



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE UNA CELULASA
RECOMBINANTE CON LA EXPANSINA PcEx1
DE *Pectobacterium carotovorum*

Autora

Vanessa Carolina Almache Avendaño

Año
2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE UNA CELULASA
RECOMBINANTE CON LA EXPANSINA PcExI1 DE *Pectobacterium*
carotovorum

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología.

Profesor Guía

Dra. Vivian Morera Córdova

Autora

Vanessa Carolina Almache Avendaño

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Vivian Morera Córdova
Doctora en Ciencias Biológicas
CI: 1756346811

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

Declaro haber corregido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Wilson David Tapia López

Magíster en Gestión y Planificación Ambiental

CI: 1714205281

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos.

Claudia Martínez Anaya

Doctora en Filosofía – Biología Molecular

CI: MAAC700627MDFRNL05

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Vanessa Carolina Almache Avendaño

CI: 1715812515

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con financiamiento de los donativos: CONACYT Ciencia Básica 166050 y DGAPA-PAPIIT IN-211116.

A la Dra. Claudia Martínez Anaya por darme la oportunidad de integrar su grupo de trabajo y haber aportado sus conocimientos.

A la Dra. Mabel Rodríguez por toda la ayuda brindada en la parte molecular de este trabajo.

Al Dr. Lorenzo Segovia por haberme integrado a su laboratorio.

DEDICATORIA

A mi madre, quien cada día creía en mí, me motivaba a ser mejor y me enseñó el trabajo duro.

A mi padre, quien me brindó el apoyo para seguir esta carrera.

A mi hermano, quien día a día quería conocer acerca de mi carrera y me motivó a ser mejor.

A mi abuelita, Marthy quien ha estado conmigo desde mis primeros logros hasta el día de hoy.

A ti, quien eres muchas cosas indescriptibles en palabras en mi vida. Muchas gracias por todo. Sin ti, esto no sería posible

RESUMEN

La pared celular de las plantas está conformada por varios polisacáridos, entre ellos la celulosa, hemicelulosa, y la pectina. La celulosa a su vez, posee regiones cristalinas y amorfas, que son hidrolizadas por la acción de enzimas nombradas como celulasas, endoglucanasas y exoglucanasas. La bacteria *Pectobacterium carotovorum* es notoria por su maceración a la pared celular de las plantas causando la pudrición blanda. La capacidad de destruir las plantas se debe a la expresión y secreción de una amplia gama de enzimas hidrolíticas debido a la acción del sistema de inducción de las bacterias Gram-negativas, el cual incluyen celulasas y expansinas. *P. carotovorum* PC1 FJ890936 se utilizó para el diseño de los cebadores para la amplificación del gen de la celulasa y que incluyera el sitio de exportación celular *pelB*. El producto de la PCR se clonó en el vector de expresión pET22b-PcEx11 y se transformaron en *Escherichia coli*. El peso molecular de cada una de las clonas obtenidas fue de 1267 pb. La estimación de los pesos moleculares de la proteína expresada se realizó usando análisis de SDS-PAGE y se obtuvieron dos bandas de 39 kDa y 32 kDa, respectivamente. La actividad enzimática se llevó a cabo por un ensayo de reducción de liberación de azúcares reductores. Sin embargo, la celulasa no mostró una posible interacción con la expansina PcEx11.

Palabras clave: pared celular, celulasas, expansina, *Pectobacterium carotovorum*.

ABSTRACT

The cell wall of plants is made up of several polysaccharides, including cellulose, hemicellulose, and pectin. The cellulose, in turn, possesses crystalline and amorphous regions, which are hydrolyzed by the action of enzymes named as cellulases, endoglucanases and exoglucanases. The bacterium *Pectobacterium carotovorum* is notorious for its maceration to the cell wall of plants causing soft rot. The ability to destroy plants is due to the expression and secretion of a wide range of hydrolytic enzymes due to the action of the induction system of Gram-negative bacteria, which includes cellulases and expansins. *P. carotovorum* PC1 FJ890936 was used for the design of primers for amplification of the cellulase gene and to include the cell *pelB* export site. The PCR product was cloned into the expression vector pET22b-PcEx1 and transformed into *Escherichia coli*. The molecular weight of each of the clones obtained was 1267 bp. Estimating the molecular weights of the expressed protein was performed using SDS-PAGE analysis and two bands of 39 kDa and 32 kDa, respectively. The enzymatic activity was carried out by a reducing sugar release reduction assay. However, cellulase did not show a possible interaction with the expansin PcEx1.

Keywords: cell wall, cellulases, expansins, *Pectobacterium carotovorum*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema	2
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos	3
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Pared celular de las plantas.....	4
2.2 Enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular.....	9
2.3 Sistema de autoinducción.....	14
2.4 <i>Pectobacterium carotovorum</i>	17
2.5 Expansinas.....	18
3. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL	23
4. PROCEDIMIENTOS.....	24
4.1 Población y muestra	24
4.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos	24
4.2.1 Obtención de la secuencia de una celulasa producida por la cepa <i>Pectobacterium carotovorum</i> BF45.....	24
4.2.2 Clonación de la secuencia de la celulasa obtenida por PCR en <i>E. coli</i> DH5 α	25
4.2.3 Determinación de la actividad enzimática de la celulasa en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) en cajas Petri.....	27
4.2.4 Expresión y extracción de la celulasa en células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	27
4.2.5 Determinación de la liberación de azúcares reductores por acción de la celulasa expresada en <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	29

4.2.6 Extracción de las proteínas intracelulares de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	29
4.2.7 Comparación de la actividad enzimática de las proteínas intracelulares de dos cepas de expresión: <i>E. coli</i> BL21 y <i>E. coli</i> ER2566.....	31
4.2.8 Interacción de la celulasa recombinante con la expansina PcEx1	32
5.1 Obtención de la secuencia de una celulasa producida por la cepa <i>Pectobacterium carotovorum</i> BF45.....	33
5.2 Clonación de la secuencia de la celulasa obtenida por PCR en <i>E. coli</i> DH5 α	35
5.3 Determinación de la actividad enzimática de la celulasa en <i>E. coli</i> BL21 en cajas Petri.....	41
5.5 Determinación de la liberación de azúcares reductores por acción de la celulasa en células <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	45
5.6 Extracción de las proteínas intracelulares de las células <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	49
5.7 Comparación de la actividad enzimática de las proteínas intracelulares de dos cepas de expresión: <i>E. coli</i> BL21 y <i>E. coli</i> ER2566.....	52
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
6.1 Conclusiones.....	56
6.2 Recomendaciones.....	56
REFERENCIAS.....	57
ANEXOS.....	69

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Se ha identificado una cepa de *Pectobacterium carotovorum* aislada de *Nicotiana tabacum*, la cual ha sido nombrada como BF45. La cepa infecta tanto a apio (*Apium graveolens*), brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*), papa (*Solanum tuberosum*) y zanahoria (*Daucus carota* subsp. *Sativus*). Su capacidad infectiva provoca maceración vegetal al inocular tejidos vegetales. Adicionalmente, la cepa BF45 forma cavidades de mayor tamaño en cajas Petri conteniendo solamente pectina.

La búsqueda de genes de expansina en la base de datos del NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*), reveló que *Pectobacterium carotovorum* contiene un gen de expansina (PcExl1), en su genoma. Este gen ha sido clonado y expresado heterológamente en células de *Escherichia coli* (Olarte-Lozano et al., 2014). Estos autores reportaron que PcExl1 es una expansina funcional con la capacidad de unirse a paredes celulares y celulosa, papel de filtro y Avicel. Se conoce que PcExl1 es capaz de debilitar el papel de filtro y aumentar la liberación de azúcares reductores en reacciones que incluyen una celulasa.

Investigaciones aún no publicadas del Laboratorio de Ingeniería de Proteínas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, México, indican que PcExl1 es expresada y secretada al medio extracelular por *P. carotovorum* BF45, tanto cuando crece en medio solamente conteniendo pectina como durante la infección a vegetales. Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado la función de PcExl1 en el proceso de infección. Experimentos de microscopía electrónica indican una fuerte localización de esta expansina en los haces vasculares de la planta, específicamente en el xilema. Este hecho es relevante porque la mayoría de las bacterias patógenas que contienen genes de

expansina en su genoma invaden y se reproducen en el xilema de las especies a las que infectan. Se infiere, que las expansinas pudieran tener una función en la invasión del xilema.

Algunas expansinas bacterianas están naturalmente fusionadas a dominios proteicos. Por ejemplo, a módulos de unión a celulosa o celulasas. No obstante, se desconoce con certeza cuál pudiera ser la función de esta fusión, aunque podría estar relacionada a la actividad hidrolítica. Se conoce que las expansinas de las plantas rompen los enlaces débiles entre los polímeros de la pared celular. De tal manera, las expansinas bacterianas podrían modificar la pared celular durante la infección para que enzimas como las celulasas puedan actuar más eficientemente en un tipo de celulosa como la carboximetilcelulosa (CMC) como se determinó en el laboratorio de Ingeniería de Proteínas de la UNAM. Sin embargo, esto último no ha sido confirmado, y de hecho resultados de otros autores indican que PcEx11 no aporta a la actividad de la celulasa. En el laboratorio de Ingeniería de Proteínas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, México, se han llevado a cabo ensayos de liberación de azúcares utilizando la cepa *P. carotovorum* BF45, en el cual la cepa presenta degradación de un tipo de celulosa, CMC mostrando la existencia de una o más celulasas (Georgelis, et al., 2015).

1.2 Planteamiento del problema

Las expansinas de vegetales son proteínas con capacidad de expansión de la pared celular mediante actividad no hidrolítica, que produce la extensibilidad de la pared celular bajo la presión de turgencia de las células. Muchas expansinas encontradas en vegetales interactúan con celulasas para potenciar su capacidad de extender la pared celular de plantas. Esta interacción se denomina sinergismo expansina-celulasa. Sin embargo, se desconoce si las expansinas de bacterias interactúan de alguna manera con las celulasas durante la infección de *Pectobacterium* a vegetales potenciando el daño. El presente trabajo pretende aportar información relevante a la comunidad

científica con respecto a las posibles interacciones entre una celulasa recombinante de *P. carotovorum*, con la expansina PcExl1.

1.3 Justificación

Es desconocido el mecanismo de acción de las expansinas bacterianas, ni su papel durante la infección a vegetales. El presente trabajo aportará a la comunidad científica el conocimiento de si existe la posibilidad de una potenciación o un sinergismo con una celulasa recombinante y la expansina PcExl1 producida por *Pectobacterium carotovorum* en la infección a vegetales. Además, se proporcionará el conocimiento inicial de cómo se produce la infección a vegetales por parte de *Pectobacterium carotovorum*, mediante el entendimiento de las proteínas involucradas durante la infección.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar la interacción entre la expansina PcExl1 con la celulasa recombinante de *Pectobacterium carotovorum*.

1.3.2 Objetivos específicos

Obtener una celulasa recombinante a partir de la cepa de BF45 de *Pectobacterium carotovorum*.

Determinar la interacción entre la celulasa recombinante con la expansina PcExl1 recombinante de *Pectobacterium carotovorum*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Pared celular de las plantas

Las plantas serían pilotes flexibles de protoplasma sin la pared celular, las cuales se componen de aproximadamente 35 tipos de células, que se distinguen por su tamaño, forma, posición y características de la pared. Las paredes de las células vegetales, se encuentran unidas entre sí para formar la planta desarrollada, las cuales son generalmente gruesas y fuertes (Nakano, Yamaguchi, Endo, Rejab, & Ohtani, 2015).

Todas las paredes celulares en las plantas tienen su propio origen en la división celular, como la placa celular que se forma durante la citocinesis para crear una nueva porción de pared entre las células hijas. Las nuevas células son usualmente producidas en regiones especiales llamadas meristemas, y son generalmente pequeñas en comparación con su tamaño final. Para acomodar subsecuentemente el crecimiento celular, sus paredes, llamadas paredes celulares primarias, son delgadas y extensibles, aunque resistentes (Alberts, Johnson, Lewis, & et al., 2002).

La pared primaria se localiza en todas las células vegetales y está formada por capas de microfibrillas de celulosa. La pared celular en crecimiento es fuerte, estable e inextensible y se encuentra incrustada en una matriz hidratada de polisacáridos como pectinas y hemicelulosas (Figura 1). De igual manera, diversas proteínas y proteoglicanos se encuentran presentes en pequeñas cantidades (Tabla 1) (Cosgrove, 2016).

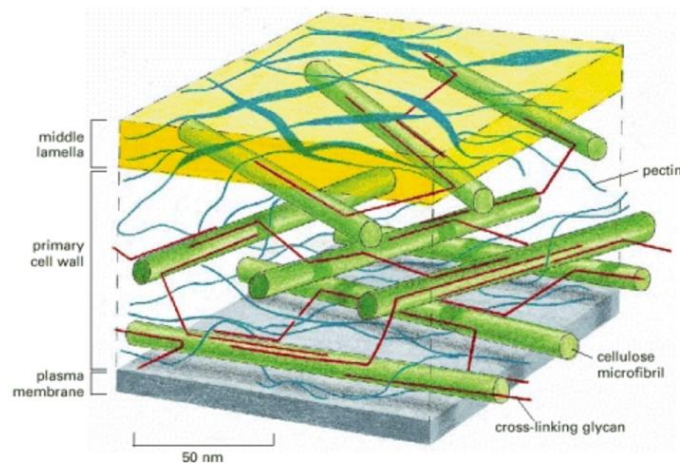


Figura 1. Esquema de la pared primaria de las plantas.

Tomado de Alberts et al., 2002.

a) Las capas ortogonales de microfibrillas de celulosa (verde) se atan en una red por entrecruzamiento de la hemicelulosa (rojo) que forman enlaces de hidrogeno con las microfibrillas. Esta red coexiste con una red de polisacáridos de pectina (azul).

Tabla 1.

Principales polisacáridos que conforman la pared celular de las plantas y sus funciones.

Polímero	Composición	Funciones
Celulosa	Polímeros lineales de glucosa	Las fibras confieren resistencia a la tracción a toda la pared.
Pectina	Homogalacturonanos y ramnogalacturonanos	Cargada negativamente, red hidrofílica que aporta fuerza compresiva a las paredes primarias.
Lignina	Cumaril reticulado, coniferil y sinapil alcoholes	Fuerte polímero impermeable que refuerza las paredes celulares secundarias.
Proteínas y glicoproteínas	Enzimas, proteínas ricas en hidroxiprolina	Responsables de la rotación de la pared y remodelamiento que ayuda a las defensas contra patógenos.

Adaptado de Cosgrove, 2005.

La celulosa es la molécula más abundante en la pared celular, constituye del 20 al 30% del peso seco de la pared. Las moléculas de celulosa proveen resistencia a la pared celular primaria. Cada molécula consiste de una cadena lineal de al menos 500 residuos de glucosa que están covalentemente unidos unos a otros para formar una estructura tipo cinta, que se estabiliza por puentes de hidrógeno. Además, los enlaces de hidrógeno entre moléculas adyacentes de celulosa hacen que se adhieran fuertemente entre sí en la superposición de matrices paralelas, formando un paquete de alrededor de 40 cadenas de celulosa que cuentan con la misma polaridad (Alberts et al., 2002).

En las paredes celulares de las plantas, aproximadamente 36 moléculas individuales de cadenas de celulosa se conectan unas con otras a través de puentes de hidrógeno para formar largas unidades conocidas como fibrillas. Éstas son empaquetadas en microfibrillas más largas de entre 5 a 50 nm de diámetro. Estas microfibrillas poseen regiones desordenadas (amorfas) y regiones altamente ordenadas (cristalinas) (Lynd, Weimer, van Zyl, y Pretorius, 2002).

En las regiones cristalinas, las cadenas de celulosa se encuentran cercanas por una interacción intra e intermolecular de puentes de hidrógeno. La conformación cristalina de la celulosa implica un arreglo estructural en el cual todos los átomos están fijos en posiciones discretas unos respecto a los otros. Una característica del arreglo cristalino es que los filamentos de celulosa que forman las microfibrillas están lo suficientemente empaquetados para evitar la entrada no solamente de enzimas, sino también de moléculas más pequeñas como el agua.

