de enzimas para catalizar biotransformaciones representa una alternativa deseable en el marco de condiciones más amigables con el ambiente, sin embargo, en su forma libre, no siempre son la mejor opción (Cipolatti *et al.*, 2019). La razón es que, en comparación con los catalizadores químicos, el uso de enzimas puede elevar el costo de un proceso industrial. En ese sentido las formas enzimáticas reutilizables cobran relevancia y son utilizadas cada vez con mayor frecuencia (Mohamad *et al.*, 2015). En este escenario, la inmovilización resulta una alternativa deseable ya que, de manera general, suele ir acompañada de mayor estabilidad operativa de la enzima; en muchos casos también la enzima inmovilizada mejora notablemente el rango de pH y temperatura en las que puede ser utilizada, lo que unido a la posibilidad de reutilizar el catalizador, incrementan la viabilidad económica para su uso como biocatalizadores, representando una alternativa en la transición de procesos industriales hacia la química verde (Sheldon, 2016).

La inmovilización de proteínas juega un papel importante en diversas áreas. En ciencias de la vida y medicina, forma la base de muchas aplicaciones, como biosensores, implantes biomédicos, biocatalizadores reciclables y matrices de proteínas para la detección de drogas, que implican la interacción proteína-proteína o proteína-ligando (Meldal & Schoffelen, 2016). En la industria química y de alimentos, juega también un rol fundamental, en el que la razón principal para la inmovilización y más reciente co-inmovilización, es la reutilización o el uso de manera continuada dentro de los reactores del proceso (Arana-Peña *et al.*, 2020; Guisan, 2013).

Los métodos ensayados para la inmovilización de enzimas pueden ser químicos y físico-químicos (Sheldon & Van Pelt, 2013) y su elección dependerá de la naturaleza del soporte,

de la enzima y de la aplicación y uso de la misma (Rehm *et al.*, 2016). Las enzimas pueden ser inmovilizadas sobre soportes naturales y/o sintéticos, por medios químicos (uniéndolas a soportes mediante enlaces covalentes) o físicos (fuerzas electrostáticas, iónicas, membranas); pueden ser adsorbidas y también atrapadas /encapsuladas en algún material a través de la adición de agentes que formen una película protectora alrededor de la enzima inmovilizada, permitiendo el paso selectivo de reactivos y productos de pequeño tamaño (Rehm *et al.*, 2016).

El método de adsorción que implica la formación de enlaces iónicos se basa en interacciones proteína – ligando. Es un método sencillo y reversible, pero es difícil hallar las condiciones bajo las cuales la enzima mantenga la fortaleza de la unión además de la actividad (Brena *et al.*, 2006). Por otro lado, el atrapamiento de enzimas en el interior de geles microporosos que se forman en presencia de la enzima, que no permite la salida de las enzimas desde la estructura microporosa, pero si permiten la entrada y salida de sustratos y productos, se ha probado con éxito en la industria farmacéutica y otros procesos químicos y se sabe que favorece la estabilidad mecánica del biocatalizador (Ali *et al.*, 2017; Guisan, 2012). En el caso de la inmovilización por enlaces covalentes, la interacción de los residuos aminoacídicos y otros grupos funcionales de las diferentes cadenas laterales favorece la unión con el material de soporte (Graebin *et al.*, 2016). Se ha reportado la inmovilización de enzimas por enlaces covalentes utilizando soportes de sílica mesoporosa y quitosano, con el resultado de mejoras en el tiempo de vida y la estabilidad térmica de la enzima (Ali *et al.*, 2017).

En este orden de ideas, uno de los soportes más utilizados para la inmovilización de biocatalizadores es el quitosano, un polisacárido de polimerización catiónica de cadena lineal alcalina natural, que es elaborado a partir de quitina después de la eliminación de más de la mitad del grupo acetilo (Bakshi *et al.*, 2020). Químicamente denominado poli (1,4) -2-amino-2-desoxi- β -D-glucano, el quitosano es insoluble en agua, pero en la mayoría de los ácidos orgánicos, el grupo amino en la cadena molecular se convierte en ion amonio, permitiendo la solubilidad en forma de gel que precipita una vez que se incrementa el pH, por la formación de complejos insolubles en agua. De esta manera, el gel forma esferas, membranas, cápsulas, fibras, entre otros, que pueden ser modificadas con tratamientos que

mejoran la estabilidad y la durabilidad. Tiene las ventajas de ser biocompatible, biodegradable, no tóxico, no antigénico, de fácil obtención, bajo costo, entre otros, al mismo tiempo tiene características únicas de estructura molecular, propiedades químicas y biológicas (Nunes *et al.*, 2021).

Las enzimas con potencial aplicación en procesos de aprovechamiento de biomasa, adquieren importancia en la promoción del uso de fuentes de energía limpia y renovable (Corradini *et al.*, 2021; De Canio *et al.*, 2011). Tal es el caso de la β -xilosidasa de *G. stearothermophilus* la cual ha sido caracterizada en condiciones óptimas (Contreras *et al.*, 2008; Bravman *et al.*, 2001; 2003), de máxima actividad (Kurz *et al.*, 2014) sobreexpresada exitosamente por tecnología recombinante y que además ha sido sometida a procesos de mutagénesis sitio-dirigida (Bravman *et al.*, 2001;) en los que el resultado ha sido una enzima con actividad de transglicosidasa (Ben David *et al.*, 2007) y de xilanasas (Huang *et al.*, 2014). Estas características de XynB2 de *G. stearothermophilus*, la hacen un candidato de gran interés para fines industriales (Hong *et al.*, 2018). El mutante con actividad de β -xilosidasa y xilanasas ha sido inmovilizado en CLEAS con notables mejoras en su estabilidad operacional (Romero *et al.*, 2021).

En este trabajo se presenta la inmovilización del mutante XynB2^{Y509E} por atrapamiento y por formación de enlaces covalentes en esferas de quitosano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales utilizados para la elaboración de las esferas, el quitosano de baja masa molecular, ácido acético, glutaraldehído y demás reactivos fueron grado reactivo, adquiridos de la marca comercial Sigma (St. Louis, USA). Los sustratos utilizados para los ensayos, p-Nitrofenil- β -D-xilopiranosido (pNPX), y xilano de abedul, así como otros reactivos fueron de la casa comercial Sigma (St. Louis, USA). La acrilamida, el azul de bromofenol y azul brillante de Comoassie R-250 utilizados fueron de la marca Fisher. Bis-acrilamida, dodecil sulfato de sodio (SDS), glicerol, Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), marcador de peso molecular V849, tris-base fueron de la marca Promega. Todos los reactivos utilizados fueron de alta pureza.

Mutagénesis de XynB2^{Y509E}: La mutagénesis sitiodirigida del gen de *xynB2* fue

desarrollada usando el kit de QuikChange II (Stratagene, La Jolla, CA, USA), siguiendo las instrucciones del protocolo establecidas por el fabricante y usando el plásmido pJAVI91 como modelo (Contreras *et al.*, 2008). El cebador para la mutación Y509E respondía a la siguiente secuencia

5'-GCGCGCAACAATTTAGAGTTGACAGGAAAAT-3'

5'-ATTTTCCTGTCAACTCTAAATTGTTGCGCGC-3'

La mutación fue verificada utilizando el método de secuenciación de nucleótidos marcados en un secuenciador ABI 377 DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El plásmido con la mutación se nombró pJAVI100.

Sobreexpresión y purificación

Células competentes de *E. coli* C43 (DE3) fueron transformadas con pJAVI100, contenido de la mutación Y509E de XynB2 y crecidas en medio LB (Sambrook & Russell, 2001), incubadas a 37°C en agitador orbital a 200 rpm, hasta alcanzar una D.O de 0,4, momento en el que se agregó el inductor (IPTG) a una concentración final de 0,1 mM (Isopropil B-D-1-tiogalactopiranosido), permitiendo el crecimiento por 18 h a 37 °C y se recuperó por centrifugación a 5000 rpm por 10 min.

El paquete celular se resuspendió en 20 mL de tampón de lisis (tampón fosfato 50mM; NaCl 300mM; NaN₃ 0,02%; 2-mercaptoetanol 1mM; PMSF 1mM) cuidando no hacer burbujas y se sometió a 10 ciclos de sonicación por 45 seg c/u, en frío, para provocar la lisis. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 30 min, separando el sobrenadante del paquete celular y se preservó el sobrenadante en hielo hasta el momento de su purificación por calentamiento a 50 °C durante 45 min.

Electroforesis

La pureza de la proteína se verificó con electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, bajo condiciones desnaturizantes de acuerdo con el protocolo descrito por Laemmli (1970) en cámara de corrida (Mini-Protean III Bio-Rad Laboratories ®).

Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método de Bradford (Walker, 2002) para la cuantificación de proteínas, así como la medición de absorbancia de las fracciones puras a 280 nm. Se utilizó el coeficiente de extinción molar de la proteína ($133.850 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) para calcular la concentración de XynB2^{Y509E} presente en cada fracción.

Preparación de las esferas de quitosano e inmovilización

Las esferas se prepararon por el método de neutralización (Kamburov & Lalov, 2011), que consiste en gotear la solución-gel de quitosano en una solución alcalina. La inmovilización en quitosano se ensayó de dos formas:

a) Por atrapamiento (Figura 31): 0,2 g de quitosano de bajo peso molecular fueron disueltos en 10 mL de ácido acético (0,1M), bajo agitación continua 120 rpm y con calentamiento a 60 °C. 4 mL de la solución anterior fueron añadidos a 2 mL de la proteína purificada; la suspensión resultante se agregó por goteo con jeringa 27 G en 200 mL de tampón CFG 0,5 M, pH 8,5 y etanol 20%, formando esferas de aproximadamente 2 mm de diámetro que se dejaron madurando durante 1 h al final de la cual se extrajeron sobre un tamiz y se lavaron con tampón CFG pH 6,5, reservando las aguas del tampón y del lavado para verificar la actividad de enzima que pudiera haberse desprendido.

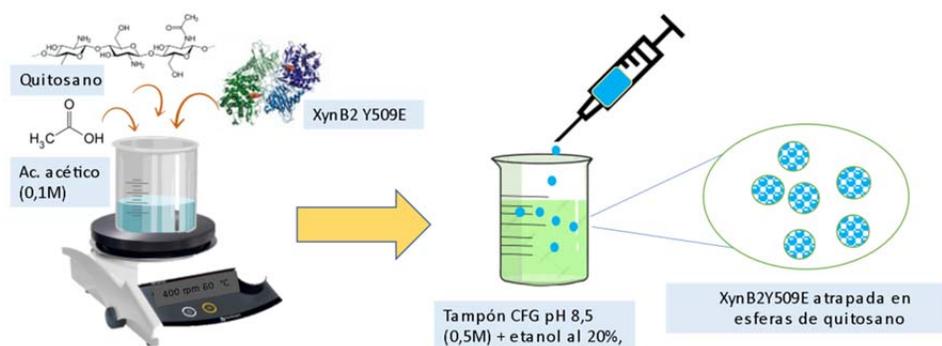


Figura 31. Representación gráfica del protocolo de la inmovilización de XynB2^{Y509E} por atrapamiento en esferas de quitosano

b. Por formación de enlaces covalentes sobre quitosano activado con glutaraldehído (Figura 32): las esferas fueron preparadas con quitosano al 2% en ácido acético (0,1M) y

goteadas en solución de tampón CFG pH 8,5 (0,5M) y etanol al 20%, permitiendo la maduración durante 1 h; luego se lavaron con agua destilada y se sumergieron en solución de glutaraldehído (1%) para su activación, durante 4 h. Transcurrido el tiempo, las esferas fueron lavadas suficientemente para eliminar el exceso de glutaraldehído. Para la unión covalente de la proteína, 0,3 g de esferas fueron incubadas con 0,5 mL de proteína purificada y 0,5 mL de tampón CFG pH 7,5 (0,1M), con agitación en placa, 200 rpm, durante 4 h a temperatura ambiente.

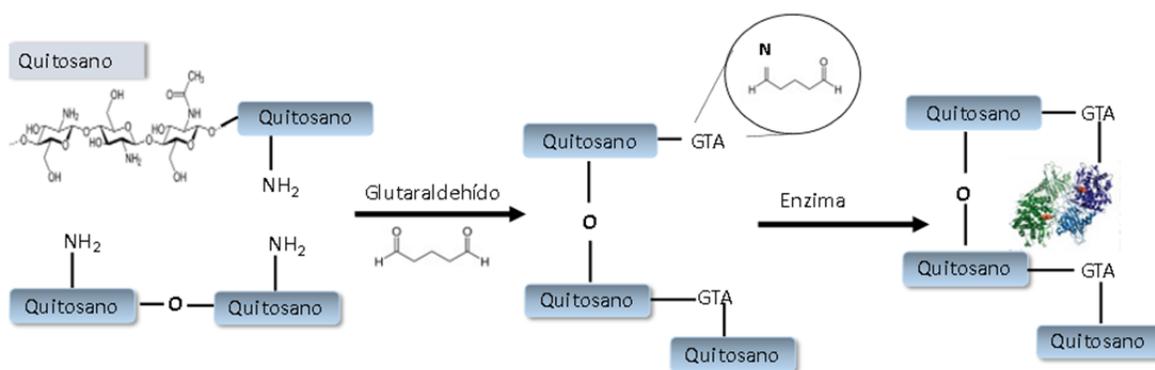


Figura 32. Representación gráfica de las interacciones en la inmovilización de XynB2^{Y509E} por formación de enlaces covalentes sobre esferas de quitosano activado con glutaraldehído

Rendimiento de la inmovilización y porcentaje de recuperación de la actividad

La eficiencia del procedimiento de atrapamiento de XynB2^{Y509E} fue estimado por la diferencia entre la proteína medida desde la cantidad inicial (0,35 mg/mL) y la proteína medida en la solución tampón utilizada para la precipitación más la proteína medida en las aguas de los 3 lavados consecutivos, según la ecuación 3:

Ecuación 3.

$$\text{Eficiencia de atrapamiento (\%)} = \frac{P_0 - (P \text{ sol precip} + P \text{ lav})}{P_0} \times 100$$

Donde P_0 es la cantidad de proteína inicial, $P_{sol\ precip}$ es la proteína desprendida durante el proceso de precipitación y P_{lav} es la proteína desprendida en los lavados.

El rendimiento de la inmovilización de XynB2^{Y509E} en esferas de quitosano activado con glutaraldehído se calculó como sigue:

Ecuación 4

$$\text{Rendimiento de la inmovilización \%} = \frac{P_0 - P}{P_0} \times 100$$

Donde P_0 es la cantidad de proteína inicial y P es la proteína en el sobrenadante luego de la inmovilización.

El porcentaje de recuperación de la actividad fue calculado con la siguiente ecuación:

Ecuación 5

$$\text{Recuperación de la actividad (\%)} = \frac{\text{Actividad de la enzima inmovilizada}}{\text{Actividad de la enzima libre}} \times 100$$

Actividad de β -xilosidasa:

La actividad de β -xilosidasa fue determinada por la medición del p-nitrofenol (pNP) liberado del sustrato p-nitrofenil β -D-xilopiranosido (pNPX) (Sigma). La reacción se inició con la adición de 18 mg de macroesferas con la enzima inmovilizada a 100 μ l de tampón CFG (0,1 M, pH 6,5). La reacción se disparó añadiendo 100 μ l sustrato 10mM en tampón citrato-fosfato-glicina 100 mM a 50 °C. Luego de 5 minutos la reacción fue detenida y el color desarrollado se estabilizó por la adición de 600 μ l de Na_2CO_3 1M. La intensidad del color se leyó a 410 nm en un espectrofotómetro SP-830 plus (Metertech). Se preparó una curva estándar usando p-nitrofenol. Una unidad de enzima fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de pNP por minuto y la actividad específica fue definida como unidades por mg de peso de esferas contentivas de la proteína. Todos los ensayos se hicieron por triplicado y utilizando como control esferas elaboradas según la técnica descrita sin proteína añadida.

Actividad de xilanasa

La actividad xilanasa se comprobó con la medición de los azúcares reductores, empleando ácido 3,5-dinitrosalicílico de acuerdo con el método de Miller (1959) para su cuantificación, utilizando como sustrato una solución de xilano de abedul. La mezcla de la reacción consistió en 60 mg de esferas con la enzima inmovilizada y 0,9 mL de xilano de abedul a distintas concentraciones en tampón CFG 0,1M a pH 6,5 y se incubó durante 1 h a 50 °C. La reacción se detuvo por la adición de 1 mL de DNS y la mezcla se llevó a ebullición durante 15 minutos. La reacción se diluyó en 2mL de agua y se midió la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro SP-830 plus (Metertech). Una unidad de actividad xilanasa se define como la cantidad de enzima inmovilizada que libera 1 μmol de azúcares reductores del xilano por minuto.

Efecto del pH sobre la actividad

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima fue determinado utilizando los sustratos pNPX (2,2mM) y xilano (1%) de abedul preparados en tampón CFG en un rango de valores de pH entre 4,3 y 11, respectivamente. Para determinar la estabilidad a pH los ensayos fueron desarrollados a cada valor de pH (4-11), incubando la enzima con tampón CFG preparado en el rango indicado, hasta 1 h, a 25 °C, luego se hicieron los ensayos según las condiciones estándar ya descritas.

Efecto de la temperatura

Para determinar la temperatura óptima de la enzima inmovilizada, se midió la actividad a diferentes temperaturas dentro del rango 40 y 80 °C, con intervalos de 10 °C, sobre p-NPX 2,2 mM a pH 6,5. La estabilidad térmica de la enzima inmovilizada se investigó preincubando la enzima en ausencia de sustrato en tampón CFG, (pH 6,5) a diferentes temperaturas (40-95°C) por 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 min. El porcentaje de actividad residual se midió utilizando el ensayo estándar para la actividad de β -xilosidasa descrito previamente, después de enfriar las microesferas durante 5 minutos en baño de hielo.

Determinación de parámetros cinéticos

Se estimaron por la medición de las velocidades iniciales utilizando diferentes concentraciones de sustrato p-NPX en el rango de 0,22 y 2,2 mM en tampón CFG (0,1 M a pH 6,5) a 50°C por 5 min. Los valores de K_M aparente y V_{max} fueron calculados a partir del

ajuste hiperbólico entre las concentraciones de sustrato y las velocidades iniciales utilizando el programa Origin 8.0.

Estabilidad operacional

La retención de la actividad de la enzima inmovilizada fue ensayada en las condiciones estándar para la actividad de β -xilosidasa. Después de desarrollar cada reacción, las esferas de quitosano con la enzima inmovilizada fueron retiradas y lavadas con tampón CFG (pH 6,5) para remover cualquier residuo de sustrato en las esferas. Luego, fueron reintroducidas en un nuevo medio de reacción para determinar la actividad enzimática residual en las condiciones descritas.

Estabilidad de almacenaje

La actividad de la enzima inmovilizada en esferas de quitosano por atrapamiento y por formación de enlace covalente, fue ensayada durante 2 meses de almacenamiento en tampón CFG (pH 6,5) a 4°C, utilizando las condiciones experimentales ya descritas.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

La β -xilosidasa forma parte del grupo de enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica del xilano en xilosa, un compuesto de gran interés industrial. XynB2^{Y509E}, es una forma mutada de la β -xilosidasa de la familia GH52 de *G. stercorarium*, que desarrolló además de su actividad natural de β -xilosidasa, la actividad de xilanasa. El hecho de que esta forma presente una actividad dual la hace atractiva para estudiar diferentes aproximaciones de inmovilización. En el ámbito industrial, las enzimas inmovilizadas ofrecen el valor agregado de una estabilidad operacional aumentada, lo que facilita las condiciones para el manejo y transporte, control operacional, fácil recuperación del producto sin contaminación del catalizador, además de mejoras en las características bioquímicas, estabilidad a cambios de pH y temperatura, que finalmente se refleja en la disminución del costo del proceso (Moehlenbrock & Minteer, 2010).