Por otra parte, los dominios amorfos están regularmente distribuidos a lo largo de las microfibrillas. La celulosa amorfa difiere de la cristalina en cuanto al patrón que presentan los filamentos que se unen a la celulosa (Lynd et al., 2002) (Figura 2).

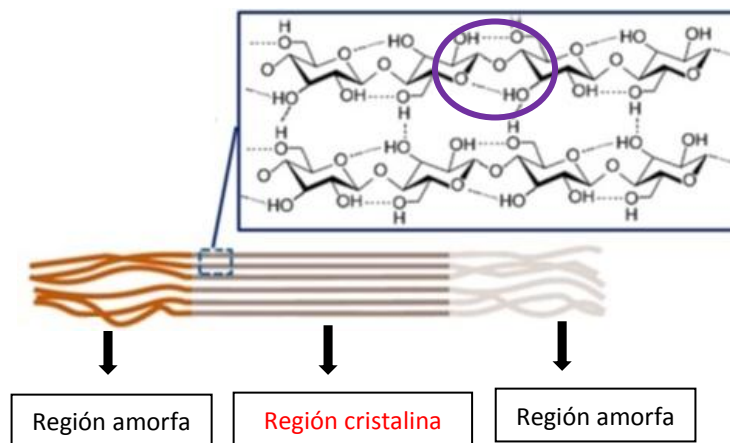


Figura 2. Estructura de la celulosa.

Adaptado de Zhou y Wu, 2012.

a) Regiones cristalinas y amorfas de la celulosa. Marcado en morado se muestran los puentes de hidrógeno entre moléculas de una cadena y entre diferentes cadenas de celulosa.

Otro de los componentes de la pared celular es la hemicelulosa que es un complejo de polímeros de carbohidratos y conforma entre el 25 al 30% del peso seco de la madera. Es un polisacárido con un bajo peso molecular comparado con el de la celulosa. Consiste de D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa, 4-O-metil-glucurónico, D-galacturónico y ácidos D-glucurónicos. Sus azúcares están enlazados por puentes β -1,4 y ocasionalmente β -1,3-glicosídicos (Pérez et al., 2002). La hemicelulosa es un polisacárido altamente ramificado que se encuentra unido por puentes de hidrógeno a la superficie de las microfibrillas de celulosa.

Las hemicelulosas más abundantes son xiloglucanos y arabinoxilanos. Los detalles de su estructura varían ligeramente entre especies de plantas. El xiloglucano tiene una cadena principal que es similar a la de la celulosa, pero que contiene ramificaciones de xilosa entre 3 de cada 4 residuos de glucosa. La xilosa también puede ser añadida con residuos de galactosa y fucosa. Los mananos también son encontrados en la pared celular primaria y probablemente funcionan de la misma manera que el xiloglucano y el arabinoxilano (Cosgrove, 2005).

La principal diferencia entre la celulosa y la hemicelulosa es que la hemicelulosa posee ramificaciones con cadenas cortas laterales que consisten de diferentes azúcares y la celulosa consiste de oligómeros fácilmente hidrolizables (Sánchez, 2009).

Del mismo modo, la pectina es el polisacárido estructuralmente más complejo en la naturaleza que conforma la pared celular de las plantas. (Mohnen, 2008). La pectina son polisacáridos ramificados de que contienen un gran número de residuos de ácido galacturónico cargados negativamente. En las paredes celulares, la pectina forma una red que contiene una variedad de glicoproteínas que está incorporada a la matriz, para proveer soporte estructural (Cooper, 2000).

La pectina también se encuentra presente en las zonas de unión entre las células con las paredes secundarias incluyendo el xilema y las células fibrosas en el tejido maderoso. El más abundante polisacárido péctico es el homogalacturonano (HG). HG es un homopolímero lineal con enlaces α -1,4 que compone alrededor del 65% de la pectina. EL HG se encuentra parcialmente metilesterificado al carboxil C-6 y puede ser O-acetilado en O-2 u O-3. Se ha demostrado que HG puede estar presente en tramos de aproximadamente 100 residuos de longitud, aunque se han detectado regiones cortas de HG que se encuentran intercaladas entre otros polisacáridos. Otros polisacáridos considerablemente más complejos en la estructura de HG incluyen al ramnogalacturonano, xilogalacturonano y apiogalacturonano (Mohnen, 2008).

Finalmente, la lignina es un heteropolímero amorfo, insoluble, ópticamente inactivo que está formado de fenilpropanos. Este polímero es sintetizado por la generación de radicales libres, que son liberados en la deshidrogenación por una peroxidasa mediada por tres alcoholes fenil-propiónicos: alcohol

coniferílico (guayacil propanol), alcohol cumaril (p-hidroxifenil propanol), y alcohol sinapílico, unidos por enlaces C-C y enlaces tipo éter entre los anillos aromáticos. La misma está ligada a la celulosa y la hemicelulosa, formando un sello físico que es una barrera impenetrable en la pared celular de las plantas. Además, está presente para proporcionar soporte estructural, impermeabilidad y resistencia contra el ataque de patógenos y al estrés oxidativo. (Sánchez, 2009)

2.2 Enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular

La celulosa se hidroliza en glucosa a través de la acción sinérgica de varias enzimas. Estas enzimas hidrolíticas conocidas como celulasas incluyen un complejo de al menos tres enzimas diferentes para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa. Las celulasas son O-glucósido-hidrolasas (GHs) que hidrolizan los enlaces β -1,4 de la celulosa. Se encuentran en todos los reinos, pero predominantemente en los procariontes y hongos (Hildén y Johansson, 2004).

El proceso de hidrólisis de la celulosa es llevado a cabo por la acción de tres enzimas. Las endoglucanasas (EC 3.2.1.4) que rompen las cadenas de celulosa en posiciones amorfas dentro de las cadenas. Las exoglucanasas, también conocidas como celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), escinden celobiosa específicamente de la cadena terminal. Y finalmente la celobiosa que es hidrolizada a glucosa por la enzima β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) (Kuusk et al., 2015).

El sinergismo exo-endo se explica por el hecho de que las endoglucanasas proporcionan más extremos a la cadena de celulosa, para que sobre éstas actúen las celobiohidrolasas. La hidrólisis de la celulosa insoluble, es una reacción heterogénea, que no coincide con los modelos cinéticos propuestos por Michaelis-Menten. Después de una fase inicial de adsorción de celulasas en celulosa, que son rápidas en comparación con la hidrólisis, las enzimas se

separan de la celobiosa y se mueven a lo largo de la misma cadena, para hidrolizar enlaces glicosídicos (Blanchette et al., 2012 ; Hall et al., 1995).

Una característica estructural de la mayoría de las celulasas y otras glucósido-hidrolasas es su estructura modular que incluye: el dominio catalítico (CD), un péptido de unión altamente O-glicosilado (linker), y un módulo de unión a celulosa (CBM, del inglés *cellulose binding module*) (Figura 3).

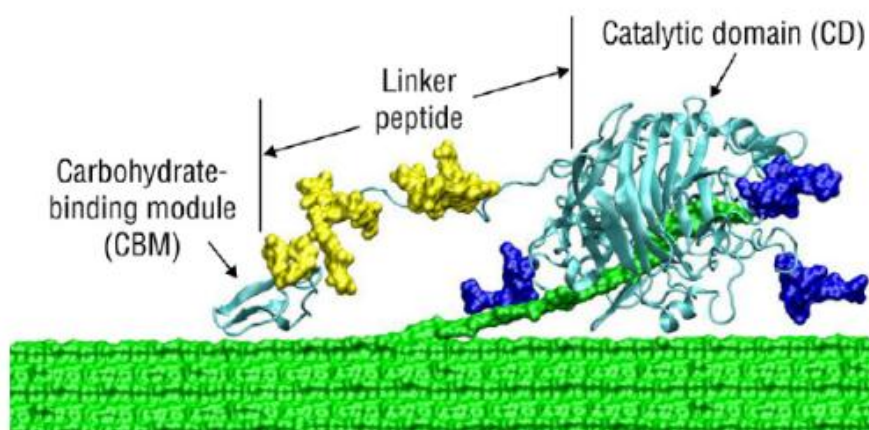


Figura 3. Estructura de una exoglucanasa.

Tomado de Júnior et al. 2013.

a) Se muestra el CBM, el linker y el dominio catalítico.

Entre los componentes de las celulasas, se encuentran los CBMs, que son a menudo componentes de enzimas que hidrolizan xilanos, mananos y pectinas. Los CBMs unen las hidrolasas a la pared celular para mejorar significativamente la actividad enzimática de los sustratos insolubles. Los CBMs se pueden agrupar en familias sobre la base de conservación de plegamientos proteicos. Sin embargo, estas agrupaciones no son siempre predictivas de la función ya que existe suficiente diversidad de plegamientos entre los miembros de las familias de tal manera que los elementos funcionales, ya sean aminoácidos de unión al sustrato, no se encuentran conservados. Otra clasificación de los CBMs se hace en base a similitudes estructurales y funcionales de tres tipos: CBMs tipo A que unen superficies de polisacáridos cristalinos, tales como la celulosa y se encuentran entre celulasas

y también en enzimas no celulolíticas, los CBMs tipo B, que unen internamente cadenas de carbohidratos simple, y los CBMs tipo C que se unen a los extremos de una gran variedad de polisacáridos (Boraston, et al., 2004; Hervé et al., 2010).

Otro componente de las celulasas, es el péptido de unión que es una secuencia de aminoácidos que conecta el módulo de unión a celulosa y el dominio catalítico de las celulasas. Estas regiones no tienen una estructura definida. Mientras los péptidos de unión varían en composición, generalmente muestran un sesgo en el contenido de aminoácidos que detalla una falta de aminoácidos hidrófobos que son frecuentes en los núcleos de proteínas estructuradas. El sesgo en el contenido de aminoácidos se manifiesta en las secuencias de baja complejidad. Cabe destacar, que esta región es típicamente rica en prolina, treonina y serina (Sammond et al., 2012).

Las celulasas se clasifican en: exoglucanasas (1,4- β -D-glucano celobiohidrolasas) que se encuentran secuencialmente unidas a unidades de azúcares de la cadena de celulosa, y endoglucanasas (1,4-(1,3;1,4)- β -D-glucan 4-glucanohidrolasas) que también penetran a la cadena de las posiciones internas. Estas enzimas representan entre el 40 y el 70% del componente total del sistema de celulasas y son capaces de hidrolizar la celulosa amorfa y cristalina, como se aprecia en la Figura 4. (Hildén y Johansson, 2004)

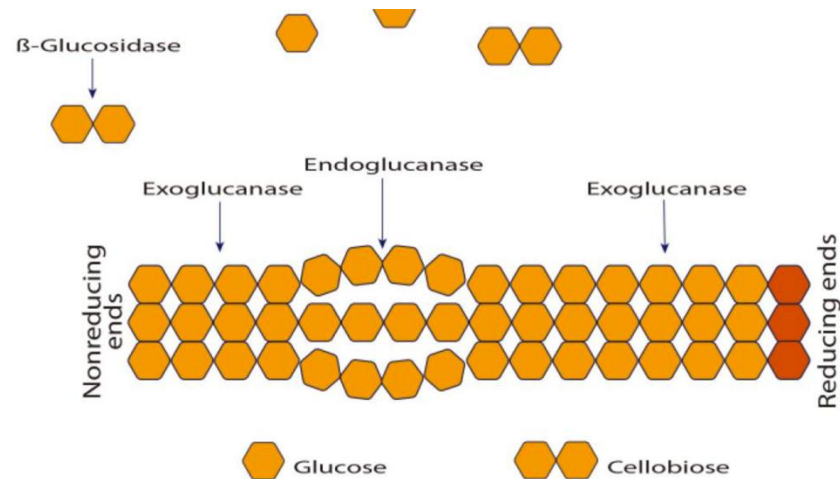


Figura 4. Figura de las enzimas involucradas en la hidrólisis de la celulosa.

Tomado de Dalmaso, et al. 2015.

a) Exo- β -1,4-gluconasa y celobiohidrolasa hidrolizan los extremos glicosídicos liberando unidades de celobiosa. Las β -glucosidasas actúan directamente en la celobiosa hidrolizándola a glucosa.

Una típica exoglucanasa presenta una estructura globular con un sitio activo en forma de túnel, el mismo que está rodeado de varias láminas- β antiparalelas. Dentro se encuentran sitios conservados, como el triptófano 23 (W23) que sirve como punto de anclaje para los sustratos. Para acomodar el sustrato, varias hélices se encuentran alrededor del túnel y proporcionan flexibilidad a la región.

En contraste, la estructura de una endoglucanasa típica posee una hendidura poco profunda en lugar de un túnel en el sitio activo, la cual le proporciona un fácil acceso para las fibras celulósicas que todavía se encuentran fuertemente empaquetadas (Zhang et al., 2015). Las endoglucanasas cortan sitios aleatorios en sitios amorfos internos en la cadena de polisacáridos de la celulosa, generando de esta manera, oligosacáridos de varios tamaños y consecutivamente nuevos extremos terminales de la cadena susceptibles a ser hidrolizados por exoglucanasas (Lynd et al., 2002).

Los modos de acción de las endoglucanasas y las exoglucanasas difieren en que las endoglucanasas disminuyen significativamente la viscosidad específica del CMC mediante la hidrólisis, mientras que las exoglucanasas hidrolizan las cadenas largas de los extremos de forma progresiva (Dashtban et al., 2010).

La celulosa utilizada para ensayos de hidrólisis varía considerablemente en sus características estructurales. Por ejemplo, la celulosa microcristalina (Avicel) es celulosa pura obtenida a partir de tratamientos químicos donde se ha removido la hemicelulosa y las regiones amorfas de la fibra. La complejidad estructural de la celulosa pura y la dificultad para trabajar con sustratos insolubles ha conllevado a la utilización de un tipo de celulosa soluble el CMC, que contiene regiones amorfas susceptibles de ser hidrolizadas (Lynd et al., 2002).

Otra enzima capaz de degradar la pared celular de las plantas es la hemicelulosa que es biodegradable a azúcares monoméricos y ácido acético. El xilano es el principal carbohidrato de la hemicelulosa y su degradación requiere de varias enzimas, entre ellas las xilanasas (Pérez, et al., 2002).

Las xilanasas son hidrolasas glicosidasas que se encuentran principalmente en los hongos, que catalizan la endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-xilosídico del xilano. La gran mayoría de las xilanasas se secretan al medio extracelular debido al gran tamaño del sustrato que impide su penetración en la célula. (Collins et al., 2005).

Finalmente, entre las enzimas involucradas en la degradación de la pared celular se encuentran las pectinasas. Estas enzimas catalizan la degradación de las sustancias pécticas a través de la despolimerización (hidrolasas y liasas) y reacciones de desesterificación (esterasas), y ayudan a comprender la estructura de la pectina, que es un polisacárido estructural que forma el componente de la pared celular primaria. La pectina está implicada en la reticulación de fibras de celulosa y hemicelulosa, así entonces las pectinasas

ayudan a mejorar el acceso de celulasas a sus sustratos. Las pectinasas incluyen principalmente poligalacturonasas, pectina esterasas, pectina liasas (PNL), y pectato liasas con diferentes especificidades de sustrato. Las pectinasas actúan sobre la pared celular vegetal disminuyendo la adhesividad y la rigidez del tejido intracelular (Kohli y Gupta, 2015).

2.3 Sistema de autoinducción

El sistema de autoinducción fue descubierto y descrito hace más de 25 años en dos especies de bacterias marinas luminosas: *Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi*. En ambas especies las enzimas responsables son codificadas por el operón luciferasa estructural *luxCDABE*. La emisión de luz ocurría solamente a alta densidad de células en respuesta a la acumulación de moléculas de señalización autoinductoras secretadas (Miller y Bassler, 2001).