El quitosano es un material frecuentemente utilizado para la preparación de soportes, debido a sus cualidades reconocidas como ser un producto de bajo coste, biocompatible y de fácil manejo, entre otras (Kaczmarek *et al.*, 2019). Una ventaja de su uso es su versatilidad en la obtención de preparaciones de soportes en distintos tamaños, macro,

micro y nano (Bakshi *et al.*, 2020) y en distintas formas como polvo, hojuelas y geles (Kamburov & Lalov, 2012).

En la literatura es posible encontrar un importante número de publicaciones en donde se utiliza el quitosano como soporte para inmovilizar enzimas. Su versatilidad se ha potenciado después de haber sido modificado con diferentes compuestos como tioles (Wu *et al.*, 2020), alginato, carragenano, gelatina (Datta *et al.*, 2013) y glutaraldehído (Rana *et al.*, 2014). El objetivo final de estas modificaciones ha sido mejorar la estabilidad mecánica del quitosano a pH ácidos y la uniformidad en el tamaño del poro (Rana *et al.*, 2014).

La preparación de geles de quitosano se logra cuando, el quitosano disuelto en soluciones diluidas de ácido acético, cítrico y fórmico forma soluciones viscosas que precipitan en soluciones formando complejos insolubles en agua. Así estos geles pueden obtenerse en diferentes formas como esferas, membranas, fibras y esponjas (Kamburov & Lalov, 2012).

Se conocen cuatro grandes grupos de métodos para preparar geles de quitosano (Krajewska, 2004): el método de evaporación de solvente, método de neutralización, método de entrecruzamiento y método de gelificación ionotrópica. En atención a estos, en este trabajo se seleccionó el método de neutralización para formar las esferas de quitosano que posteriormente se utilizaron para inmovilizar el mutante enzimático XynB2^{Y509E} siguiendo dos aproximaciones, la inmovilización por atrapamiento (método físico) y la inmovilización por formación de enlaces covalentes (método químico) sobre el quitosano activado con glutaraldehído.

Condiciones de preparación de la inmovilización de XynB2^{Y509E} por atrapamiento en esferas de quitosano

En el método de atrapamiento se forma o reforma un sólido o gel en presencia de la enzima, por lo que la enzima queda atrapada dentro de la matriz del material (Imam *et al.*, 2021). Idealmente, en este tipo de inmovilización, la enzima retiene la estructura nativa ya que no ocurren modificaciones fuertes dentro del gel, siendo su desventaja más patente las limitaciones de transferencia de masa durante un ciclo enzimático. Por lo tanto, la clave para un atrapamiento exitoso es proporcionar el entorno apropiado dentro del material poroso que permita la libre difusión del sustrato y el producto y que restrinja el movimiento de la proteína.

La eficiencia de la inmovilización de XynB2^{Y509E} por atrapamiento calculada según la ecuación 3 fue de 68%. Varios factores determinan las condiciones óptimas para la preparación de esferas de quitosano como soporte para la inmovilización enzimática. En el caso de la inmovilización por atrapamiento uno de los factores determinantes es la concentración de quitosano utilizado para la elaboración de las esferas. En la figura 33a se observa que, a concentración muy baja, la eficiencia de la inmovilización es menor debido a desprendimiento de la enzima que podría ser explicado por un mayor tamaño de poro en las esferas formadas a menor concentración de quitosano. Conforme aumenta la concentración de quitosano se registra una mejora en la eficiencia de inmovilización lo cual puede deberse a una mayor cantidad de grupos disponibles para formar el reticulado poroso. A pesar de que altas concentraciones de quitosano favorecen el atrapamiento, se observó dificultad mecánica para producir esferas regulares a partir de la solución de quitosano de 3%, por lo que se seleccionó 2% como concentración óptima de quitosano.

Durante el atrapamiento, otro factor importante a considerar es la masa molecular del quitosano utilizado en la fabricación de las esferas. Sun & Zhang (2009) han sugerido que el aumento en la masa del quitosano, p.e. un polímero con cadenas moleculares más largas promovería esferas más fuertes debido a una mayor interacción entre ellas. Una mayor fortaleza de las esferas no siempre es la situación ideal ya que se ha observado que en las esferas de quitosano de alta masa molecular, el tamaño de los poros de la superficie es menor. Este menor tamaño impide o restringe el paso del sustrato hacia la enzima atrapada, por lo que disminuye en consecuencia, la eficiencia del biocatalizador. En virtud de lo expuesto anteriormente, el quitosano utilizado en este trabajo fue de bajo peso molecular (< de 190,000 Da).

Durante la optimización de la inmovilización por atrapamiento también se evaluaron otros factores como el tipo de ácido y su concentración para una buena solubilidad del quitosano; el agente precipitante y el tiempo de maduración de las esferas. El quitosano es soluble en soluciones de diferentes ácidos, por ello en este trabajo, este polisacárido se disolvió en dos ácidos, uno débil como el ácido orgánico acético (Bakshi *et al.*, 2020; Kamburov & Lalov, 2012) y uno fuerte como el ácido clorhídrico, a dos diferentes concentraciones. En la figura 33b puede observarse que la enzima atrapada en las esferas producidas cuando el quitosano

se disolvió a las dos concentraciones estudiadas del ácido fuerte clorhídrico no presenta actividad (menos del 10% de actividad residual). A 1 M del ácido acético la enzima atrapada muestra un 25% de actividad residual. Significativamente cuando se disminuyó la concentración de ácido acético a 100 mM, la actividad recuperada de las esferas fue del 100%. La β -xilosidasa XynB2 de *G. stearothermophilus* está bien caracterizada en su forma *silvestre* (Contreras *et al.*, 2008). La mutación Y509E de XynB2 ha sido previamente caracterizada bioquímicamente (Romero *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2014) no presentando mayores diferencias en comparación con la forma *silvestre*, en relación con condiciones óptimas y de estabilidad a pH y temperatura. A partir de estos trabajos se conoce que, al pH ácido necesario para solubilizar el quitosano, la enzima disminuye de manera irreversible su actividad en el tiempo. Teniendo esto en mente, podemos sugerir que la ausencia de actividad cuando el quitosano se solubiliza en ácido clorhídrico se debe a la inactivación de la enzima por pH ácido.

Como agente precipitante de las esferas se evaluaron soluciones de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y tampón CFG (Figura 33C). Se encontró que la enzima atrapada en las esferas precipitadas en álcali fuerte no presentó actividad posiblemente debido al hecho que XynB2^{Y509E} a pH superior a 10 pierde completamente su actividad, todo esto relacionado con las formas iónicas de los residuos involucrados en la formación del bolsillo catalítico. Significativamente, la enzima atrapada en las esferas precipitadas en tampón CFG fue completamente activa, recuperándose el 100% de su actividad en tampón CFG 0,5 M, pH 8,5 más etanol.

Finalmente, el último parámetro analizado fue el tiempo de maduración de las esferas (figura 33d). Los resultados indican que 1 h de maduración es el tiempo óptimo para recuperar un 100% de actividad. Mayores tiempos de curación, p.e. 2 o 4 h disminuyen la actividad en un 25 o 40% respectivamente. En conclusión, la inmovilización por atrapamiento de XynB2^{Y509E} en esferas de quitosano se logró después de mezclar la enzima con quitosano al 2% solubilizado en ácido acético 0,1 M y precipitar y madurar las gotas mixtas sobre tampón CFG con etanol.

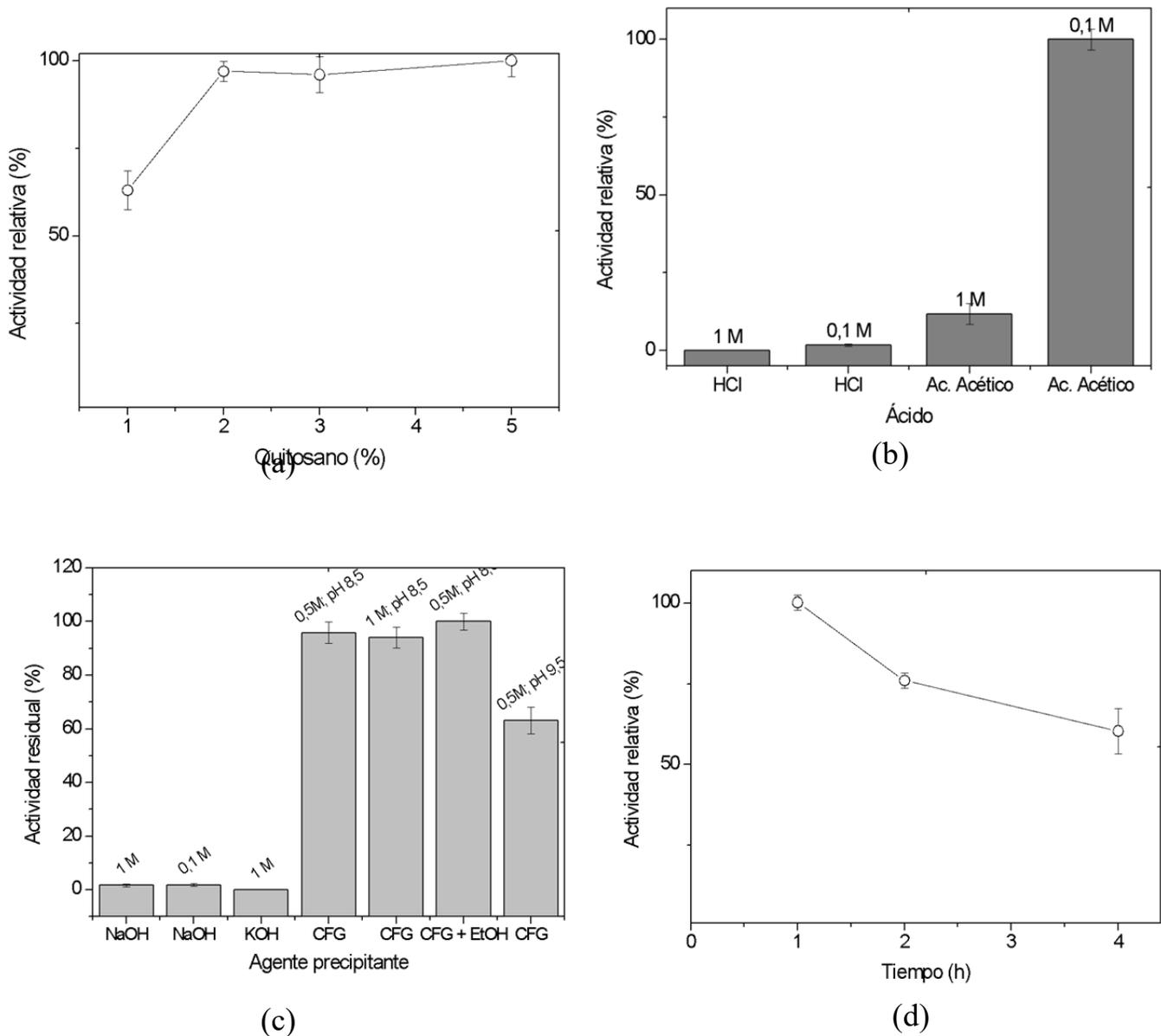


Figura 33. Estandarización de las condiciones de inmovilización del mutante $XynB2^{Y509E}$, por atrapamiento en esferas de quitosano. (a) Efecto de la concentración de quitosano sobre la actividad. (b) Efecto de la concentración del ácido para la preparación del quitosano. (c) Efecto de la solución alcalina utilizada como agente precipitante sobre la actividad. (d) Efecto del tiempo de maduración de las esferas preparadas por precipitación en álcali.

Condiciones para la inmovilización por formación de enlaces covalentes sobre esferas de quitosano activadas con glutaraldehído

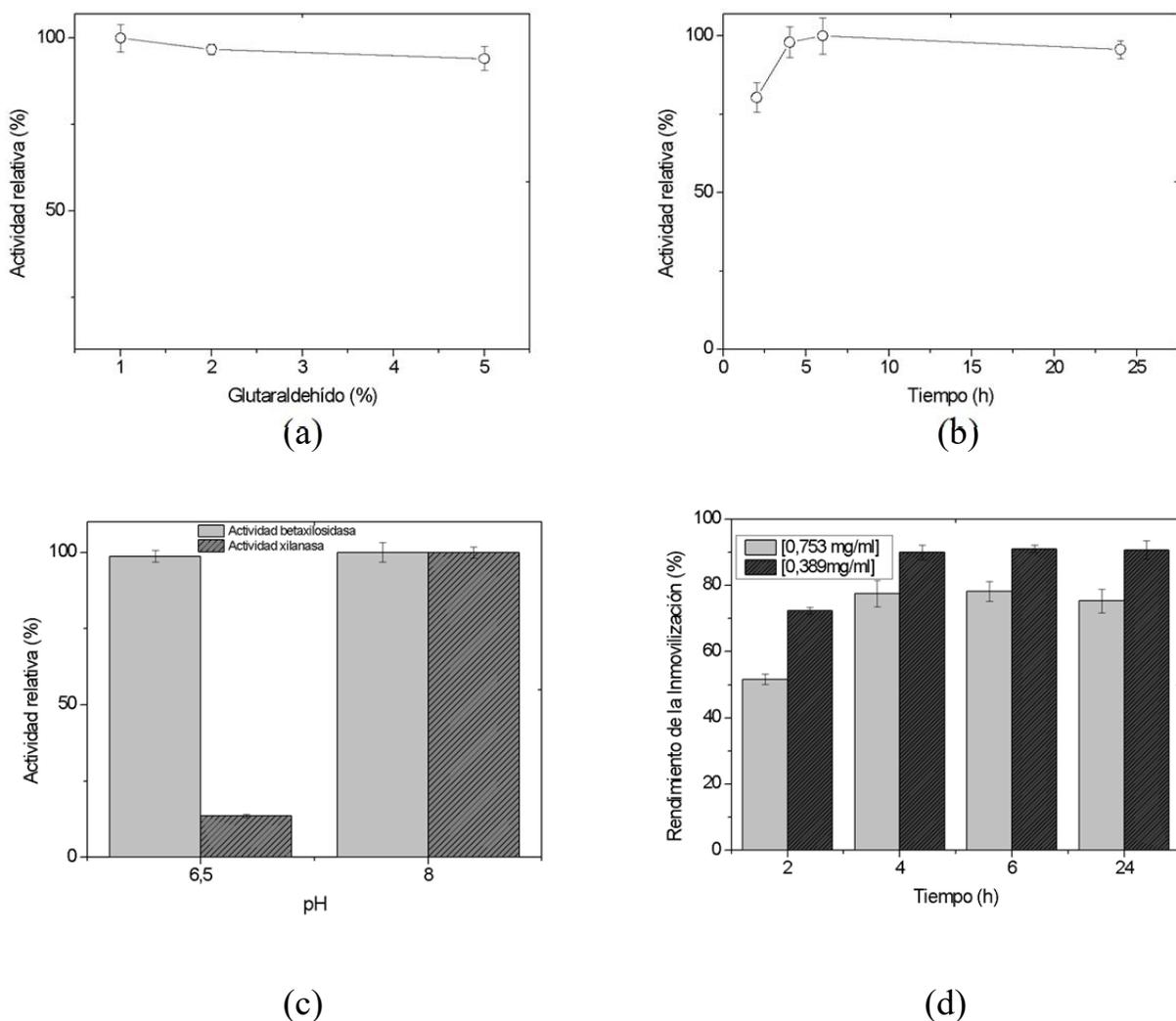


Figura 34. Efecto de condiciones de preparación para activación de las esferas de quitosano sobre la actividad. (a) Concentración de glutaraldehído sobre la actividad. (b) Tiempo de reacción para activación de esferas de quitosano sobre la actividad. (c) Efecto del pH de la solución para la activación de las esferas de quitosano sobre la actividad de β -xilosidasa (gris claro) y de xilanasa (patrón de rayas) de XynB2^{Y509E}. (d) Rendimiento según concentración de proteína y tiempo de inmovilización

El glutaraldehído es uno de los reactivos más ampliamente utilizados en el diseño de biocatalizadores (Barbosa *et al.*, 2014). El glutaraldehído es un agente bifuncional que puede actuar como entrecruzante de proteínas, activador de soportes y entrecruzante de enzimas y soportes. Debido a que algunas enzimas pueden ser inactivadas por este compuesto, el tiempo de modificación y la concentración de glutaraldehído fueron factores evaluados durante la inmovilización de XynB2^{Y509E} en esferas de quitosano.

Durante la reacción de activación del quitosano, el glutaraldehído facilita la reticulación de las cadenas poliméricas, lo que mejora la resistencia mecánica del soporte y evita su solubilización en medio ácido debido a su naturaleza catiónica (Bilal *et al.*, 2019). La reacción de activación también genera en la superficie del quitosano, grupos aldehídicos que pueden reaccionar con grupos amino de la enzima y con otros grupos funcionales como tioles o fenoles (Barbosa *et al.*, 2014). Aunque el mecanismo de la reacción no está completamente elucidado, se cree que puede implicar la formación de *bases de Schiff* y sustituciones nucleofílicas. La figura 34a muestra el efecto de la concentración de glutaraldehído sobre la actividad relativa donde puede observarse que a mayor concentración de glutaraldehído se disminuye la eficiencia de la inmovilización. Este hallazgo podría explicarse debido a un aumento de la cantidad de glutaraldehído sobre el soporte, combinando las formas monoméricas y diméricas; al respecto Betancor *et al.*, (2006) sugieren que se genera además un efecto polimerizador sobre el glutaraldehído en solución, promovido por la reactividad aumentada de la molécula luego de la primera reacción amino-glutaraldehído (Betancor *et al.*, 2006). Dado que 1% de glutaraldehído permite recuperar el 100% de la actividad se tomó como óptima esta concentración. Con relación al tiempo de contacto de las esferas con 1% de glutaraldehído se encontró que tiempos entre 4 y 6 h preservan un 100% de la actividad. Los resultados de las figuras 34a y 34b nos permiten concluir que las condiciones de activación de las esferas para una óptima inmovilización fueron glutaraldehído al 1,0% durante 4 h.

Otro factor evaluado durante la reacción del glutaraldehído con el quitosano fue el pH de la solución. El ensayo se desarrolló a dos valores de pH ya que se conoce que a valores de pH ácido el glutaraldehído está en su forma monomérica, lo que produce enlaces más cortos, mientras que a pH más alcalino se forman polímeros más grandes, con la posibilidad de

enlaces más amplios. Al ser XynB2^{Y509E} una variante enzimática que además de su actividad de β -xilosidasa también presenta actividad de xilanasas, fue relevante considerar estas dos condiciones. En la figura 34c se muestra que la actividad de β -xilosidasa se preserva en las esferas activadas a pH 6,5 y 8, sin embargo, la actividad de xilanasas se observa significativamente comprometida cuando la activación de las esferas y la unión con la enzima se desarrollan a pH 6,5. Este hallazgo podría estar relacionado con la dificultad del sustrato (xilano en el caso de la actividad de xilanasas) para acceder al sitio activo situación que ya ha sido reportada previamente cuando XynB2^{Y509E} se inmovilizó como agregados enzimáticos entrecruzados (Romero *et al.*, 2021).

Una vez determinadas las condiciones óptimas de la inmovilización de XynB2^{Y509E} en las esferas de quitosano activadas con glutaraldehído, se evaluó finalmente el rendimiento de la inmovilización según la ecuación 4. La figura 34d muestra los rendimientos obtenidos para los cuatro tiempos de la reacción de inmovilización que fueron estudiados. Se observa que, aunque a 4, 6 y 24 h la actividad relativa fue casi del 100%, el rendimiento de la inmovilización a estos tiempos fue del 77%. Con la finalidad de aumentar el rendimiento de la inmovilización se disminuyó a la mitad la cantidad de proteína a inmovilizar (0,389 mg/mL) obteniéndose un 90% de rendimiento. El menor rendimiento obtenido cuando se utilizó una mayor concentración de proteína puede ser explicado por una saturación del soporte.