La gran mayoría de los sistemas de autoinducción de bacterias Gram-negativas que se han estudiado hasta ahora utilizan N-acilo homoserín lactonas (AHL) como moléculas de señalización. En altas concentraciones, estas moléculas pueden unirse y activar la transcripción, proteínas R y la molécula autoinductora (AI), que a su vez inducen la expresión de los genes diana (Figura 5). La acumulación de AI se produce de manera dependiente de la densidad celular hasta que alcanza un nivel de umbral. En este momento el AI se une y activa la proteína R, que a su vez induce la expresión de genes. La proteína R consta de dos dominios: el extremo N de la proteína que interactúa con AI y el extremo C terminal que está implicado en la unión a ADN.

Se han identificado moléculas de AHL que contienen cadenas laterales de acilo de 4 a 14 carbonos o bien un grupo oxo, un grupo hidroxilo, o ninguna sustitución en el tercer carbono. Sólo dos AHL que llevan dobles enlaces se han identificado: 7,8-cis-N-(3-hydroxytetradecenoyl) homoserina lactona

producida por *Rhizobium leguminosarum* y 7,8-cis-N-(tetradecenoyl) homoserina lactona de *Rhodobacter sphaeroides* (de Kievit e Iglewski, 2000).

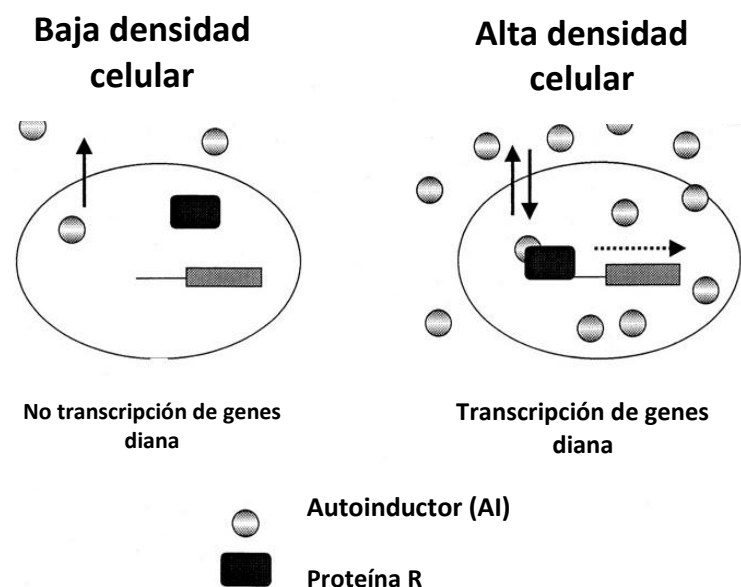


Figura 5. Esquema representativo del sistema de autoinducción.

Adaptado de de Kievit e Iglewski 2000.

a) El sistema de autoinducción en organismos Gram-negativos involucra dos componentes de regulación: la proteína activadora de la transcripción (proteínas R) y la molécula AI (autoinductor).

El modelo básico de la regulación génica mediada por AHL implica un regulador transcripcional (llamado proteína R) y una AHL sintasa (llamada proteína I) (Figura 6). La proteína R puede reconocer secuencias promotoras específicas y estimular la expresión génica sólo cuando forma un complejo con la AHL. Típicamente, la AHL sintasa se expresa en niveles bajos y, en bajas densidades celulares. A medida que aumenta la población celular bacteriana, las AHLs se acumulan hasta que suficiente AHL se encuentra presente para asegurar su unión a la proteína R, dando como resultado la unión de la proteína R a sus secuencias del promotor objetivo (Loh, et al., 2002).

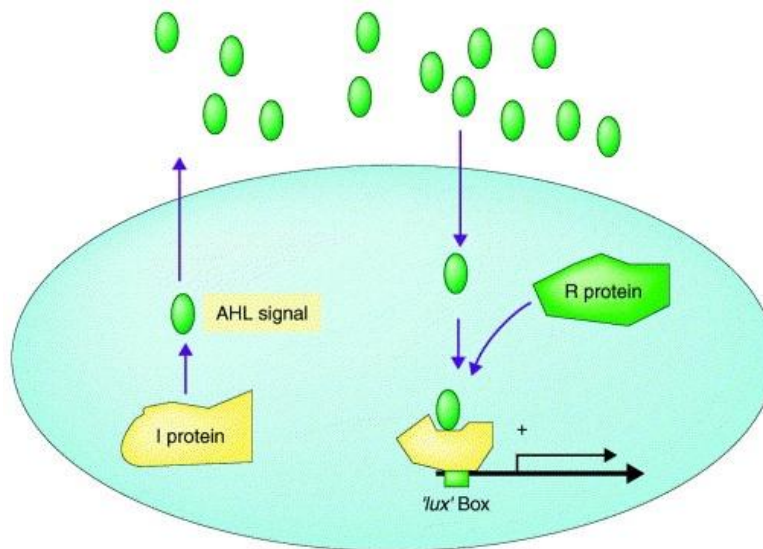


Figura 6. Sistema de autoinducción mediado por AHL por proteínas I y R.

Tomado de Loh et al., 2002.

a) La célula bacteriana (en verde) contiene una proteína I que es responsable de la síntesis de señales libremente difusibles (óvalos verdes). En una alta densidad celular, la señal se acumula intracelularmente e interactúa con la proteína R.

Existen dos tipos de reguladores transcripcionales conocidos que funcionan como proteínas R. Una requiere una señal de AHL para unir al ADN, mientras que la segunda une al ADN únicamente en ausencia de la señal AHL. El único ejemplo conocido de esta última es EsaR del patógeno de marchitez *Pantoea stewartii*.

La región carboxilo-terminal de todas las proteínas R conocidas contiene un motif conservado hélice-giro-hélice que es requerido para la unión al ADN. Dicha región carboxilo-terminal también contiene un segundo dominio que se encuentra involucrado en la multimerización de las proteínas R que son requeridas para la unión al ADN, ya que muchas proteínas R se unen al ADN como dímeros.

Sin embargo, *CarR* de *Pectobacterium carotovorum*, forma un orden superior de multímetros tras la unión de la AHL. Tras la unión de la caja *lux*, las

proteínas R tienen como objetivo estimular la transcripción por interacción con el extremo carboxilo-terminal de la ARN polimerasa subunidad α . El amino-terminal de la proteína R está implicado en dos aspectos que son críticos para su función: en primer lugar, en ausencia de AHL se inhibe su unión a la caja *lux*; en segundo lugar, contiene el sitio de unión a AHL que se ha demostrado ser necesaria para el plegamiento apropiado de TraR de *Agrobacterium tumefaciens* y su resistencia a la degradación proteolítica (Loh et al., 2002).

2.4 *Pectobacterium carotovorum*

Pectobacterium es un género bacteriano Gram-negativo, que causa la pérdida de vegetales de interés comercial. Es considerado dentro de las 10 bacterias patógenas más dañinas de las plantas, y causa la enfermedad del pie negro en temperaturas templadas (Mansfield et al., 2012). Así mismo, se caracteriza por la producción de grandes cantidades de enzimas péctinolíticas extracelulares, junto con una amplia gama de otras enzimas degradadoras, celulasas y proteasas, de la pared celular de las plantas para causar la enfermedad de la pudrición blanda. Se han identificado caracteres de patogenicidad asociados, que también podrían estar implicados en el establecimiento de la infección en los tejidos vegetales (Pérombelon, 2002).

Las enzimas degradadoras de la pared celular de las plantas (PCWDE, del inglés *plant cell wall degrading enzymes*) y otros factores de virulencia en el género *Pectobacterium* ocurre por detección del sistema de autoinducción (Barnard et al., 2007). Este sistema se da a una temperatura óptima de 30°C en *P. atrosepticum* y a una temperatura mayor a 33°C no muestra una buena infección a los vegetales susceptibles (Saha et al., 2015).

La fitopatogenicidad de *P. carotovorum* depende de la producción de varias enzimas que degradan los tejidos de las plantas, que incluyen liasas, poligalacturonasas, celulasas y proteasas. Estas enzimas están involucradas

en la maceración del tejido de las plantas resultado de la colonización de la bacteria al huésped. La producción de enzimas por solo unas pocas células de *P. carotovorum* no permitiría una afección en el tejido de la planta mientras que podría activar mecanismos defensivos de las plantas. Por lo tanto, *P. carotovorum* hace uso del sistema de autoinducción, que asegura que la producción de exoenzimas no ocurra hasta que existan el número suficiente de bacterias para la destrucción exitosa del tejido y la evasión de las defensas de las plantas. Esta regulación se basa en los homólogos LuxRI, ExpR y Expl que controlan la expresión de las enzimas de maceración del tejido de manera dependiente de la densidad celular. Los roles exactos de ExpR y su análogo AHL, 3-oxo-C6-HSL, en la regulación exoenzimática no es todavía clara. Estudios han demostrado que la cepa *expl1* mutante es deficiente en la producción de exoenzimas y no permite la maceración de los tejidos de la planta; sin embargo, una mutante en *expR* no afecta la producción de enzimas (Bassler, 1999).

Varias especies y bacterias de géneros relacionados a *Pectobacterium* producen AHLs del tipo N-(3-oxohexanoil)-L-homoserin lactona (OHL). El sistema más estudiado es el que opera en *Pectobacterium carotovorum*. Estudios han establecido que se requiere la producción de OHL por subespecies de *P. carotovorum* para su patogenicidad y la síntesis de exoenzimas, y antibióticos (Welch et al., 2000).

2.5 Expansinas

Las expansinas son proteínas que están involucradas en la remodelación de la pared celular induciendo la extensibilidad y el relajamiento de la tensión en las paredes celulares de las plantas. Las expansinas se descubrieron primero en hipocotilos de pepino, en los que aflojan la pared celular de una manera no enzimática pero dependiente del pH (Lee y Kende, 2002).

Las expansinas no tienen actividad hidrolítica, glucosidasa, por lo que se ha propuesto que rompen los puentes de hidrógeno que se encuentran entre los filamentos de celulosa o entre la celulosa y otros polisacáridos a través de un mecanismo no enzimático (Cosgrove, 1998).

El dominio 1 (D1), localizado en el amino-terminal tiene una estructura DPBB (del inglés *double psi beta barrel*) y es homólogo al dominio catalítico de los miembros de la familia 45 de las glucósido-hidrolasas (GH45), que incluye β -1,4-endoglucanasas de origen fúngico. (Sampedro y Cosgrove, 2005).

El dominio 2 (D2), que se ubica en el extremo carboxilo terminal es homólogo a los alérgenos de polen de pastos del grupo 2, y se sabe que una polisacáridos a través de aminoácidos aromáticos en la superficie de la proteína, en donde dos triptófanos y una tirosina forman una plataforma plana para la unión. El D2, tiene un plegamiento del tipo β -sándwich formado por dos cubiertas de 4 láminas β anti paralelas cada una (Figura 7) (Cosgrove, 2000).

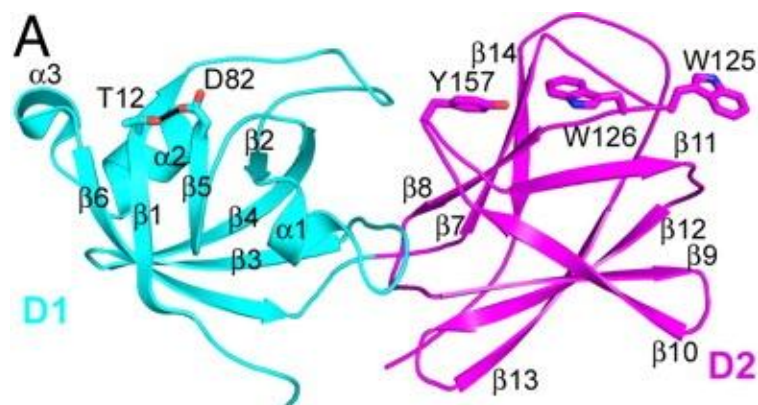


Figura 7. Esquema representativo de una expansina.

Tomado de Kerff et al., 2008.

a) Dominio D1 y D2 de una expansina.

Las expansinas típicamente contienen alrededor de 225 aminoácidos (26 kDa) adicionalmente a un péptido señal amino-terminal que dirige la proteína a la

ruta secretora. La definición de expansina y la nomenclatura de “expansina” y proteínas “tipo expansina” se usa para proteínas que contienen los dos dominios estructurales característicos de las expansinas de plantas; las proteínas que solo tienen uno de estos dominios no pueden ser clasificadas como expansinas (Lee y Kende, 2002; Sampedro, et al., 2006).

Las expansinas comprenden una superfamilia que se divide en cuatro subfamilias: α -expansinas, β -expansinas, expansinas tipo A o EXPA y expansinas tipo B o EXPB., según su secuencia y sus relaciones filogenéticas. Las α -expansinas participan en el relajamiento y extensión de la pared celular por un mecanismo dependiente del pH. Las principales diferencias entre las α -expansinas y β -expansinas se basa en número de genes en diferentes especies vegetales (Cosgrove, 1998; Marowa, et al., 2016).

La designación de expansinas bacterianas (EXLX) fue reservada para genes que cumplen con los siguientes criterios: i) que no ocurran en plantas; ii) que sus productos proteicos sean homólogos en ambos dominios de las expansinas; y iii) que no se establezcan dentro de las familias de genes de las expansinas establecidos en el análisis filogenético (Georgelis et al., 2015).

El argumento de que las expansinas bacterianas y vegetales son homólogas, se basa en su actividad y características estructurales compartidas. Estos incluyen la disposición espacial de dos dominios, cada uno de los cuales tiene el mismo plegamiento en las proteínas vegetales y bacterianas; el mismo residuo catalizador conservado en el dominio D1 de las proteínas vegetales y bacterianas; y la existencia de una superficie abierta conservada que se extiende por los dos dominios y está poblada por residuos adecuados para la unión de una larga cadena de polisacáridos (hasta 12 residuos) (Georgelis, et al., 2012).

Los genes codificantes de expansinas en las bacterianas se encuentran en los genomas de algunos patógenos de plantas, incluyendo especies de

Xanthomonas, *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Pectobacterium* y *Xylella*. Sin embargo, no se encuentran en *Pseudomonas*, *Agrobacterium* o *Rhizobium*. El primer grupo, conocido como marchitador vascular, incluye principalmente a colonizadores del xilema dentro de los sistemas vasculares de las plantas, mientras que el segundo grupo tiene diferentes modos de interacción con los huéspedes vegetales. Por lo tanto, la ausencia de expansinas de *Pseudomonas*, *Agrobacterium* y *Rhizobium* sugiere que las mismas confieren una ventaja única con modos selectivos de infección y la colonización vegetal (Georgelis et al., 2015). En algunos casos se ha encontrado un solo gen de la expansina, pero también se han encontrado excepciones, como *Clavibacter michiganensis* que tiene un gen de expansina en el cromosoma principal y una expansina fusionada a una endoglucanasa en el dominio C-terminal (Nikolaidis, et al., 2014).

Georgelis et al., 2012, demostraron que las estructuras cristalográficas de complejos expansina-celoheptaosa y un ligando de seis oligosacáridos de celulosa, interactúan hidrofólicamente a través de tres residuos aromáticos dispuestos linealmente, W125, W126, Y157, en el dominio D2, al cambiar por alanina estos residuos, mediante mutagénesis dirigida. La mutante resultante, nombrada "WWY", mostró disminución en la unión a celulosa y pérdida de la actividad de elongación de tejidos vegetales. Se generó también una mutante en residuos polares en la cara opuesta a la superficie de unión al polisacárido de BsEXLX1 en el dominio D2 que redujeron su capacidad para unirse a las paredes de las plantas, pero no mostró afección en la unión a la celulosa. Estos resultados muestran que la expansina EXLX1 puede interactuar con la pared celular a través de interacciones hidrofólicas y polares. La pérdida completa de la actividad de aflojamiento de la pared ocurrió con la mutante D82A, residuo que corresponde al donador de protones en la reacción catalítica de las endoglucanasas GH45.