Finalmente, se evaluó la recuperación de la actividad de la enzima en las esferas de quitosano activadas con glutaraldehído a través de la ecuación 5. La recuperación de la actividad a las dos concentraciones de proteína ensayadas fue de 70%. La pérdida de actividad ha sido encontrada también en otros reportes de inmovilizaciones de enzimas por formación de enlace covalente y estaría relacionada con ligeros cambios en la estructura durante el proceso de inmovilización (Karami *et al.*, 2020).

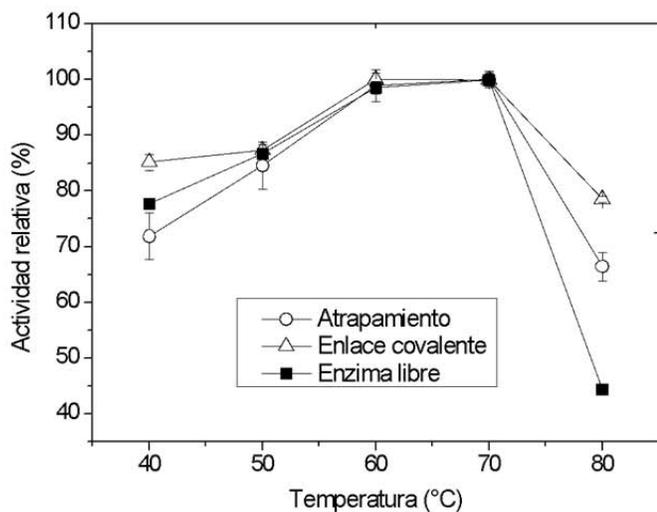
Efectos de la inmovilización sobre la actividad y estabilidad

Efecto de la temperatura y termoestabilidad

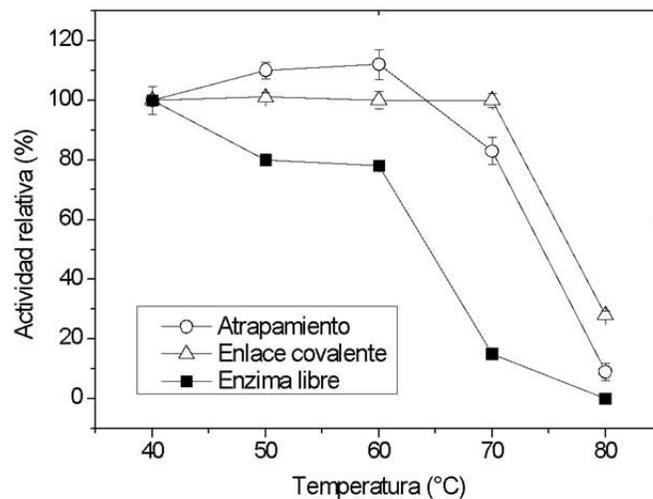
La dependencia de la actividad de β -xilosidasa de la enzima libre e inmovilizada por los dos métodos propuestos fue evaluada en tampón CFG 0,1M dentro del rango de 40 a 80°C.

Los resultados que se presentan en la figura 35 muestran un incremento de actividad con el aumento de la temperatura y posterior descenso, luego de que se alcanza la temperatura óptima, que coincide para las formas libre e inmovilizada; sin embargo, se resalta que a 80°C la enzima inmovilizada por cualquiera de los dos protocolos presenta un mayor porcentaje de actividad que la enzima libre (figura 35a). Esta curva responde al incremento de energía cinética del sustrato y la enzima, lo que contribuye a acelerar la reacción enzimática.

La termoestabilidad de ambas formas de inmovilización fue mayor que la de la enzima libre, cuando se estudió la actividad luego de incubar durante 1 h la enzima, libre o inmovilizada, en ausencia de sustrato, en el rango de temperaturas señalado (figura 35b). Entre 50 y 60 °C se observa un ligero incremento de actividad en la forma inmovilizada por atrapamiento, por encima de la forma inmovilizada sobre quitosano activado, que podría estar relacionado con un fenómeno de dilatación de los poros de la esfera de quitosano al aumentar la temperatura, lo que permitiría un mejor acceso del sustrato al sitio activo. La enzima inmovilizada por enlace covalente muestra una estabilidad térmica superior a la enzima libre y a la enzima inmovilizada por atrapamiento ya que después de 1 h de incubación a 70°C se preserva el 100% de su actividad, incluso conserva hasta el 30% de la actividad inicial luego de permanecer 1 h a 80°C. El conjunto de los resultados sugiere que la inmovilización por atrapamiento o por enlace covalente conduce a un aumento de la estabilidad térmica de XynB2^{Y509E}, lo que hace que estas formas de la enzima sean industrialmente más valiosas que la enzima libre.



(a)



(b)

Figura 35. (a) Efecto de la temperatura sobre la actividad de $XynB2^{Y509E}$ libre (■), $XynB2^{Y509E}$ inmovilizada por atrapamiento en esferas de quitosano (o) y $XynB2^{Y509E}$ inmovilizada en esferas de quitosano activadas con glutaraldehído (Δ). (b) Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de $XynB2^{Y509E}$ libre (■), $XynB2^{Y509E}$ inmovilizada por atrapamiento en esferas de quitosano (o) y $XynB2^{Y509E}$ inmovilizada en esferas de quitosano activadas con glutaraldehído (Δ). En la termoestabilidad la enzima se incubó durante 1 h en tampón CFG pH 6,5. Se retiró el tampón de incubación, se añadió tampón nuevo y se procedió a hacer la reacción como se describió previamente. Se considera 100% a la actividad medida en el tiempo 0 de la incubación. Se determinó la actividad enzimática también en el tampón de incubación que se retira para evaluar el posible desprendimiento de la enzima desde el soporte durante la incubación.

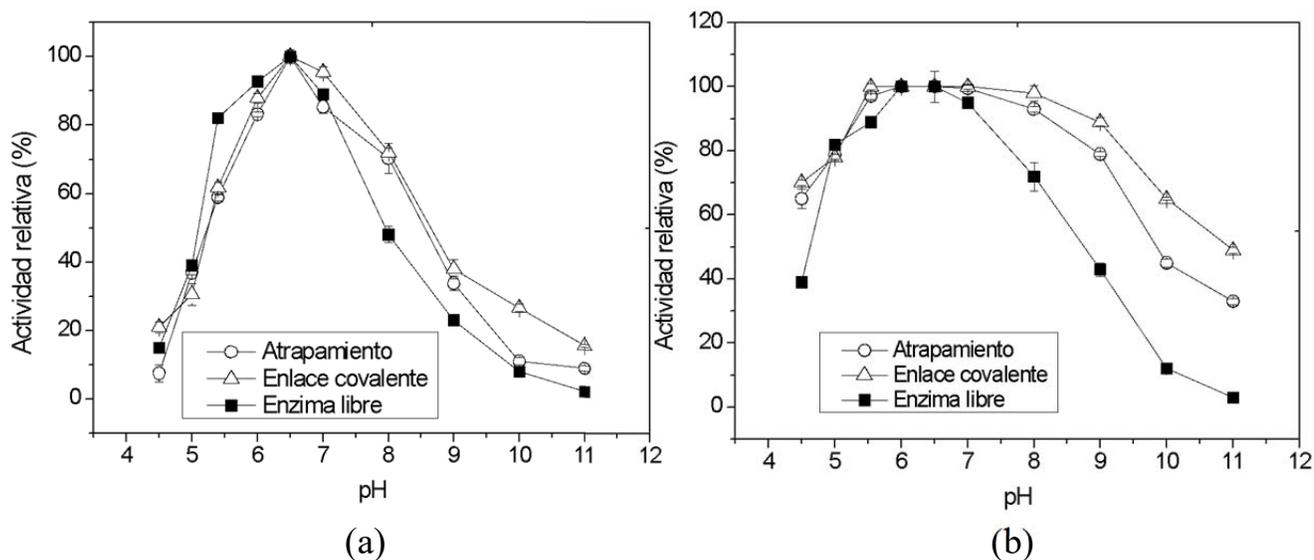


Figura 36. Efecto del pH sobre la actividad (a) y la estabilidad (b) de la enzima libre (■) e inmovilizada en quitosano por atrapamiento (○) y enlaces covalentes (△). La reacción para estudiar el efecto de pH se hizo en tampón CFG (0,1M) a cada pH señalado, durante 5 min a 50°C, usando pNPX (2,2 mM) como sustrato, preparado también en tampón CFG en el valor de pH indicado. Para el efecto sobre la estabilidad, la reacción se desarrolló en las condiciones estándar descritas, luego de haber incubado la enzima durante 1 h al pH indicado. La actividad se expresa como actividad relativa considerando como 100% el tiempo 0 de incubación.

Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad

Los valores de pH pueden afectar la formación y/o disociación del complejo enzima-sustrato, dificultando la formación del bolsillo catalítico o centro activo de la enzima y su estabilidad. El efecto del pH sobre la actividad de la enzima, libre e inmovilizada se muestra en la figura 36a. Se observa que la actividad relativa de la enzima libre e inmovilizada aumenta gradualmente en el rango de pH 5,5 a 7,0. El descenso de la actividad a partir de pH 7 es más drástico en la enzima libre que en las dos formas de enzima inmovilizadas. Por ejemplo, a pH 8 mientras la enzima libre retiene un 45% de actividad, las formas inmovilizadas presentan un 75% de la actividad respecto al pH óptimo. Esta mayor preservación de la actividad de las formas inmovilizadas puede explicarse por la existencia de nuevas interacciones entre los grupos amino e hidroxilo del quitosano y los residuos no catalíticos de la enzima, confiriendo en consecuencia mayor

estabilidad a la estructura proteica. Respecto al efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima libre e inmovilizada se encontró que la inmovilización redonda en una mayor estabilidad química de la enzima (Figura 36b). Por ejemplo, mientras la enzima libre incubada 1 h a pH 9 solo retiene el 40% de su actividad, las formas inmovilizadas por atrapamiento o por enlace covalente retienen el 80 y 90% de su actividad óptima respectivamente.