Las expansinas y las proteínas tipo expansinas, tradicionalmente están conformadas por los dos dominios D1 y D2. Sin embargo hay genes de

expansinas microbianas que se encuentran fusionados a otros módulos (Nikolaidis et al., 2014)

3. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

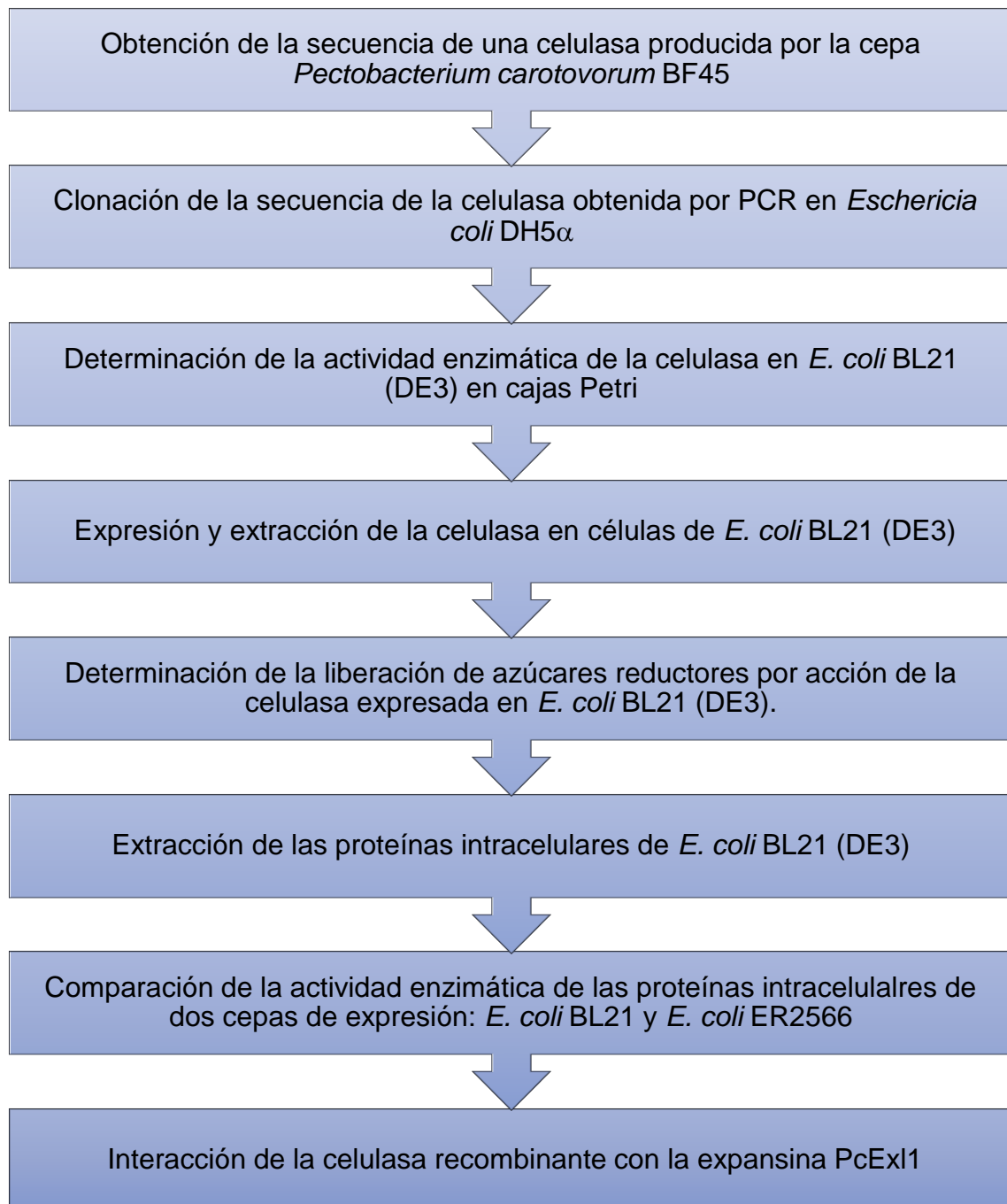


Figura 8. Diseño del plan experimental.

4. PROCEDIMIENTOS

4.1 Población y muestra

El laboratorio de Diseño de Proteínas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México posee una cepa de *Pectobacterium carotovorum* donada por el Dr. Óscar Mascorro de la Universidad Autónoma de Chapingo, cuyo nombre asignado fue BF45, la cual fue aislada de *Nicotiana tabacum*.

El gen de la expansina PcEx11 fue insertado en el plásmido pET22b-PcEx11 en el Laboratorio de Síntesis de Proteínas del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Autónoma de México.

4.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos

4.2.1 Obtención de la secuencia de una celulasa producida por la cepa *Pectobacterium carotovorum* BF45

La secuencia para el diseño de los oligonucleótidos se obtuvo de una celulasa reportada en el genoma de la cepa *Pectobacterium carotovorum* PC1, depositada en la base de datos del NCBI con número de acceso FJ890936. En base a esta celulasa se determinó el fragmento correspondiente al péptido señal de exportación extracelular para el diseño de los oligonucleótidos a partir de la secuencia madura y hasta el codón de paro de la secuencia de codificación (CDS, del inglés Coding Sequences). Los oligos fueron sintetizados por la compañía Sigma-Aldrich (EEUU), e incluían sitios de digestión de las enzimas Not y Sfi.

La extracción del DNA genómico de *Pectobacterium carotovorum* BF45 se llevó a cabo con el uso del juego de reactivos PureYield™ Plasmid Miniprep System. Una vez que se extrajo el DNA, se determinó la pureza y la concentración

mediante el NanoDrop 2000. A continuación, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual se llevó a cabo una mezcla maestra para 7 reacciones. Se mezclaron 28 μL de solución tampón 10x, 35 μL de dNTPs 10x (200 μM), 42 μL de cloruro de magnesio (MgCl_2)10x (3mmol/L), 3,5 μL de Taq polimerasa, oligo forward y reverse (14 μL) y 206, 5 μL de agua (H_2O). Se distribuyeron 49 μL en 6 tubos diferentes a los cuales se añadió 1 μL de DNA genómico de la cepa *P. carotovorum* BF45. Las condiciones de reacción empleadas por el termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 4 min, desnaturalización a 95 °C por 30 s, anidamiento con gradiente entre 55 a 67 °C por 30 s, extensión de 72 °C por un minuto con 30 s y extensión final de 72 °C por 5 min. Este programa se ejecutó por 30 ciclos.

Posteriormente, se realizó un gel de agarosa al 0,8% donde se pesaron 0,4 g de agarosa y se diluyeron en 50 mL de solución tampón TAE 1x (Tris-acetato-EDTA), se colocó 3 μL de bromuro de etidio en la solución de agarosa. Se cargaron 10 μL de la reacción de PCR y se corrió el gel de agarosa por aproximadamente 45 min a 100 V, con el marcador de peso molecular de DNA.

4.2.2 Clonación de la secuencia de la celulasa obtenida por PCR en *E. coli* DH5 α

Para la clonación de la secuencia se preparó al vector y al plásmido, razón por la cual se inició con la digestión del plásmido pET22b-PcEx1 y el producto de la PCR, los cuales se digirieron de la siguiente manera: producto de la PCR (1 μg) 10 μL , solución tampón tango 10x 2 μL y 7 μL de H_2O . La digestión enzimática se realizó en dos etapas: en la primera etapa se agregó 1 μL de Sfi y se incubó a 50 °C durante 1 hora y 30 min. Una vez concluida la primera etapa, se agregó 1 μL de NotI a 37 °C por 1 hora 30 min. Se visualizaron las bandas en un gel de agarosa al 0,8% y se procedió su purificación mediante el juego de reactivos de Roche.

El programa NeBioCalculator permitió calcular la masa del inserto requerido para la construcción del vector. Las bandas purificadas de DNA se cuantificaron usando el NanoDrop 2000. En la ligación se utilizó una relación 3:1, donde se tomaron 5 μL del vector, 2 μL de la solución tampón de ligación, 2 μL del inserto, 1 μL de la ligasa y 9,8 μL de H_2O . Se tomaron las mismas cantidades para el control negativo, exceptuando los 2 μL del inserto que fueron reemplazados con H_2O . Se dejó actuar aproximadamente por 4 horas a 37°C .

Para la clonación del plásmido pET22b-Cel obtenido en la ligación, se emplearon las células *E. coli* DH5 α . Las células se encontraban en hielo, junto con dos celdas de electroporación. El proceso se llevó a cabo en la campana de flujo en donde se colocaron 20 μL del producto de la ligación en la celda junto con las células y se procedió a dar un shock eléctrico de 1,8 kV, con una duración de 3 milisegundos. Inmediatamente después de la electroporación el contenido se pasó a un tubo de cultivo que contenía medio SOC (medio líquido súper óptimo). El control negativo al realizar la electroporación tuvo una duración de 2,5 milisegundos. Tanto las células transformadas como el control negativo se dejaron recuperar por 3 horas a 37°C a 200 rpm.

Posteriormente las células fueron sembradas en cajas de Petri con medio LB agar con 100 mg/mL de ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C . Las colonias resistentes al antibiótico fueron colocadas en cultivo LB para la extracción del plásmido utilizando el juego de reactivos High Pure Plasmid Isolation. La secuencia de la clonación se verificó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT.

Finalmente, se tradujo a la secuencia *in silico*, para conocer el peso molecular esperado para los siguientes ensayos. Posteriormente se realizó un alineamiento entre la secuencia obtenida de *Pectobacterium carotovorum* BF45

y *Pectobacterium carotovorum* PC1 con el uso del programa Clustal W2 disponible en la web.

4.2.3 Determinación de la actividad enzimática de la celulasa en *E. coli* BL21 (DE3) en cajas Petri

Para la preparación de cajas de LB que contienen CMC e IPTG (100 mL), se pesaron los siguientes reactivos: CMC 0,5 g., nitrato de sodio (NaNO_3) 0,1 g., fosfato dipotásico (K_2HPO_4) 0,1 g., cloruro de potasio (KCl) 0,1 g., sulfato de magnesio (MgSO_4) 0,05 g., extracto de levadura 0,05 g., glucosa 0,1 g., y agar 1,7 g. Cada uno de los reactivos se colocaron en el orden mencionado anteriormente y se esterilizaron a 120°C por 15 min. En las cajas Petri se colocaron 50 mL de medio agar CMC y 50 μL de ampicilina y una vez solidificado se esparció IPTG 100 mmol/L por toda la caja. De un cultivo de 10 diferentes clonas transformantes con el plásmido pET22-Cel previamente crecidas en medio LB con ampicilina, se colocaron 3 μL del cultivo líquido de las bacterias y una vez que se secaron la caja se incubó a 37°C por 48 horas. Después, se procedió a retirar el crecimiento de las colonias mediante tres lavados de aproximadamente 5 min con buffer PCA 50 mmol/L a un pH de 5,2 (50 mmol/L fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), 50 mmol/L ácido cítrico). Para revelar la actividad de la celulasa se colocó Rojo Congo al 0,1% por media hora y se retiró con cloruro de sodio (NaCl) 1 mol/L y finalmente se adicionó ácido acético al 10% para teñir la caja de color morado.

4.2.4 Expresión y extracción de la celulasa en células de *E. coli* BL21 (DE3)

El producto pET22b-Cel una vez purificado, se insertó en células de *E. coli* BL21 para la expresión de la celulasa. Las células de *E. coli* BL21 fueron insertadas junto con el plásmido y se dejaron reposar por 30 min en hielo. Posteriormente, se realizó un choque térmico a 42°C por 45 s. A continuación, se transfirieron a hielo. Se trasladaron 60 μL de las células a un tubo con 1 mL

de medio líquido LB y se incubaron por una hora a 37°C y 200 rpm. En una caja de medio sólido LB con 100 mg/mL de ampicilina, se flanquearon 200 µL de las células transformadas y se incubaron durante toda la noche a 37°C sin agitación.

La expresión de la proteína se realizó en matraces de 250 mL que contenían: 25 mL de medio LB, 25 µL de ampicilina (100 mg/mL) y 25 µL de cultivo de las células de *E. coli* BL21 transformantes a 37°C y 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0,8. La inducción se realizó utilizando 2,5 µL de IPTG y se continuó con la incubación durante toda la noche a 16°C y 200 rpm.

El plásmido pET22-Cel contiene un péptido señal de exportación al periplasma, por lo cual se realizó la extracción de la proteína mediante ósmosis, rompiendo la membrana mediante el empleo de dos soluciones nombradas como SET y MgSO₄·7H₂O. Se colocaron en dos tubos de Falcón los cultivos inducidos y se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min, luego se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 5 mL de la solución SET, el cual se mantuvo en frío por 20 min y se centrifugó a 7000 rpm por 30 min. Una vez terminada la centrifugación se recolectó el sobrenadante. Se resuspendió nuevamente el pellet con 5 mL de la solución de MgSO₄, se mantuvo en frío por 20 min y se centrifugó nuevamente a 7000 rpm por 30 min. Al finalizar se almacenó el sobrenadante.

Posteriormente, se prepararon las muestras tanto de la solución SET como las de MgSO₄ para ser visualizadas en un gel de poliacrilamida al 12%. Se tomaron 15 µL de H₂O, 2,5 µL de solución tampón de carga 4x, 2,5 µL de cada una de las soluciones de extracción. El gel se corrió a un amperaje de 20 mA.

Debido a la conformación de la celulasa clonada se decidió añadir el ión calcio al medio. La expresión de la proteína se realizó en matraces de 250 mL que contenían: 25 mL de medio LB, 25 µL de ampicilina (100 mg/mL), 20 mmol/L de calcio y 25 µL de cultivo de las células de *E. coli* BL21 transformantes. Las

células se incubaron a 37°C y 200 rpm, hasta alcanzar una DO_{600} de 0.9. La inducción se realizó utilizando 2,5 μ L de IPTG y se continuó con la incubación durante toda la noche a 16°C y 200 rpm. Posterior, se visualizaron las proteínas en un gel de SDS-PAGE al 12%.

4.2.5 Determinación de la liberación de azúcares reductores por acción de la celulasa expresada en *E. coli* BL21 (DE3)

Para medir la liberación de azúcares reductores del Avicel por acción de la celulasa, se utilizó el método colorimétrico DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico). Se preparó el reactivo DNS como se describe a continuación: a aproximadamente 80 mL de agua destilada se agregaron los siguientes reactivos: 30 g de tartrato de sodio y potasio, 1 g de DNS, y 20 mL de hidróxido de sodio (2mol/L) y se aforó a 100 mL (Bisen, 2014).

En tubos Eppendorf que contenían 0,005 g de Avicel, se añadieron 500 μ L de solución tampón fosfato 50 mmol/L pH 7,5 con 10 μ g de la proteína proveniente del periplasma o de extractos intracelulares. De igual manera se repitió el procedimiento con un segundo tubo pero que contenía 0,2% de CMC en lugar de Avicel. Se incubó a 30°C durante 2 horas y 30 min. cada 10 min. se tomaron muestras para medir la liberación de azúcares reductores. Para dicha actividad, se tomaron 50 μ L del reactivo DNS y se mezclaron con 50 μ L de la muestra, para posteriormente hervir por 5 min. Luego se llevó a un volumen final de 1 mL para leerlo a una OD de 460 nm.

Se llevó a cabo un segundo experimento con el reactivo DNS, usando como sustrato el CMC, aumentando la concentración de la celulasa en un $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ y 1 de concentración de la proteína, estos valores fueron de: 25 μ g/ μ L, 50 μ g/ μ L y 100 μ g/ μ L, respectivamente.

4.2.6 Extracción de las proteínas intracelulares de *E. coli* BL21 (DE3)

Para extraer las proteínas que se encuentran en el espacio intracelular se colocaron 2 mL del reactivo BugBuster Protein Extraction Reagent, Novagen, a temperatura ambiente para resuspender el botón celular (producto de la extracción de proteínas periplasmáticas) en un tubo Falcon de 15 mL para posteriormente trasladar el producto a 2 tubos Eppendorf de 1,5 mL cada uno y proceder a incubar por 2 min a temperatura ambiente. Se realizó la centrifugación a máxima velocidad por 37 min, se tomó el sobrenadante y se lo almacenó a -20°C .

Se realizó un ensayo de concentración del inductor para ver si este afectaba en la síntesis de la proteína, por lo que se usó una concentración de 1mmol/L y 10 $\mu\text{mol/L}$. Se prosiguió a visualizar en un gel de poliacrilamida con un control de una celulasa de 44 kDa. Se comparó los pesos moleculares de las proteínas provenientes del periplasma con las intracelulares producto del reactivo BugBuster.

Se prosiguió a realizar un ensayo tipo pull-down con el sustrato Avicel, para visualizar las proteínas que se hayan unido al Avicel y las que se encontraban en el sobrenadante. El ensayo tipo pull-down se lo esquematiza en la Figura 9.

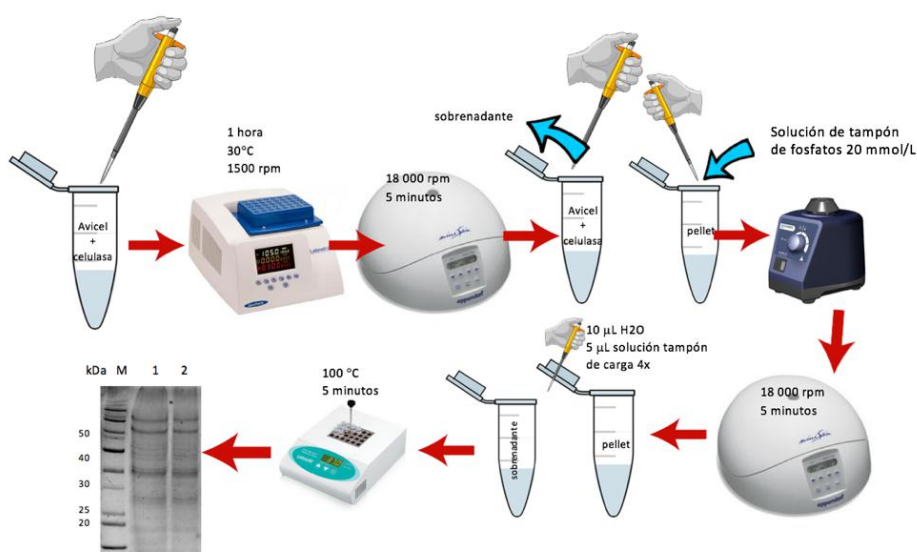


Figura 9. Esquema del ensayo tipo pull-down realizado con el sustrato Avicel.

4.2.7 Comparación de la actividad enzimática de las proteínas intracelulares de dos cepas de expresión: *E. coli* BL21 y *E. coli* ER2566.

Al no poseer las células *E. coli* ER2566 quimiocompetentes para la expresión de la celulasa en *E. coli* ER2566, se procedió a convertir estas células. Se preparó la solución TB mezclando PIPES 0,151 g., cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,11 g., KCl 0,93 g., y cloruro de manganeso (MnCl_2) $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,544 g en 30 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 6,7 con hidróxido de potasio (KOH) 5 mol/L para disolver las sales y finalmente se adicionó el manganeso. Se procedió a esterilizar la solución por filtración con una membrana de 0,22 μm y se congeló a -20°C .

Se sembró una colonia fresca en 40 mL de medio SOC. Este cultivo fue incubado a 37°C por 1 hora sin agitación, y posteriormente se agitó a 200 rpm por 2 horas y media hasta alcanzar una DO_{600} de 0,3. A continuación, las células fueron centrifugadas a 8000 rpm por 1 minuto a 4°C . Luego las células se resuspendieron en 20 mL de solución estéril fría de TB e incubada en hielo por 25 min. A continuación, se realizó otra centrifugación con los mismos parámetros. El pellet se resuspendió en 1,6 mL de TB conteniendo 0,4 mL de glicerol. 100 μL de esta suspensión celular se repartieron en tubos estériles, y se guardaron a -72°C , para su posterior uso.

Para determinar la eficiencia de las células competentes *E. coli* ER2566, se tomaron 100 μL de las células y se añadió a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del plásmido pUC19, incubando 30 min en hielo. Posteriormente se llevó a cabo un shock térmico de 42°C por 45 s. Después se incubaron las células en hielo por 2 min y se añadieron 400 μL de medio SOC en tubo de cultivo y se incubó a 37°C por al menos 45 min. Finalmente se sembraron 50 μL del cultivo en placas de agar con antibiótico LB-ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y se incubó a 37°C toda la noche. Se realizaron los cálculos de la eficiencia, contando el número de colonias que crecieron en la caja. Se siguió el mismo procedimiento de transformación pero con el plásmido que contenía a la celulasa.

Para la extracción de la celulasa, se centrifugó el cultivo de las células transformantes a 7000 rpm por 10 min. El pellet de células se resuspendió con 5 mL de solución SET fría (sacarosa 1M, EDTA 40 mmol/L y Tris-HCl 50 mmol/L) para provocar la ruptura de la membrana externa de las bacterias y liberar el contenido del periplasma. El pellet fue disuelto en su totalidad con la ayuda de la pipeta de 1000 μ L y se incubó por 30 min en hielo. Posteriormente, se centrifugaron las bacterias por 10 min a 9000 rpm a 4°C guardándose el sobrenadante. El pellet sobrante fue resuspendido con 5 mL de buffer MgSO_4 a una concentración de 5 mmol/L. Se prosiguió a dejar incubar por 30 min en hielo. Finalmente se centrifugó a 9000 rpm por 10 min a 4°C y se tomó solo el sobrenadante para ser almacenado. Las proteínas se observaron en un gel SDS-PAGE al 12%.

Una vez que se transformaron las células *E. coli* ER2566 se extrajo las proteínas tanto del periplasma como del citoplasma para realizar ensayos de actividad enzimática y poder comparar con la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE3)

4.2.8 Interacción de la celulasa recombinante con la expansina PcExI1

Para la interacción de la celulasa recombinante se tomaron cinco tubos Eppendorf, de los cuales dos contenían las proteínas del citoplasma, dos con proteínas provenientes del periplasma y uno con la expansina PcExI1 recombinante. Un tubo proveniente de las proteínas del citoplasma se incubó con Avicel y el restante se añadió a la expansina y el Avicel. Se realizó el mismo procedimiento para las proteínas provenientes del periplasma. Los cuatro tubos fueron incubados por 1 hora a 30 °C. Posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min. Se tomó el sobrenadante de los 4 tubos para almacenarlo. Se prosiguió con 3 lavados realizados con buffer fosfatos 20 mmol/L. Se prepararon las muestras para ser visualizadas en un gel de acrilamida junto con los sobrenadantes para lo cual se añadió 5 μ L de solución

tampón de carga y 15 µL de H₂O. Las muestras fueron añadidas de la siguiente manera: carril 1: sobrenadante de las proteínas del citoplasma con Avicel, carril 2: pellet de las proteínas del citoplasma con Avicel, carril 3: sobrenadante de las proteínas del periplasma con Avicel y PcEx11, carril 4: pellet de las proteínas del citoplasma con Avicel y PcEx11, carril 5: sobrenadante de las proteínas del periplasma con Avicel, carril 6: pellet de las proteínas del periplasma con Avicel, carril 7: sobrenadante de las proteínas del periplasma con Avicel y PcEx11, carril 8: pellet de las proteínas del periplasma con Avicel y PcEx11, carril 9: expansina PcEx11.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Obtención de la secuencia de una celulasa producida por la cepa *Pectobacterium carotovorum* BF45

En la base de datos del GenBank en el NCBI, se identificó una secuencia que codifica para una celulasa proveniente del genoma de *Pectobacterium carotovorum* PC1, designada como endoglucanasa CelN2. En la Figura 10, se muestra la secuencia de la celulasa de *Pectobacterium carotovorum* PC1. Basándose en la información de la secuencia, se diseñaron y sintetizaron cebadores de oligonucleótidos correspondientes a regiones codificantes de la secuencia madura hasta el codón de paro. En base a esta secuencia se determinó el fragmento correspondiente al péptido señal de exportación extracelular y se incluyeron sitios de digestión de las enzimas Not y Sfi. El oligonucleótido forward posee 33 nucleótidos y su secuencia es: CGATGCGCCGCTTACGTCACCAGAACATAGCG. Por otra parte, el oligonucleótido reverse consta de 43 nucleótidos y su secuencia es: TCGATGCGCCGCTTACGTCACCAGAACATAGCG. En este proyecto los oligonucleótidos presentan una longitud extra de 10 pb. Por otra parte, ensayos de clonaje realizados por Festa et al., 2013, lograron la amplificación del gen de interés para la proteína de su estudio usando oligonucleótidos de longitud de 35 nucleótidos para el forward y 45 nucleótidos para el reverse con un gradiente para la temperatura de annealing en la PCR.

ATGTGGATGAGAAGGAATCAAATCGTCAGGAAATTGACGTTAGGGGTGGTAACAACGGTGCTGGGGATGT
 CGCTCAGTTTTTCTGCATTATCCGCCACACCGGTGGAAACGCATGGCCAACGTCCATTGAAAATGGGCG
 ACTGGTGGACGAACAGGGGAAAAGGGTGAACCTGAGAGGGTTCAGTTTCGCACGGTTTGCAGTGGTTTTGGT
 GACTACGTCAACAAAGATTTCGATGAAATGGCTGCGCGATGACTGGGGGATTAACGTATTCCGTGTTGCCA
 TGTACACGGCAGCGGATGGCTATATTTCCAATCCTTCCCTTGCGAATAAGGTCAAAGAAGCCGTTGCGGC
 GGCACAAAGCCTCGGCGTCTACATCATCATCGACTGGCACATTTTGTTCGGATAACGATCCTAATATTTAT
 AAAGCACAGCAAAAACCTTCTTTGCCGAAATGGCGGGCTGTACGGTAATTCGCCGAACGTGATTTATG
 AAATCGCCAATGAACCCAACGGCGGCTGACATGGAACGGGCAAATTCGGCCTTATGCGCTCGAAGTGAC
 TGAAACTATCCGTAGTAAAGATCCTGATAATCTGATTATCGTTGGCACGGGTACCTGGAGTCAGGATATT
 CATGACGCGGCGGATAATCAGCTGCCCCGATCCGAATACGCTGTACGCGCTGCATTTCTATGCGGGTACGC
 ACGGGCAGTTCTGCGCGATCGCATTGATTATGCACAAAGCCGCGGTGCCGCGATTTTTGTTCAGCGAGTG
 GGGCACAAGCGATGCGTCCGGCAATGGTGGACCGTTCTTGCCTGAATCGCAGACCTGGATCGATTTCTTG
 AACAAACCGTGGTGTGAGCTGGGTTAACTGGTTCGCTTACCGATAAATCAGAGGCGTCTGCGGCGCTGGCAC
 CGGGAGCGAGCAAATCTGGCGGTTGGACAGACAGAATTTGTTCGGCGTCAGGCAAATTTGTTCAGAGCACA
 GATTTCGCGCGGCTGCGAATCTAAGCGGTGGCGATACGCCAACCCAGCCAAACCGAACCAATCCAGGT
 AGCGGAACCCGGGTGACATCGTACTGCAATATCGTAATGTGGATAACAATCCTTCCGATGATGCGATTTC
 GCATGGCCGTC AACATCAAAAATACTGGAAGTACGCCGATCAAACCTTAGCGATCTGCAAGTGCCTACTA
 CTTCCATGATGATGGCAAACCGGGTGCGAACCTCTTTGTTGACTGGGCGAACGTCGGTCCTAACAAACATT
 GTGACCAGCACAGGTACGCCAGCCGAGTACCGATAAAGCCAATCGCTATGTTCTGGTGACGTGA

Figura 10. Secuencia de nucleótidos de una celulasa de *Pectobacterium carovororum* PC1 proveniente del GenBank del NCBI.

a) Secuencia tomada como referencia para el diseño de los oligonucleótidos

Una vez diseñados los oligonucleótidos, se decidió amplificar la secuencia de una posible celulasa de *Pectobacterium carotovorum* BF45, de aproximadamente 50 kDa, según reportes previos (Ryu, et al., 2011). Para este propósito, se extrajo el DNA genómico de la cepa BF45 y se realizó la amplificación del gen de la celulasa, mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Los oligos fueron específicamente diseñados para un gen de entre 45 y 50 kDa. La reacción se llevó a cabo con un gradiente de temperatura de annealing (55-65°C), obteniéndose un amplificado a 61°C, con un peso molecular entre 1200 a 1500 pb cuando se lo comparó contra el marcador de peso molecular de 10 kpb (Figura 11). La banda corresponde a un fragmento esperado de 1267 pb, que coincide con los resultados de la celulasa de *P. carotovorum* PC1, tomada como referencia para el diseño de los oligonucleótidos. De igual manera, el resultado coincide con los estudios de una celulasa proveniente de *B. subtilis*, con peso molecular de 1300 pb (Sashihara et al., 1984).

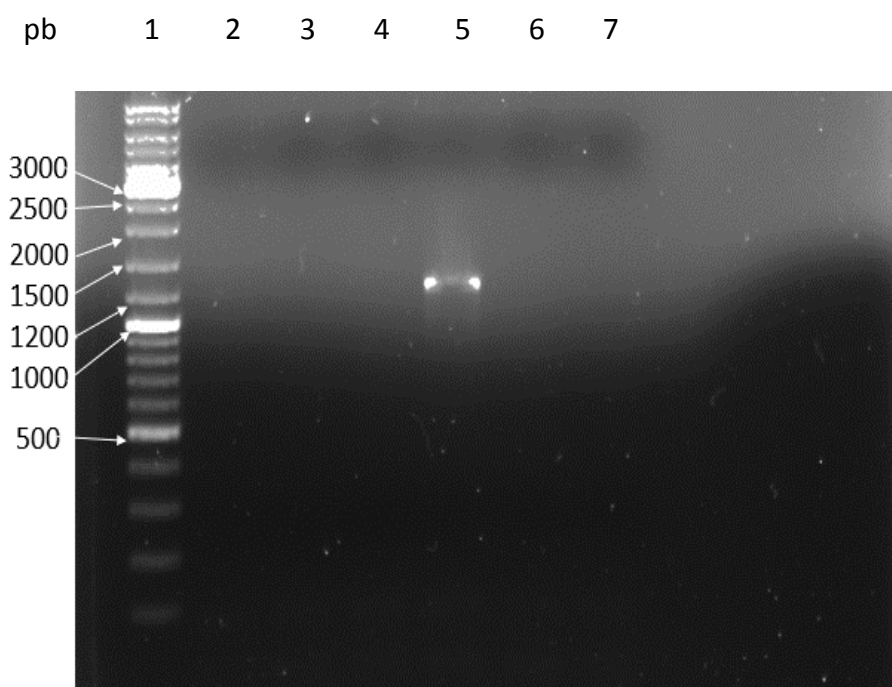


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para verificar a una celulasa de *Pectobacterium carotovorum* de la cepa BF45 por la reacción en cadena de la polimerasa.

a) Carril 1: Marcador de peso molecular de DNA. Carril 2: Temperatura de annealing de 55°C. Carril 3: Temperatura de annealing de 57°C. Carril 4: Temperatura de annealing de 59°C. Carril 5: Temperatura de annealing de 61°C. Carril 6: Temperatura de annealing de 63°C. Carril 7: Temperatura de annealing de 65°C

5.2 Clonación de la secuencia de la celulasa obtenida por PCR en *E. coli* DH5 α

El producto de la PCR resultante se clonó en el vector pET-22bPcEx11, que cuenta con un péptido señal de exportación al periplasma, evitando que la proteína permanezca en forma de cuerpos de inclusión y facilitando el rompimiento de la pared celular para la extracción. Además, el plásmido cuenta con sitios de restricción entre ellos Xho I y Sal I, enzimas que fueron utilizadas para la digestión del producto de la PCR y la preparación del vector. El plásmido pET-22bPcEx11, contenía el gen de la expansina por lo que este fue extraído. En la Figura 12 se muestran los fragmentos usados para la ligación: el plásmido de 5425 pb y un fragmento de 700 pb que corresponde a la

expansina. El fragmento de 700 pb fue eliminado y se reemplazó por la celulasa que se observa en el carril 2 de 1267 pb. Actualmente la sustitución de genes en los plásmidos mediante técnicas moleculares se encuentra estandarizado, tal como el estudio de Kerff et al., 2008, en el que se realizó la extracción del gen de una xilanasa para reemplazar por el gen de la expansina, la cual poseía un peso molecular de 780 pb. Ésta es una técnica eficaz y que permite el reciclaje de plásmidos de gran coste económico.