Efecto de la inmovilización sobre los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos de la reacción de la enzima libre y las dos formas inmovilizadas se recogen en la Tabla 6. Se encontró que la K_M aparente de la enzima luego de la inmovilización por ambos métodos, es más alta que la calculada para la enzima libre. Este cambio, en comparación con la enzima libre, indica que hay una disminución de la afinidad de la enzima por el sustrato, que puede explicarse por cambios conformacionales en el bolsillo catalítico derivados de la inmovilización lo que puede ocasionar impedimento estérico, impedimento de acceso al sitio activo de la enzima causado por el soporte, pérdida de flexibilidad de la enzima, necesaria para la unión con el sustrato o resistencia difusional en el medio de la reacción cerca del soporte. Respecto a V_{max} se encontró que la inmovilización no afecta este parámetro tal y como ha sido observado previamente para otras enzimas celulolíticas y xilanolíticas inmovilizadas también en quitosano (Román-Sánchez *et al.*, 2014).

Tabla 6. Parámetros cinéticos para la actividad β -xilosidasa de XynB2^{Y509E} libre e inmovilizada en esferas de quitosano.

XynB2 ^{Y509E}	K_m (mM)	V_{max} (nmol/min)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (s ⁻¹ .M ⁻¹)
Libre	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2	3,8	5,2
Inmovilizada por enlace covalente	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,25	0,1	0,1
Inmovilizada por atrapamiento	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,01	0,01

*La actividad fue ensayada en las condiciones descritas.

Los valores de recambio y eficiencia catalítica (Tabla 6), calculados a partir de los

parámetros K_M y V_{max} reflejan los cambios producidos tras la inmovilización. En términos generales la K_{cat} y la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M) de la enzima disminuye tras la inmovilización. La disminución en K_{cat}/K_M fue de 520 veces en la enzima inmovilizada por atrapamiento y de 260 veces para la enzima inmovilizada por enlace covalente, es decir la inmovilización por enlace covalente mejora 2 veces la inmovilización por atrapamiento.

Estabilidad operacional de XynB2^{Y509E} inmovilizada en esferas de quitosano

El potencial de reutilización de XynB2^{Y509E} inmovilizada por atrapamiento y por enlaces covalentes en esferas de quitosano fue monitoreado por el desarrollo de una serie de 10 ciclos de hidrólisis del sustrato p-NPX, en las condiciones estándar descritas en el apartado de metodología (Figura 37a). Después de 3 a 5 ciclos de reutilización la enzima inmovilizada por atrapamiento preserva hasta 65% de su actividad, luego de lo cual se observa un descenso progresivo hasta 55% de actividad residual al finalizar los 10 ciclos de reutilización. Esta reducción en la actividad se debe a desprendimiento de la enzima del soporte ya que las aguas del lavado también presentaron actividad. En la inmovilización por enlace covalente se observa una retención del 90% de la actividad después de 10 ciclos de reacción. Esta disminución del 10% de la actividad residual podría estar relacionado con cambios conformacionales en la molécula durante el reprocesamiento continuo, tal y como ha sido reportado por Bilal *et al.*, (2019) durante la inmovilización de una lacasa.

Las curvas de estabilidad operacional obtenidas para las dos inmovilizaciones sugieren que la inmovilización por enlace covalente imparte una resistencia enzimática sustancial. Las formas libre e inmovilizadas de XynB2^{Y509E} fueron preservadas durante 60 días a 4°C para ensayar su estabilidad de almacenamiento midiendo su actividad residual. El perfil se registró diariamente los primeros 5 días y luego cada 15 días (figura 37b). Los resultados muestran que la estabilidad de almacenamiento de las dos formas de enzima inmovilizada es sustancialmente mayor en comparación con la enzima libre. Durante los 5 primeros días la actividad residual para las tres formas fue del 100%. A partir del 5to día comienza una pérdida importante de la actividad en la enzima libre, la cual llega a ser del 50% después de 15 días a 4°C. Por el contrario, a este mismo tiempo, la enzima inmovilizada por atrapamiento o por enlace covalente conserva un 85% y un 94% de actividad residual

respectivamente. Tras dos meses de almacenamiento se observó que, aunque la enzima inmovilizada por atrapamiento pierde gradualmente su estabilidad catalítica, la enzima enlazada covalentemente a quitosano activado con glutaraldehído mantiene su actividad residual por encima de 90%. Esta diferencia notable en la estabilidad de almacenamiento sugiere que la mejor inmovilización para XynB2^{Y509E} es la de enlace covalente. Este hallazgo es una característica deseable para la posible explotación de esta enzima en sectores industriales que demandan gran estabilidad de almacenamiento.

De manera general, cuando las enzimas son extraídas de su entorno biocatalítico natural pierden fácilmente su actividad o estabilidad. Esta situación avala la importancia de buscar nuevos métodos de inmovilización. Nuestros resultados sugieren que la inmovilización sobre esferas de quitosano es una aproximación válida y eficiente para inmovilizar enzimas xilanolíticas. Significativamente, este tipo de inmovilización, además de cumplir el requerimiento de ser una técnica amigable con el ambiente, promueve una gran estabilidad a largo plazo en las dos formas de catalizador sintetizado en este trabajo. Finalmente, los hallazgos encontrados en este trabajo engrosan la lista de inmovilizaciones exitosas que utilizan quitosano activado para inmovilizar enzimas hidrolíticas tipo lipasa, catalasa, y pepsinasa y pectinasas con una mejora sustancial en su estabilidad de almacenamiento (Işık, 2020; Bilal *et al.*, 2019; Monier *et al.*, 2010).

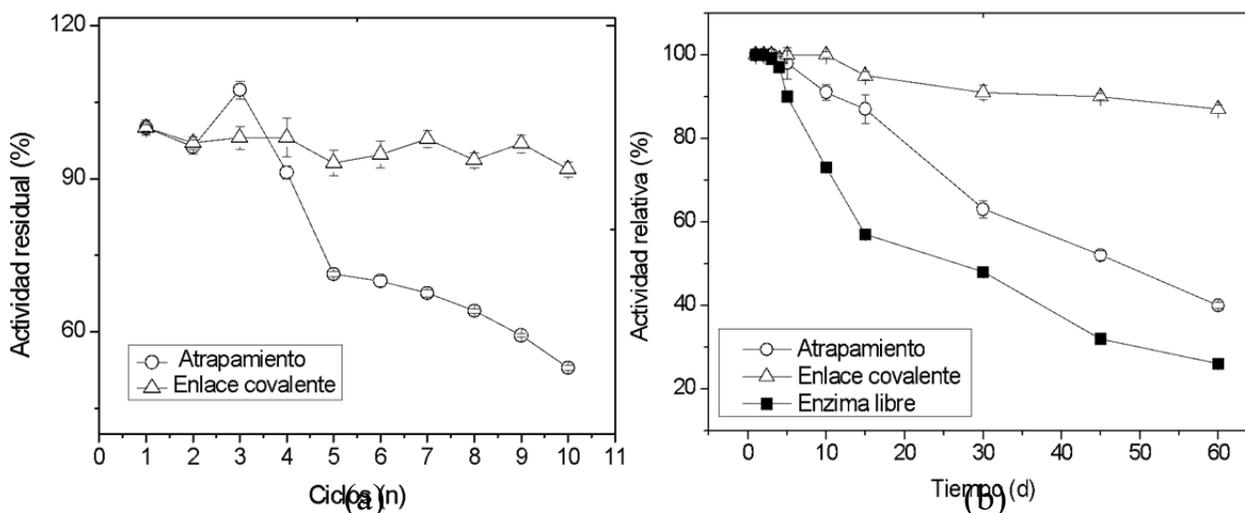


Figura 37. Estabilidad operacional de XynB2^{Y509E} inmovilizada en esferas de quitosano. (a) Reusabilidad de la enzima inmovilizada por dos métodos diferentes, medida a través de la actividad de β -xilosidasa, bajo las condiciones estándar descritas. Luego de cada uso, la esfera con la enzima inmovilizada fue retirada del medio de reacción y lavada suficientemente con tampón CFG, para limpiar cualquier cantidad de sustrato y producto que pudiera estar unido al soporte. (b) Estabilidad a 4°C. Las formas inmovilizadas se repartieron en alícuotas y se almacenaron a 4°C en 0,5 mL de tampón CFG 0,1M, pH 6,5 durante el tiempo del ensayo, luego se desarrolló el ensayo enzimático en el tiempo indicado y en las condiciones estándar descritas previamente. Se midió actividad de β -xilosidasa en el tampón en el que se preservaron las esferas para evaluar el posible desprendimiento de la proteína.

CONCLUSIONES

XynB2^{Y509E} fue exitosamente inmovilizada a través de dos métodos, por atrapamiento en esferas de quitosano y por formación de enlaces covalentes sobre esferas de quitosano activado con glutaraldehído, lográndose la retención de la actividad catalítica dual solo en la inmovilización por enlaces covalentes. Bajo las condiciones ensayadas, los resultados muestran que las dos formas de XynB2^{Y509E} inmovilizada exhiben una resistencia mejorada contra la desnaturalización térmica y química respecto a la enzima libre. La enzima inmovilizada puede ser reutilizada hasta 10 veces, sin pérdida significativa de su actividad. En referencia a la estabilidad de almacenamiento se encontró que las formas de XynB2^{Y509E} inmovilizadas en esferas de quitosano son más estables que la enzima libre, confirmando la idoneidad del quitosano como soporte. Con la finalidad de evaluar el potencial de los

catalizadores generados consideramos en un futuro caracterizar las esferas de quitosano utilizando microscopía electrónica para conocer la morfología de las esferas como una vía que permita mejorar la retención de la actividad catalítica.