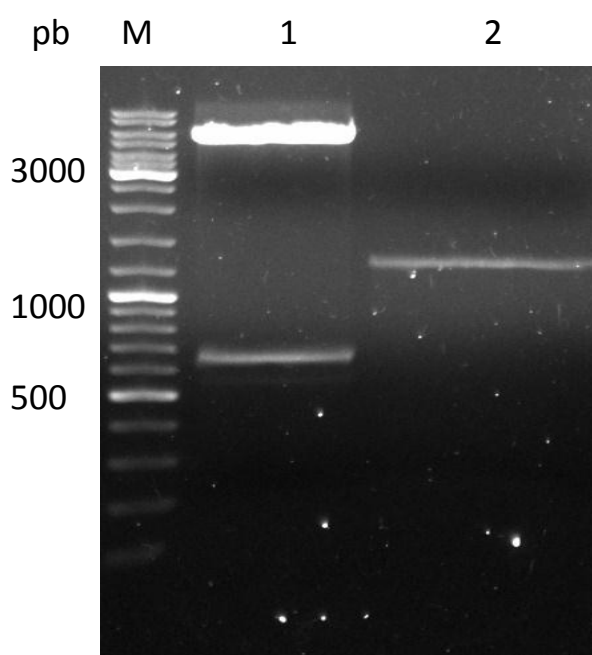


Figura 12. Amplificación del plásmido pET-22bPcEx11, expansina y celulasa.

a) Carril M: marcador de peso molecular. Carril 1: plásmido pET-22bPcEx11 de 5425 pb y gen de la expansina 700 pb. Carril 2: gen de la celulasa 1267 pb.

Una vez realizada la ligación, se procedió a transformar las células *E. coli* DH5 α con el plásmido pET22b-Cel. Las colonias crecieron en medio LB sólido con antibiótico. Las colonias de la 1 a la 6 que contenían el plásmido pET22b fueron capaces de crecer en medio con ampicilina, puesto que el plásmido posee el gen de la resistencia a dicho antibiótico, que codifica para la β -lactamasa, que inactiva la ampicilina (Lodish et al., 2000).

Se realizó una PCR de colonia para comprobar que el plásmido fue insertado de manera exitosa en las células de *E. coli* DH5 α . Las clonas de la 2 a la 6 amplificaron el fragmento de entre 1200 a 1500 pb, a excepción de la clona 1 que no amplificó ningún fragmento (Figura 13). Sashihara, et al., 1984, en su estudio indica que debido a que la ampicilina no es un compuesto bactericida sino bacteriostático, las clonas positivas que degradan el antibiótico pueden permitir el crecimiento de células que no contienen plásmido dando lugar a colonias satélites.

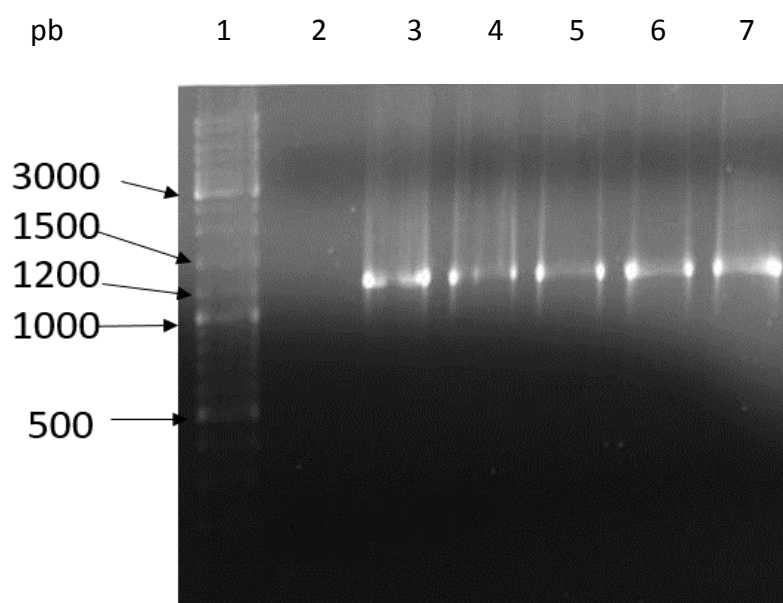


Figura 13. Figura de la PCR de colonia de las clonas 1 a la 6 transformadas de *E. coli* DH5 α .

a) Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: clona 1. Carril 3: clona 2. Carril 4: clona 3. Carril 5: clona 4. Carril 6: clona 5. Carril 7: clona 6

Se extrajeron los plásmidos de cuatro clonas con el fin de conocer si la secuencia se encontraba completa y si su marco de lectura se fusionó correctamente con el marco de lectura del péptido señal de exportación al periplasma codificado en el plásmido. Se cuantificó la concentración de cada plásmido obteniéndose los siguientes resultados: clona 2: 12ng/ μ L, clona 3: 32 ng/ μ L, clona 4: 26ng/ μ L, clona 5: 28 ng/ μ L. La concentración del plásmido de cada una de las clonas se encontraba dentro del valor requerido para la transformación, ya que como lo relatan Smalla et al., 2015, una concentración

adecuada de extracción de plásmidos usando los juegos de reactivos es de entre 10 ng/ μ L y 40 ng/ μ L, puesto que para la transformación a células de expresión *E. coli* BL21 se requiere de 1 ng/ μ L, requiriéndose de una pequeña cantidad de plásmido. Para la secuenciación y posterior transformación a las células de expresión *E. coli* BL21, se tomó aleatoriamente a la clona 3.

Se realizó por medio de oligonucleótidos universales la secuenciación del gen de la celulasa para confirmar su autenticidad, lo cual determinó que el fragmento clonado se fusionó en el marco correcto de lectura con el péptido señal *PeiB*, que poseía un codón de inicio ATG y un codón de paro TGA. El gen de esta celulasa, consiste de 1296 nucleótidos que codifican para una proteína de 441 aminoácidos con un peso molecular de 44 kDa (Figura 14).

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCT
ACACCGGTGGAACGCATGGTCAGCTGTCCATCGAAAACGGGCGACTGGTGGATGAACAGGGGAAA
AGGGTACAGCTGAGAGGGATCAGTTCTCACGTTTGCAGTGGTTTGGCGACTATGTCAACAAAGATT
CGATGAAGTGGCTGCGTGATGACTGGGGGATTAACGTATTCCGCGTCGCCATGTACACGGCGGCGG
ATGGTTATATTAATAATCCCTCTCTCGCCAATAAGGTAAGAGAGGCCGTTGCAGCGGCGCAAAGCCTC
GGCGTTTACATCATCATCGACTGGCATACTTGTGCGGATAACGATCCCAATATTTATAAAGCACAGGC
AAAAACCTTCTTTGCCGAAATGGCTGGGCTGTATGGCAGCTCGCCGAACGTGATTTATGAAATCGCCA
ATGAGCCAAACGGTGGCGTGACATGGAACGGTCAGATTCGGCCTTATGCGCTGGAAGTGACTGACA
CCATCCGTAGCAAAGATCCCGATAATCTGATTATCGTCCGTACGGGCACCTGGAGTCAGGATATCCA
CGACGCGCGGATAATCAGCTGCCGATCCGAATACGATGTACGCGCTGCATTTCTATGCCGGTACG
CACGGGCAGTTCTGCGCGATCGCATTGACTATGCACAAAGCCGCGGTGCCGCGATTTTTCGTCAGC
GAGTGGGGCACCAGCGATGCGTCCGGCAACGGCGGACCGTTCTTGCCAGAATCGCAAACCTGGATC
GATTTCTGAATAACCGCGCGTAAGCTGGGTGAACTGGTTCGCTTACCGACAAAGCTGAGGCATCCG
CCGCGCTGGCACCGGGAGCGAGCAAATCAGGTGGTTGGACGGAGCAGAATCTGTCTACGTCAGGCA
AATTCGTCAGAGAGCAGATTCGCGCGGGTGC GGATCTGAGCAATGGCGATACGCCGACTCCGCCAA
CGGAACCGACCAACCCAGGTAACGGAACAACGGGTGACGTCGACTGCAATATCGCAATGTGGATAA
CAACCCGTCGGATGATGCCATTTCGATGGCCGTCACATCAAAAAATACCGGAAGTACGCCGATCAA
CTGACCGATCTGCAAGTGC GTTACTACTTCCATGATGATGGCAAACCCGGCGCGAACCTCTTTGTTG
ACTGGGCGAACGTTGGCCCTCACAACATCGTGACCAGTACGGGGACACCAACCGCCAGCACCGACA
AAGCCAACCGCTATGTTCTGGTGACGTGA

>Celulasa traducida proveniente de la secuenciación de nucleótidos

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMATPVETHGQLSIENGRVLDVEQGKRVQLRGISSHGLQWFGDYVVKDSMK
WLRDDWGINVFRVAMYTAADGYITNPSLANKVKEAVAAAQSLGVYIIIDWHILSDNDPNYKAQAKTFFAEM
AGLYGSSPNVIYEIANEPNGGVTWNGQIRPYALEVTDITRSKDPDNLIIVGTGTWSQDIHDAADNQLPDPNT
MYALHFYAGTHGQFLRDRIDYAQSRGAAIFVSEWGTSDASGNGGPFPLPESQTWIDFLNNRGSVWVNWVSL
TDKAEASAALAPGASKSGGWTEQNLSTSGKFVREQIRAGADLSNGDTPPTPEPTNPNNGTTGDVVLLQY
RNVDDNPSDDAIRMAVNIKNTGSTPIKLSDLQVRYFFHDDGKPGANLFDWANVGNPHNIVTSTGTPTAST
DKANRYVLVT

Figura 14. Secuencia de nucleótidos realizada a la celulasa clonada de *P. carotovorum* BF45 y traducida a aminoácidos.

a) Se indican los codones de inicio y paro de la transcripción, y la secuencia del péptido señal *PeiB*.

La Figura 15 muestra el alineamiento de las secuencias de nucleótidos de *P. carotovorum* BF45, comparada con *P. carotovorum* PC1. La homología entre las dos secuencias es de 84,6%. *P. carotovorum* PC1 posee 30 nucleótidos más que *P. carotovorum* BF45. Hélias et al., 2011, realizaron el alineamiento de *Pectobacterium carotovorum* PC1 y *Bacillus subtilis*, donde se verificó que ambas bacterias colonizan tejidos vegetales y su mecanismo de acción se encuentra mediado por el sistema de autoinducción, donde existe la posibilidad que las secuencias que codifican para celulasas que intervienen en la colonización sean similares. Se encontró en dicho estudio que el gen que codifica para las celulasas de estas dos bacterias corresponde a un peso molecular de 1326 pb y 1300 pb, respectivamente con una homología del 90%.

```

PC1      1 ATGTGGATGAGAAGGAATCAAATCGTCAGGAAAT-----TGACGTTAGG  44
          |.|||||  |||
BF45     1 -----ATGAAATACCTGCTGCCG-----  18

PC1     45 GGTGGTAACAACGGTGTGGGGATGTCGCTCAGTTTTTCTGCATTATCC-  93
          |.||.|||||  |.|.|.|||  |||
BF45    19 -----ACCGCTGCTG-----CTGGTCTGCTGC---TCCT  44

PC1     94 -----GCCACACCGGTGGAAACGCATGGCCAAGT  124
          ||.|||||||||||||.||.|||||
BF45    45 CGCGGCCAGCCGGCCATGGCTACACCGGTGGAAACGCATGGTCAGCTGT  94

PC1    125 CCATTGAAAATGGGCGACTGGTGGACGAACAGGGGAAAAGGGTGCAACTG  174
          |||.|||||.|||||.|||||.|||||.||.|||||
BF45    95 CCATCGAAAACGGGCGACTGGTGGATGAACAGGGGAAAAGGGTACAGCTG  144

PC1    175 AGAGGGGTCAGTTCGCACGGTTTGCAGTGGTTTGGTACTACGTCAACAA  224
          |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||
BF45    145 AGAGGGATCAGTTCTCACGGTTTGCAGTGGTTTGGCGACTATGTCAACAA  194

PC1    225 AGATTGATGAAATGGCTGCGCATGACTGGGGGATTAACGTATTCCGTG  274
          |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.||
BF45    195 AGATTGATGAAAGTGGCTGCGTATGACTGGGGGATTAACGTATTCCGCG  244

PC1    275 TTGCCATGTACACGGCAGCGGATGGCTATATTTCCAATCCTTCCCTTGCG  324
          |.|||||.|||||.|||||.|||||.||.|||||.||.|||||
BF45    245 TCGCCATGTACACGGCGGCGGATGGTTATATACTAATCCCTCTCTCGCC  294

PC1    325 AATAAGGTCAAAGAAGCCGTTGCGGCGGCACAAAGCCTCGGCGTCTACAT  374
          |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||
BF45    295 AATAAGGTAAGAGGCCGTTGAGCGGCGCAAAGCCTCGGCGTTTACAT  344

PC1    375 CATCATCGACTGGCACATTTTGTGCGATAACGATCCTAATATTTATAAAG  424
          |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||
BF45    345 CATCATCGACTGGCATATCTTGTGCGATAACGATCCAATATTTATAAAG  394

PC1    425 CACAGGCAAAAACCTTCTTTGCCGAAATGGCGGGGCTGTACGGTAATTCG  474
          |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||
BF45    395 CACAGGCAAAAACCTTCTTTGCCGAAATGGCTGGGCTGTATGGCAGCTCG  444

PC1    475 CCGAACGTGATTTATGAAATCGCCAATGAACCCAACGGCGGCGTGACATG  524
          |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||
BF45    445 CCGAACGTGATTTATGAAATCGCCAATGAGCCAACGGTGGCGTGACATG  494

PC1    525 GAACGGGCAAATTCGGCCTTATGCGCTCGAAGTACTGAAACTATCCGTA  574

```

BF45 495 GAACGGTCAGATTTCGGCCTTATGCGCTGGAAGTGACTGACACCATCCGTA	544
PC1	575 GTAAAGATCCTGATAATCTGATTATCGTTGGCACGGGTACCTGGAGTCAG	624
BF45 545 GCAAAGATCCCGATAATCTGATTATCGTCGGTACGGGCACCTGGAGTCAG	594
PC1	625 GATATTCATGACGCGGCGGATAATCAGCTGCCCGATCCGAATACGCTGTA	674
BF45 595 GATATCCACGACGCGGCGGATAATCAGCTGCCCGATCCGAATACGATGTA	644
PC1	675 CGCGCTGCATTTCTATGCGGGTACGCACGGGCAGTTCCTGCGCGATCGCA	724
BF45 645 CGCGCTGCATTTCTATGCCGGTACGCACGGGCAGTTCCTGCGCGATCGCA	694
PC1	725 TTGATTATGCACAAAGCCGCGGTGCCGCGATTTTTGTGACGAGTGGGGC	774
BF45 695 TTGACTATGCACAAAGCCGCGGTGCCGCGATTTTTGTGACGAGTGGGGC	744
PC1	775 ACAAGCGATGCGTCCGGCAATGGTGGACCGTTCTGCCTGAATCGCAGAC	824
BF45 745 ACCAGCGATGCGTCCGGCAACGGCGGACCGTTCTGCCAGAATCGCAAAC	794
PC1	825 CTGGATCGATTTCTGAACAACCGTGGTGTGAGCTGGTTAACTGGTCGC	874
BF45 795 CTGGATCGATTTCTGAATAACCGCGGCGTAAGCTGGGTGAACTGGTCGC	844
PC1	875 TTACCGATAAATCAGAGCGTCTGCGGCGCTGGCACCGGGAGCGAGCAAA	924
BF45 845 TTACCGACAAAGCTGAGGCATCCGCCGCGCTGGCACCGGGAGCGAGCAAA	894
PC1	925 TCTGGCGTTGGACAGAACAGAATTTGTCGGCGTCAGGCAAATTTGTCAG	974
BF45 895 TCAGGTGGTTGGACGGAGCAGAATCTGTCTACGTCAGGCAAATTCGTCAG	944
PC1	975 AGCACAGATTCGCGCGGCTGCGAATCTAAGCGGTGGCGATACGCCAACCA	1024
BF45 945 AGAGCAGATTCGCGCGGTTGCGGATCTGAGCAATGGCGATACGCCGACTC	994
PC1	1025 CGCCAACGGAACCGACCAATCCAGGTAGCGGAACCGGGTGACATCGTA	1074
BF45 995 CGCCAACGGAACCGACCAACCGAGTAACGGAACAACGGGTGACGTCGTA	1044
PC1	1075 CTGCAATATCGTAATGTGGATAACAATCCTTCCGATGATGCGATTTCGCAT	1124
BF45 1045 CTGCAATATCGCAATGTGGATAACAACCGTCCGATGATGCCATTTCGAT	1094
PC1	1125 GGCCGTCAACATCAAAAATACTGGAAGTACGCCGATCAAACCTTAGCGATC	1174
BF45 1095 GGCCGTCAACATCAAAAATACCGGAAGTACGCCGATCAAACCTGAGCGATC	1144
PC1	1175 TGCAAGTGCGCTACTACTTCCATGATGATGGCAAACCGGGTGCGAACCTC	1224
BF45 1145 TGCAAGTGCGTTACTACTTCCATGATGATGGCAAACCGGGCGCGAACCTC	1194
PC1	1225 TTTGTTGACTGGGCGAACGTCGGTCTAACAACATTGTGACCAGCACAGG	1274
BF45 1195 TTTGTTGACTGGGCGAACGTTGGCCCTCACAACATCGTGACCAGTACGGG	1244
PC1	1275 TACGCCAGCCGCCAGTACCGATAAAGCCAATCGCTATGTTCTGGTGACGT	1324
BF45 1245 GACACCAACCGCCAGCACCGACAAAGCCAACCGCTATGTTCTGGTGACGT	1294
PC1	1325 GA	1326
BF45	 1295 GA	1296

Figura 15. Alineamiento de nucleótidos entre la secuencia teórica *P. carotovorum* PC1 y la experimental *P. carotovorum* BF45.

Se indican los codones de inicio y paro de la transcripción.

De acuerdo a la traducción realizada de la secuencia de nucleótidos, la celulasa clonada contiene en su extremo N-terminal a una glicosil hidrolasa de la familia 1, unida por un linker al extremo C-terminal que contiene un módulo de unión a celulosa de la familia 3 (CBM3) (Figura 16). Este resultado coincide con el de la celulasa de *Pectobacterium carotovorum* subsp. brasiliense, que además de poseer un CBM de la familia 3, el extremo N-terminal está conformado por una glicosil hidrolasa de la familia 5 (Onkendi et al., 2013). La clasificación de las familias de las glicosil hidrolasas realizada por , se debe a diferentes factores, como por ejemplo la familia 1, que incluye enzimas que están presentes en diferentes organismos vivos (bacterias, animales y plantas) y tiene como característica hidrolizar enlaces β -glucosídicos de disacáridos como la lactosa y la celobiosa. Por otra parte, la familia 5 está relacionada a la función que incluyen enzimas involucradas en la digestión de la celulosa. Aunque los dos organismos son *Pectobacterium*, existe una notoria diferencia en la familia de las glicosil hidrolasas, esto se debería a la transferencia de genes de bacteria a bacteria.

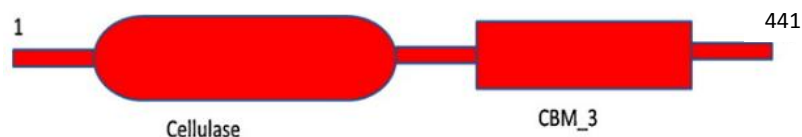


Figura 16. Esquema general de la celulasa obtenida de BF45.

5.3 Determinación de la actividad enzimática de la celulasa en *E. coli* BL21 en cajas Petri

Una vez que se realizó la secuenciación y se verificó que el fragmento corresponde a la celulasa clonada, se procedió a llevar a cabo su expresión para obtener la proteína y realizar ensayos de actividad enzimática. Lo primero fue analizar la actividad de celulasa sobre CMC que es un sustrato sobre el cual actúan las celulasas. De las 10 colonias sembradas de células *E. coli* BL21(DE3) transformadas en medio de inducción con CMC, solamente las

células 6 y 10 presentaron halos de degradación de 2,5 cm y 3 cm de diámetro, respectivamente, los cuales fueron revelados por la falta de tinción con rojo Congo (Figura 17a).

Éstas clonas fueron aisladas y se repitió el experimento sobre el sustrato CMC (Figura 17b). Se obtuvieron halos de degradación de 5 y 6 cm para las clonas 6 y 10 respectivamente. Zitomer y Eveleigh, 1987 destacan que la actividad de las células *E. coli* BL21 en cajas de Petri con CMC, es un método directo para conocer la presencia de la actividad de las celulasas.

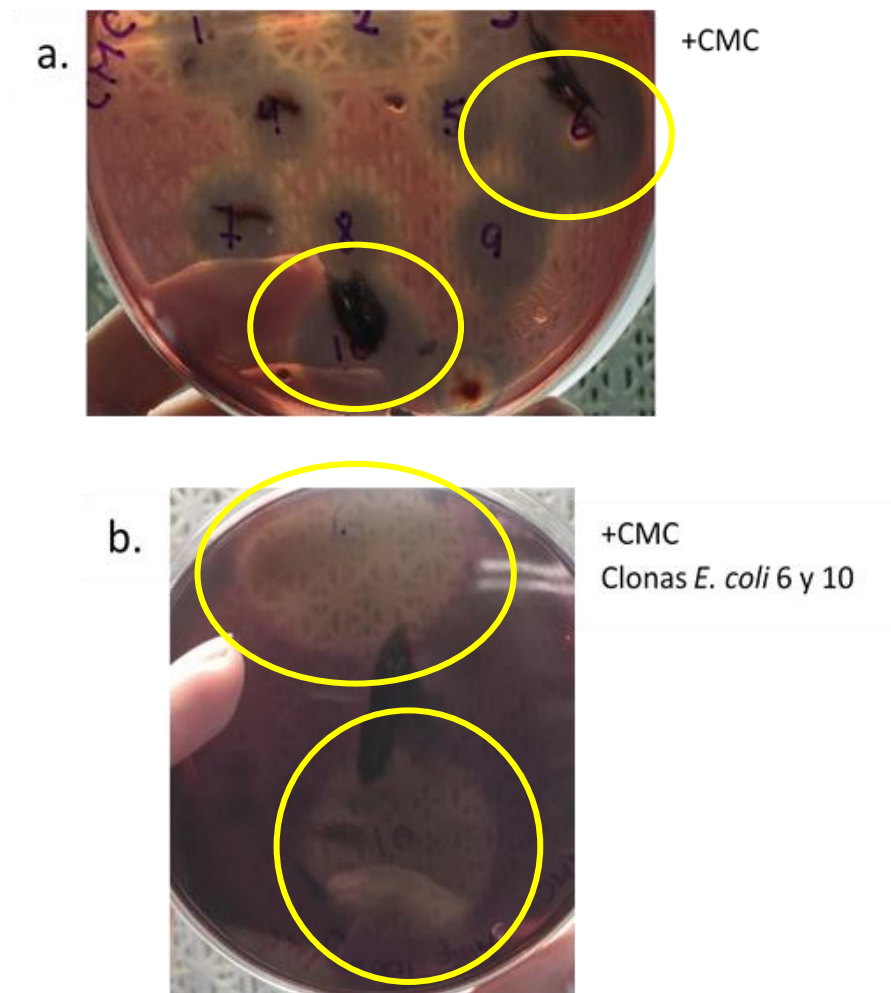


Figura 17. Degradación de la celulasa recombinante en células *E. coli* BL21 en cajas de Petri de CMC.

5.4 Expresión y extracción de la celulasa en células de *E. coli* BL21 (DE3)

Para obtener la proteína se utilizó un shock osmótico frío con sacarosa, que es el método clásico para la extracción de proteínas del periplasma de bacterias Gram-negativas, gracias a que el gen de la celulasa se encuentra fusionado a un péptido *PeIB* de exportación al periplasma. En la Figura 18, se observan dos proteínas sobre expresadas en cada carril y que pertenecen a las dos soluciones que se usan en la extracción: $MgSO_4$, y SET. La ventaja de emplear la solución de ambos compuestos, es que son soluciones que rompen la pared celular sin causar lesiones a las proteínas. Las bandas extraídas de las soluciones $MgSO_4$, y SET utilizadas para la extracción del periplasma tienen un peso molecular de aproximadamente 39 kDa y 32 kDa. Las ventajas de expresar proteínas en el periplasma son la producción de proteínas activas, baja contaminación y purificación simple con la preparación de soluciones económicamente viables (Mergulho y Monteiro, 2007). La traducción de la secuencia de nucleótidos secuenciada corresponde a una proteína de 44 kDa, misma que no se observó en el gel, por lo que se desconoce si las bandas recuperadas de la extracción del periplasma corresponde a la celulasa de interés.

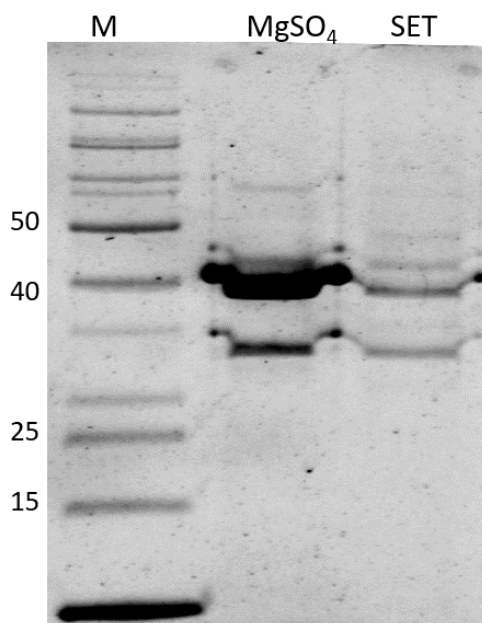


Figura 18. Electroforesis en SDS-PAGE al 12% de la extracción de las proteínas del periplasma de *E. coli* BL21.

El análisis de la homología con *Pectobacterium carotovorum* PC1 de esta celulasa indica que posee un surco profundo que cuenta con un ion calcio. El mismo es altamente concentrado y se encuentra en el lado opuesto a la molécula en todas las subfamilias CBM3, independiente de la pérdida o modificación de la función de unión a la celulosa. La función exacta de este surco se desconoce (Yaniv, *et al.*, 2012)

Considerando que el CBM de la celulasa recombinante de *P. carotovorum* BF45 pudiera requerir de Ca^{+2} , se incorporó CaCl_2 20 mmol/L siguiendo el protocolo de Franco-Cirigliano, *et al.*, 2013, en el medio de cultivo de las células *E. coli* BL21 para que se pudiera acoplar a la proteína al momento de su síntesis, y verificar si este le confería cierta estabilidad. En la Figura 19, se muestra a la celulasa obtenida después de su expresión en presencia de calcio en las soluciones SET y MgSO_4 , observando las mismas dos bandas de 39 y 32 kDa, lo que indica que la adición de calcio al medio no ayudó a la recuperación de la proteína del tamaño esperado. De acuerdo a Bose *et al.*, 2012, el añadir calcio al medio, permite la estabilidad de la proteína en la exportación celular.

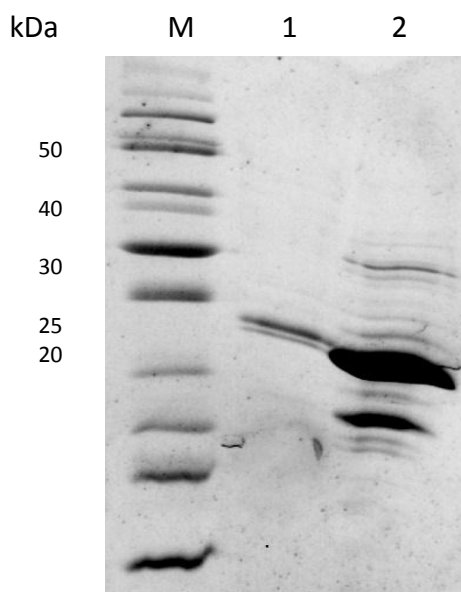


Figura 19. Electroforesis de las proteínas extraídas del periplasma de *E. coli* BL21 cuando se añadió al medio calcio.

Carril M: marcador de peso molecular. Carril 1: células sin adición de calcio. Carril 2: células con adición de calcio.

5.5 Determinación de la liberación de azúcares reductores por acción de la celulasa en células *E. coli* BL21 (DE3)

Las bandas observadas en el gel de SDS-PAGE al 12% no permiten identificar si se trata de la celulasa clonada de *Pectobacterium carotovorum* BF45. Existen diversos factores que podrían alterar la corrida de un gel de poliacrilamida como la estabilidad del gel o el voltaje aplicado (Nowakowski et al., 2014).

Para confirmar si las proteínas extraídas presentan actividad de celulasa, se llevó a cabo un ensayo de actividad enzimática de las bandas observadas para lo cual se realizó un experimento de liberación de azúcares reductores con dos sustratos de celulosa: Avicel y CMC. Las celulasas cortan las cadenas de celulosa provocando la acumulación de azúcares reductores en el medio de reacción; estos azúcares pueden cuantificarse con el reactivo DNS, de color amarillo que se reduce por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de color ladrillo (Miller, 1959).

Los ensayos llevados a cabo muestran que no hubo señal de degradación con Avicel, mientras que con CMC, se obtuvo una cantidad de azúcares 1,42 mmol/L a los 80 y 130 min de reacción (Figura 20). En el estudio de Gaur y Tiwari, 2015, se realizaron los mismos ensayos de actividad enzimática a una celulasa de *B. subtilis*, y obtuvieron una cantidad de 8mmol/L a los 80 min y a los 130 min de 15 mmol/L. Por lo tanto, los resultados son 6 veces menor en el primer tiempo y 10 veces menor con respecto al segundo.

Además del peso molecular de las bandas obtenidas del periplasma que no concuerdan con el esperado de 44 kDa y los ensayos de actividad en los cuales el valor más alto obtenido en la liberación de azúcares para CMC es de 1,42 mmol/L, se infiere que la proteína aun cuando se expresa, parecería no

ser estable y por tal razón pierde parte de su estructura desencadenando una baja actividad sobre los sustratos.

Ensayos realizados por Kim et al., 2016, de expresión heteróloga de una celulasa, en los que en primera instancia obtuvieron resultados no favorables de actividad enzimática, pero que lograron superar al determinar el pH y temperatura óptimos de actividad obteniendo así 143 U/mg.

El ensayo de actividad enzimática fue ejecutado a una temperatura de 30° C ya que es la temperatura a la que se activa el sistema de autoinducción, y la acción de enzimas como la celulasa en especies *Pectobacterium*. En el experimento llevado a cabo con la celulasa de *P. carotovorum*, la actividad enzimática obtenida se debería a una posible inestabilidad, ya que las celulasas de hongos y bacterias, en especies bacterianas diferentes a *Pectobacterium*, son estables a temperaturas entre 55 y 37° C (Pandey, et al., 2014),.