REFERENCIAS

1. Ali, S., Zafar, W., Shafiq, S., Manzoor, M. (2017). Enzymes Immobilization: An overview of techniques, support materials and its applications. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 6 (07).
2. Arana-Peña, S., Carballares, D., Morellon-Sterling, R., Berenguer-Murcia, Á., Alcántara, A. R., Rodrigues, R. C., Fernandez-Lafuente, R. (2020). Enzyme co-immobilization: Always the biocatalyst designers' choice...or not? *Biotechnology Advances*, 107584. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107584
3. Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., Kumar, N. S. (2020). Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 1072–1083. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113
4. Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., Fernandez-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *Rsc Advances*, 4(4), 1583-1600.
5. Ben-David, A., Bravman, T., Balazs, Y. S., Czjzek, M., Schomburg, D., Shoham, G., Shoham, Y. (2007). Glycosynthase activity of *Geobacillus stearothermophilus* GH52 β -xylosidase: efficient synthesis of xylooligosaccharides from a D-xylopyranosyl fluoride through a conjugated reaction. *Chembiochem*, 8(17), 2145-2151.
6. Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Mateo, G. D. O. C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M. (2006). Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and microbial technology*, 39(4), 877-882.
7. Bilal, M., Jing, Z., Zhao, Y., Iqbal, H. M. (2019). Immobilization of fungal laccase on glutaraldehyde cross-linked chitosan beads and its bio-catalytic potential to degrade bisphenol A. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101174.
8. Bravman, T., Zolotnitsky, G., Belakhov, V., Shoham, G., Henrissat, B., Baasov, T., Shoham, Y. (2003). Detailed kinetic analysis of a family 52 glycoside hydrolase: a β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Biochemistry*, 42(35), 10528-10536.
9. Bravman, T., Zolotnitsky, G., Shulami, S., Belakhov, V., Solomon, D., Baasov, T., ... & Shoham, Y. (2001). Stereochemistry of family 52 glycosyl hydrolases: a β -xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6 is a retaining enzyme. *FEBS letters*, 495(1-2), 39-43.
10. Brena, B., González-Pombo, P., Batista-Viera, F. (2006) Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: Guisan J. (eds) *Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Molecular Biology* (Methods and Protocols), vol 1051, Totowa, NJ: Humana Press
11. Cicolatti, E. P., Pinto, M. C. C., Henriques, R. O., da Silva Pinto, J. C. C., de Castro, A. M., Freire, D. M. G., Manoel, E. A. (2019). Enzymes in green chemistry: The state of the art in chemical transformations. *Advances in Enzyme Technology*, 137-151.

12. Contreras, L. M., Gómez, J., Prieto, J., Clemente-Jiménez, J. M., Las Heras-Vázquez, F. J., Rodríguez-Vico, F., ... & Neira, J. L. (2008). The family 52 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* is a dimer: Structural and biophysical characterization of a glycoside hydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1784(12), 1924-1934.
13. Corradini, F. A., Milessi, T. S., Gonçalves, V. M., Ruller, R., Sargo, C. R., Lopes, L. A., ... & Giordano, R. L. (2021). High stabilization and hyperactivation of a Recombinant β -xylosidase through Immobilization Strategies. *Enzyme and Microbial Technology*, 145, 109725.
14. Datta, S., Christena, L. R., Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9.
15. De Canio, P., De Bari, I., Romano, P. (2011). Latest Frontiers in the biotechnologies for ethanol production from lignocellulosic biomass. *Biofuel Production - Recent Developments and Prospects*, Dr. Marco Aurelio Dos Santos Bernardes (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/19825. Available from: <https://www.intechopen.com/books/biofuel-production-recent-developments-and-prospects/latest-frontiers-in-the-biotechnologies-for-ethanol-production-from-lignocellulosic-biomass>
16. Graebin, N., Schöffler, J., de Andrades, D., Hertz, P., Ayub, M., Rodrigues, R. (2016). Immobilization of glycoside hydrolase familie GH1, GH13, and GH70: state of the art and perspectives. *Molecules*, 21, 1074; doi:10.3390/molecules21081074
17. Guisán, J. (2012). Purificación e inmovilización de enzimas industriales. En: *Monografía XXXV: Biocatálisis aplicada a la obtención de fármacos y productos de alto valor añadido*. Madrid. DOI: <http://dx.doi.org/ES/monoranf.v0i0.13151>
18. Guisan, J.M. (ed.) (2013). *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition, Methods in Molecular Biology*, vol. 1051, DOI 10.1007/978-1-62703-550-7_2, © Springer Science+Business Media New York
19. Hong, S., Kyung, M., Jo, I., Kim, Y. R., Ha, N. C. (2018). Structure-based protein engineering of bacterial β -xylosidase to increase the production yield of xylobiose from xylose. *Biochemical and biophysical research communications*, 501(3), 703-710.
20. Huang, Z., Liu, X., Zhang, S., Liu, Z. (2014). GH52 xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*: characterization and introduction of xylanase activity by site-directed mutagenesis of Tyr509. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(1), 65-74.
21. Imam, H. T., Marr, P. C., Marr, A. C. (2021). Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. *Green Chemistry*, 23(14), 4980-5005.
22. Işık, M. (2020). High Stability of Immobilized Acetylcholinesterase on Chitosan Beads. *Chemistry Select*, 5(15), 4623–4627. doi:10.1002/slct.202000559
23. Kaczmarek, M. B., Struszczyk-Swita, K., Li, X., Szczesna-Antczak, M., Daroch, M. (2019). Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chitooligosaccharides. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 243.
24. Kamburov, M., Lalov, I. (2012). Preparation of chitosan beads for trypsin immobilization. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26(sup1), 156-163.

25. Karami, F., Ghorbani, M., Mahoonak, A. S., Khodarahmi, R. (2020). Fast, inexpensive purification of β -glucosidase from *Aspergillus niger* and improved catalytic/physicochemical properties upon the enzyme immobilization: Possible broad prospects for industrial applications. *LWT*, 118, 108770. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108770>.
26. Krajewska, B. (2004). Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and microbial technology*, 35(2-3), 126-139.
27. Kurz, L., García, V., Wilkesman, J., Contreras, L. M. (2014). Enzymatic characterization of the recombinant beta-xylosidase XynB2. *Journal of Medical and biological sciences*, 1, 14-19.
28. Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
29. Meldal, M., Schoffelen, S. (2016). Recent advances in covalent, site-specific protein immobilization. *F1000Research*, 5.
30. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
31. Moehlenbrock, M. J., Minter, S. D. (2010). Introduction to the field of enzyme immobilization and stabilization. *Methods in Molecular Biology*, 1-7. doi:10.1007/978-1-60761-895-9_1
32. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205-220.
33. Monier, M., Ayad, D. M., Wei, Y., Sarhan, A. A. (2010). Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(3), 324-330.
34. Nunes, Y. L., de Menezes, F. L., de Sousa, I. G., Cavalcante, A. L. G., Cavalcante, F. T. T., da Silva Moreira, K., ... & dos Santos, J. C. S. (2021). Chemical and physical Chitosan modification for designing enzymatic industrial biocatalysts: How to choose the best strategy? *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 1124-1170. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.04.
35. Rana, M., Kumari, A., Chauhan, G. S., Chauhan, K. (2014). Modified chitosan microspheres in non-aggregated amylase immobilization. *International journal of biological macromolecules*, 66, 46-51.
36. Rehn F., Chen, S., Rehn, B. (2016). Enzyme engineering for in situ immobilization. *Molecules*, 21, 1370; doi:10.3390/molecules21101370
37. Romero, G., Contreras, L. M., Aguirre, C., Wilkesman, J., Clemente-Jiménez, J. M., Rodríguez-Vico, F., ... & Javier, F. (2021). Characterization of Cross-Linked Enzyme Aggregates of the Y509E Mutant of a Glycoside Hydrolase Family 52 β -xylosidase from *G. stearothermophilus*. *Molecules*, 26(2), 451.
38. Romo-Sánchez, S., Camacho, C., Ramirez, H.L., Arévalo-Villena, M. (2014) Immobilization of Commercial Cellulase and Xylanase by Different Methods Using Two Polymeric Supports. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 517-526. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2014.56062>

39. Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. Mol. *Cloning A Lab. Man.*
40. Sheldon, R. A. (2016). Engineering a more sustainable world through catalysis and green chemistry. *Journal of The Royal Society Interface*, 13(116), 20160087
41. Sheldon, R., van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42: 6223- <http://pubs.rsc.org/-/content/articlehtml/2013/cs/c3cs60075k>
42. Sun, S. F., Zhang, Y. (2009). A novel process to prepare chitosan microspheres without shrinkage and its application to immobilize β -galactosidase. *E-Journal of Chemistry*, 6(4), 1211-1220.
43. Walker, J. (2002). The protein protocols. 2nd Ed. New Jersey. Humana Press. Disponible en http://www.aun.edu.eg/molecular_biology/Protein%20workshop/Protein%20Handbook.pdf
44. Wu, Z., Zhou, W., Deng, W., Xu, C., Cai, Y., Wang, X. (2020). Antibacterial and hemostatic thiol-modified chitosan-immobilized AgNPs composite sponges. *ACS applied materials & interfaces*, 12(18), 20307-20320.

CONCLUSIONES GENERALES

1. XynB2^{Y509E} fue expresada, purificada, caracterizada bioquímica y estructuralmente de manera exitosa. XynB2 fue mutada en el residuo tirosina 509 por un residuo de ácido glutámico (XynB2^{Y509E}), además se insertó una cola de histidinas para facilitar el proceso de purificación necesario para la caracterización y posterior inmovilización. Las condiciones de sobreexpresión difieren levemente de lo reportado para la enzima nativa, así mismo, los ligeros cambios observados en la termoestabilidad sugieren que la mutación podría influir de alguna manera en la estabilidad térmica de la enzima. En referencia a la estructura, la mutación no afecta de manera importante su plegamiento ni conformación. El mutante posee al igual que XynB2WT un 50% de estructura helicoidal y de hoja β , y su conformación tridimensional es estable entre pH 6 y 8. El comportamiento del mutante frente a agentes desnaturizantes, a nivel de actividad, estructura y conformación es muy similar también a lo reportado para la forma nativa, aunque es más sensible al agente caotrópico GdnCl y a la temperatura.
2. XynB2^{Y509E} fue exitosamente inmovilizada en CLEAs y sobre esferas de quitosano, resultando de manera general, en una mejora de sus características funcionales y de estabilidad operacional, permitiendo, además, la recuperación y reusabilidad del biocatalizador el cual podrá ser utilizado en futuro para la obtención de productos de valor agregado a partir de la degradación del xilano.
3. La inmovilización de XynB2^{Y509E} sobre esferas de quitosano modificado con glutaraldehído como agente enlazante entre el soporte y la enzima, resultó mas robusta que la inmovilización por atrapamiento, en la que se observa pérdida de la actividad de xilanasas desarrollada tras la mutación.
4. La comparación entre los dos tipos de inmovilizaciones llevadas a cabo en esta Tesis Doctoral sugiere que la inmovilización como agregados entrecruzados (CLEAs) ofrece mayores ventajas sobre inmovilización sobre quitosano bien sea por atrapamiento o por formación de enlaces covalente. La razón es que la inmovilización en CLEAs es un procedimiento sencillo que no requiere el diseño de un soporte, lo que incide positivamente en una reducción en los posibles costos de

producción del biocatalizador inmovilizado, haciendo por lo tanto que consideremos a este método, como la forma mas interesante para ensayar la inmovilización conjunta de enzimas que participan en la hidrólisis del xilano, como una forma de contribuir al aprovechamiento de la gran biomasa lignocelulósica.

RECOMENDACIONES

La hipótesis de ampliación del bolsillo catalítico derivada de la mutación Y509E, planteada por Huang *et al.*, (2014), aún no ha podido ser comprobada dada la ausencia de la resolución estructural de la enzima nativa XynB2 o de la enzima mutante XynB2^{Y509E}. En este sentido, una propuesta para confirmar que la actividad de xilanasa es consecuencia de esta apertura del bolsillo catalítico es llevar a cabo esta mutación en la β -xilosidasa de *Geobacillus thermoglucosidasius* (Espina *et al.*, 2014), ya que su estructura está resuelta y donde también se conoce que su tirosina 531 es homóloga a la tirosina 509 de XynB2. Esta aproximación permitiría confirmar si esta mutación en la β -xilosidasa de *Geobacillus thermoglucosidasius* también redundaría en la generación de la actividad de xilanasa. Sin embargo, la opción más clara para tratar de entender la generación de nuevas actividades en la enzima bajo estudio parte por disponer finalmente de la estructura cristalina.

El hecho de que XynB2^{Y509E} inmovilizada presente una mejor estabilidad funcional y operacional que la enzima libre, la hace atractiva para evaluar su potencial uso industrial. Por ello se sugiere que los próximos trabajos deberían estar orientados a buscar nuevas opciones de otras matrices o soportes, así como la prueba en reactores y la inclusión de la enzima dentro de un cóctel enzimático para degradar la materia lignocelulósica.

Dado el carácter sinérgico de la actividad enzimática necesaria para la hidrólisis completa del xilano, se sugiere también intentar la inmovilización de enzimas xilanasas y β -xilosidasas sobre un mismo soporte, bien sea en CLEAs o por formación de enlaces covalentes sobre soportes que pudieran ser preparados a partir de compuestos naturales como una forma de aprovechar los biorecursos.

SUMARIO

La lignocelulosa, el principal y más abundante componente de la biomasa, está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina en proporciones cuya variación depende de la especie y de la edad del cultivo de la planta. Debido a su abundancia representa una fuente sostenible para la obtención de productos de alto valor agregado dentro de la industria química y de combustibles. De manera tradicional, los procesos para aprovecharla se llevan a cabo a través de medios físicos y químicos que resultan contaminantes, por lo que el estudio de biocatalizadores específicos sobre esos sustratos cobra importancia en pro de favorecer mecanismos amigables con el ambiente.

El xilano es el polisacárido hemicelulósico más abundante en paredes celulares de plantas, representando hasta un tercio de su peso seco. La degradación eficiente del xilano a xilo-oligosacáridos y finalmente a xilosa es mediada por la acción sinérgica de varias enzimas entre las que se encuentran enzimas β -D- xilanasas (EC 3.2.1.8) y 1,4- β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37); éstas últimas degradan xilo-oligómeros liberando unidades de xilosa que pueden participar en el proceso de fermentación, rindiendo productos de alto valor agregado.

Las enzimas con potencial uso en procesos de aprovechamiento de biomasa, cobran relevancia en la promoción del uso de fuentes de energía limpia y renovable, es el caso de la β -xilosidasa de *G. stearothermophilus* la cual ha sido caracterizada en condiciones óptimas, de máxima actividad, sobreexpresada exitosamente por tecnología recombinante y que además ha sido sometida a mutagénesis sitio-dirigida en las que el resultado ha sido una enzima con actividad de transglicosidasa y xilanasas. Estas características de XynB2, de la familia GH52 la hacen un candidato de gran interés para fines industriales.

Por otro lado, la inmovilización de enzimas es un proceso de gran interés por los beneficios que representa el hecho de poder recuperar el biocatalizador en contraposición con el uso de la enzima soluble o libre aplicada en hidrólisis enzimática. La búsqueda de soportes con características especiales y las diferentes técnicas de inmovilización son el objeto de numerosas investigaciones, de allí que la propuesta principal de esta tesis doctoral haya sido inmovilizar el mutante de una β -xilosidasa de *G. stearothermophilus*, XynB2^{Y509E}, utilizando diferentes soportes y técnicas de inmovilización. Se presenta en primer lugar la

estandarización de las condiciones para la sobreexpresión soluble del mutante Y509E de la β -xilosidasa de la familia de las glicohidrolasas (GH52) de *G. stearotermophilus* y su caracterización bioquímica. Al respecto, la mutación Y509 produce pocos cambios en comparación con la enzima *silvestre* expresado en las mismas condiciones. Resalta el pequeño cambio en la concentración del inductor para su expresión en el sistema de *E. coli*. Mientras que la expresión de la enzima nativa se hace con una concentración de 1 mM de IPTG, para la expresión del mutante se utiliza 0,1 mM, lo que podría estar relacionado con pequeños cambios en la estructura producto de la mutación, que podrían generar mayor sensibilidad del mutante a la toxicidad celular del inductor. Los ensayos para la caracterización bioquímica muestran que XynB2^{Y509E} al igual que la enzima nativa, se muestra estable en un amplio rango de valores de pH reteniendo más del 60% de su actividad luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente, asimismo se observan resultados muy cercanos en relación con el efecto de la temperatura y la termoestabilidad, en la que se observa un leve descenso de la temperatura máxima de actividad del mutante Y509E cuando se compara con la forma nativa, que puede explicarse por los cambios de fuerzas estabilizadoras (puentes de hidrógeno) luego de la mutación. Posteriormente se desarrollaron diferentes técnicas para inmovilizar la enzima, a través de distintos métodos y con diferentes soportes.

XynB2^{Y509E} fue inmovilizada de manera exitosa en forma de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs, Cross Linked Enzyme Aggregates), método de inmovilización en el que no se requiere soporte. Se presenta la caracterización bioquímica de la enzima inmovilizada por este método donde se resalta que XynB2^{Y509E}-CLEA retuvo el $92,3 \pm 0,7$ % de su actividad de β -xilosidasa original. Los ensayos con la enzima tanto en su forma soluble como inmovilizada mostraron que los valores de pH y temperatura con actividad máxima después de la inmovilización se mantuvieron sin cambios (pH 6,5 y 65 °C). También se observó una mejora en la estabilidad frente al pH y en la termoestabilidad, así como un aumento importante en la estabilidad operacional después de la inmovilización. El análisis de los parámetros cinéticos muestra que el valor K_M de XynB2^{Y509E}-CLEAs obtenido fue ligeramente superior que la de XynB2^{Y509E} libre (1,2 frente a 0,9 mM). Como un hecho notable, la actividad de xilanas desarrollada por la mutación también se conservó

después del proceso de inmovilización.

La enzima también fue inmovilizada sobre esferas de quitosano, utilizando dos métodos para ello: el atrapamiento y la formación de enlaces covalentes por modificación del soporte con glutaraldehído. Luego de su inmovilización por atrapamiento en esferas de quitosano, la β -xilosidasa inmovilizada mostró mejoras en los parámetros de estabilidad operacional con respecto a la enzima libre. Por ejemplo, se observó ampliación del intervalo de estabilidad llegando a mantener más del 80% de su actividad, luego de incubación durante 1 h a pH 8 así como un aumento de la termoestabilidad, preservando la actividad en más del 90% a 70°C durante 1 h. Respecto a la estabilidad a la estabilidad a 4°C a fin de evaluar los parámetros de almacenamiento se observó que tras 2 meses de almacenamiento en solución tampón pH 6,5 su actividad se preserva en un 45 % de la actividad inicial. En cuanto a la reusabilidad se aprecia que luego de 10 ciclos de reutilización, la enzima inmovilizada en las esferas preserva un 50% de la actividad enzimática original. Los hallazgos presentados sugieren que la inmovilización de esta enzima tendría potenciales uso en el campo industrial.

En referencia a la enzima inmovilizada por enlace covalente sobre esferas de quitosano modificado con glutaraldehído, se encontró que esta forma muestra una estabilidad térmica superior a la enzima libre y a la enzima inmovilizada por atrapamiento ya que después de 1 h de incubación a 70 °C se preserva el 100% de su actividad, incluso conserva hasta el 30% de la actividad inicial luego de permanecer 1 h a 80 °C. La retención de la actividad catalítica dual solo mantuvo en la inmovilización por enlaces covalentes. Bajo las condiciones ensayadas, los resultados muestran que las dos formas de XynB2^{Y509E} inmovilizada exhiben una resistencia mejorada contra la desnaturalización térmica y química respecto a la enzima libre. La enzima inmovilizada puede ser reutilizada hasta 10 veces, sin pérdida significativa de su actividad. Finalmente, en relación con la estabilidad de almacenamiento se encontró que las formas de XynB2^{Y509E} inmovilizadas, como CLEAS y en quitosano, son más estables que la enzima libre, confirmando la idoneidad de la inmovilización como herramienta para incrementar la estabilidad operacional de un biocatalizador.