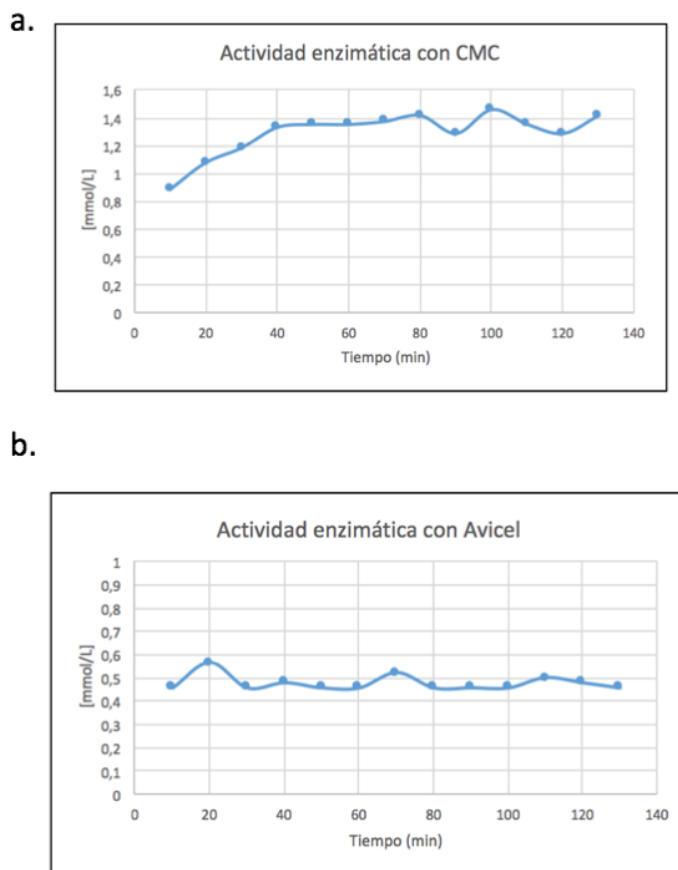


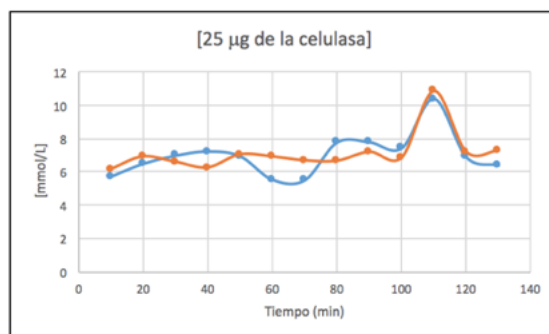
Figura 20. Ensayo de azúcares reductores de la celulasa de *P. carotovrum* BF45 en sustratos de CMC y Avicel.

- a) Ensayo colorimétrico con CMC expresado en concentración.
- b) Ensayo colorimétrico con Avicel expresado en concentración.
- c) Ambos ensayos fueron medidos a una densidad óptica de 450 nm.

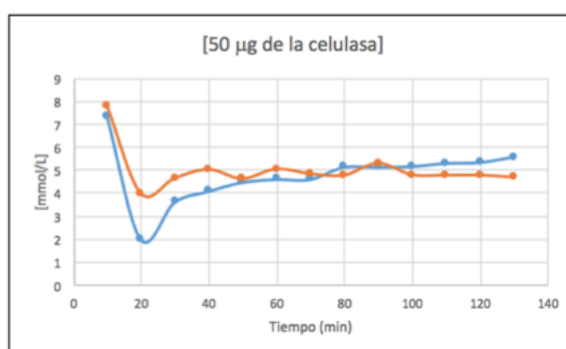
Debido a la posibilidad de que la enzima sea inestable y esté sufriendo degradación, se estableció aumentar la cantidad de proteína con la intención de tener más moléculas activas, por lo que se realizó nuevamente un ensayo de azúcares reductores con diferentes concentraciones de proteína 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, tal como lo reportó Adlakha, et al., 2012. El mayor resultado a 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fue de 11 mmol/L a los 110 min, para 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fue de 8 mmol/L a los 10 min y finalmente para 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fue de 5,5 mmol/L a los 10 min (Figura 21). Los resultados comparados con los de Adlakha, et al., 2012, no son favorables, ya que al aumentar las moléculas activas de la proteína, los valores de concentración incrementan, en el caso para $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ y 1 de moléculas activas el crecimiento se ve reflejado con el aumento del doble.

En los resultados de la actividad enzimática los valores no varían, ya que el valor más alto obtenido es de 11 mmol/L a una concentración de 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A su vez al aumentar las moléculas activas, se pensaría en la posibilidad de una acumulación del sustrato debido a su alto valor de 0,05 g de CMC. Estos resultados indican que a pesar de aumentar la concentración de la celulasa no se logra tener suficientes moléculas activas, por lo que se infiere que la proteína no se encuentra estable estructuralmente por factores de plegamiento o de estabilidad (Figura 21).

a.



b.



c.

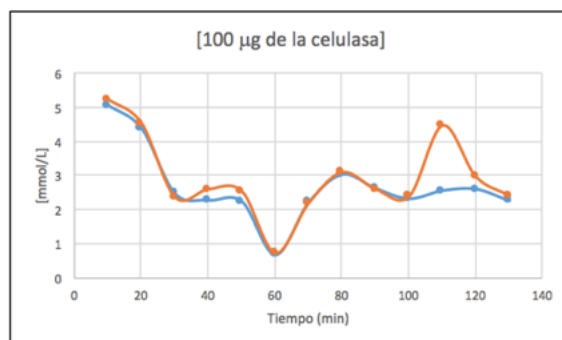


Figura 21. Ensayo de azúcares reductores de la celulasa a diferentes concentraciones.

- a) 25 µg.
- b) 50 µg.
- c) 100 µg.
- d) Se realizaron dos réplicas mostradas en color naranja y azul.

5.6 Extracción de las proteínas intracelulares de las células *E. coli* BL21 (DE3)

Para conocer si la exportación de la celulasa al periplasma pudiera causar la inestabilidad o provocar proteólisis a la proteína, se prosiguió a obtener la proteína del citoplasma. Además, también se infirió en la posibilidad de que la concentración del inductor fuera muy alta (se usó 1 mmol/L en los experimentos anteriores) lo que pudiera provocar una síntesis demasiado rápida que no permitiera el correcto plegamiento de la enzima en el momento de su síntesis, por lo que se incluyó un experimento en el que las células fueron inducidas con 10 $\mu\text{mol/L}$ de IPTG. Para obtener las proteínas totales se utilizó el reactivo BugBuster que permite la lisis celular y la obtención de las proteínas solubles totales. Debido a la cantidad de proteínas existentes en el citoplasma se observó un gran número de bandas en un gel de poliacrilamida. El resultado de los carriles 4 y 5 se presentan en la Figura 22. La extracción de proteínas del citoplasma, confiere mayor incremento en la producción de proteínas (Martínez-Gomariz et al., 2009).

En los carriles 4 y 5 existe una sobreexpresión de dos proteínas, una con un peso molecular mayor a 50 kDa, que podría deberse a la sobreexpresión de la celulasa clonada, mientras que se observó otra proteína de 39 kDa, en las extracciones periplasmáticas. Los resultados indican que la proteína de 39 kDa también se encuentra presente en la extracción realizada en el citoplasma. Sin embargo, también se muestra una banda de 51 kDa aproximadamente que está presente en alta cantidad, que podría deberse a que esta proteína no ha sido exportada al periplasma, y que aún presenta íntegro el péptido señal, motivo por el cual esta banda es mayor a 50 kDa. Pandey et al., 2014, indican que al realizar extracciones citoplasmáticas de *E. coli* BL21 existen proteínas que no se solubilizan y que además habitan proteínas del organismo, que no logran ser exportadas al periplasma.

La concentración del inductor, que se varió en este estudio no afecta a la extracción de proteínas del periplasma o del citoplasma, ya que la intensidad de banda es la misma que en experimentos con 1mmol/L. Estudios realizados por Zhang et al., 2015, indican que en ausencia del inductor, IPTG, en células

E. coli BL21 las proteínas de membrana se producen a una velocidad menor que en presencia de IPTG. Por otra parte, el aumento o deceso del IPTG, no provoca que las proteínas recombinantes posean una síntesis más rápida.

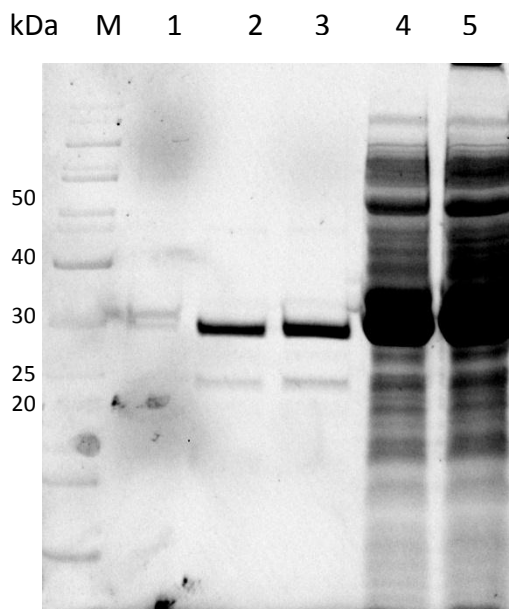


Figura 22. Electroforesis en SDS-PAGE de la extracción de proteínas del periplasma y citoplasma de *E. coli* BL21.

a)M: marcador de peso molecular. 1.Celulasa control de 44 kDa 2. Proteína proveniente del periplasma con concentración de IPTG 1mmol/L. 3. Proteína proveniente del periplasma con concentración de IPTG 10 μ mol/L. 3. Extracción de proteínas solubles del citoplasma con IPTG 1mmol/L. 4. Extracción de proteínas solubles del citoplasma con IPTG 10 μ mol/L. 5. Extracción de proteínas solubles del citoplasma con IPGT 1mmol/L

A partir de las preparaciones citoplasmáticas se determinó si alguna de las dos bandas sobreexpresadas tenía la capacidad de unirse al Avicel y/o si presentaba actividad de celulasa, para lo cual se realizó un experimento tipo pull-down. En la Figura 23, las proteínas unidas a Avicel y las del sobrenadante se corrieron en un gel SDS-PAGE al 12%, en donde se observa que a pesar de que existen diferentes bandas ninguna corresponde a la celulasa esperada de 44 kDa, y que la proteína de 39 kDa podría tener poca capacidad de unión al Avicel.

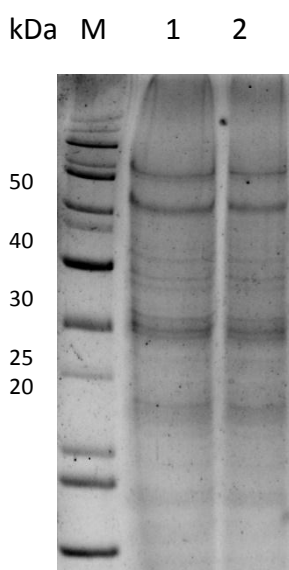


Figura 23. Electroforesis en SDS-PAGE de las proteínas solubles extraídas del citoplasma de *E. coli* BL21.

a) Las proteínas fueron incubadas con 0,05 g de Avicel y lavadas con buffer fosfatos 20 mmol/L. M: marcador. 1. Proteínas del sobrenadante. 2. Proteínas del pellet.

5.7 Comparación de la actividad enzimática de las proteínas intracelulares de dos cepas de expresión: *E. coli* BL21 y *E. coli* ER2566

Las proteínas que se expresan heterológamente no siempre adquieren su estructura correctamente plegada y se convierten en el blanco fácil de proteasas. Por esta razón se decidió utilizar la cepa *E. coli* ER2566 que es mutante para dos proteasas: Ion y OmpT, lo que aumenta las posibilidades de reducir la degradación de la proteína. El resultado de la actividad enzimática para la cepa *E. coli* ER2566 es menor al realizado con la cepa *E. coli* BL21, obteniendo que con la cepa de expresión ER2566 la mayor concentración fue de 6 mmol/L a los 60 min con una concentración de la celulasa de 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figura 24b). En la Figura 24a, la cepa *E. coli* BL21 mostró concentraciones de entre 6,5 mmol/L y 8 mmol/L a los 60 min con una concentración de celulasa de entre 1 a 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Las proteínas provenientes de la cepa ER2566 no afectaron positivamente a la inducción de la proteína con el promotor T7, como sucede con el ensayo realizado por Šiurkus y Neubauer, 2011, donde al aumentar inductores al medio para garantizar una mejor producción de proteína, observaron que ni los cuerpos de inclusión aumentaron con esta cepa de *E. coli* ER2566 para la expresión del vector, concluyendo que esta cepa no es una buena productora de celulasa. Por otra parte, estudios realizados por Hall, et al., 1995 indican que cuando se elimina el CBM, no se afecta la actividad enzimática de la celulasa con el Avicel, pero si hay reducción en la actividad, lo que explicaría que cuando se agregan las proteínas solubles de la lisis celular, usando el reactivo BugBuster, si se obtiene poca degradación de azúcares reductores ya que la celulasa es la que se encontraría actuando y por eso la obtención de valores entre 6 y 8 mmol/L de degradación.

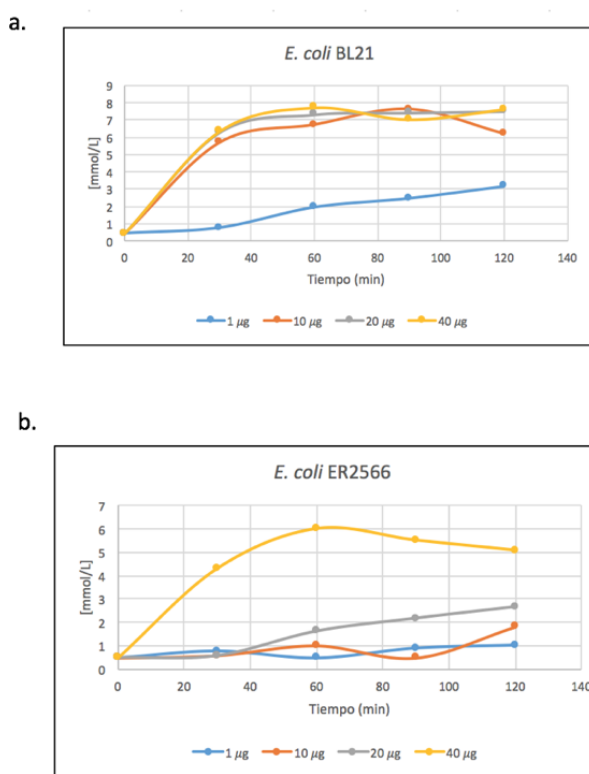


Figura 24. Comparación de la actividad enzimática de la celulasa en dos cepas de expresión.

a) *E. coli* ER2566.

b) *E. coli* BL21.

5. 8 Interacción de la celulasa recombinante con PcExl1

Nikolaidis et al., 2014, detallan que la expansina podría tener cierta interacción con la celulasa ya que en la naturaleza existen organismos que poseen expansinas acopladas a celulasas. Motivo por el cual, el experimento se llevó a cabo existiendo la posibilidad de que la expansina de alguna manera ayude a la celulasa a unirse a la celulosa, tanto en CMC como a Avicel.

La principal hipótesis de este trabajo es que la expansina PcExl1 interactúa con otras proteínas de unión a celulosa, en este caso una celulasa que ha sido expresada heterológamente. Por esta razón se realizaron ensayos de unión entre estas dos proteínas, para lo cual se usaron tanto proteínas totales como proteínas del periplasma, y se hicieron experimentos de pull-down con Avicel, en presencia como en ausencia de la expansina. Se analizó el patrón de proteínas que no se unen al Avicel y quedan en el sobrenadante, y las que se unen al Avicel después del tiempo de incubación. Se observó que las proteínas de 39 kDa y la de mayor a 50 kDa, no tienen la capacidad de unirse al Avicel ya que las bandas que sí se unieron no corresponden a estos tamaños, y la presencia de la expansina PcExl1 no provoca ninguna diferencia a pesar de que esta si se encontraba entre las que sí se unen a la celulosa, como se ha reportado previamente (Olarde-Lozano et al., 2014). Las reacciones con las proteínas del periplasma, solamente muestran a la banda de 39 kDa y a la expansina PcExl1 de 25 kDa que se unió a la celulosa (Figura 25, carril 8). Los resultados indican que la celulasa no parece interactuar con la expansina

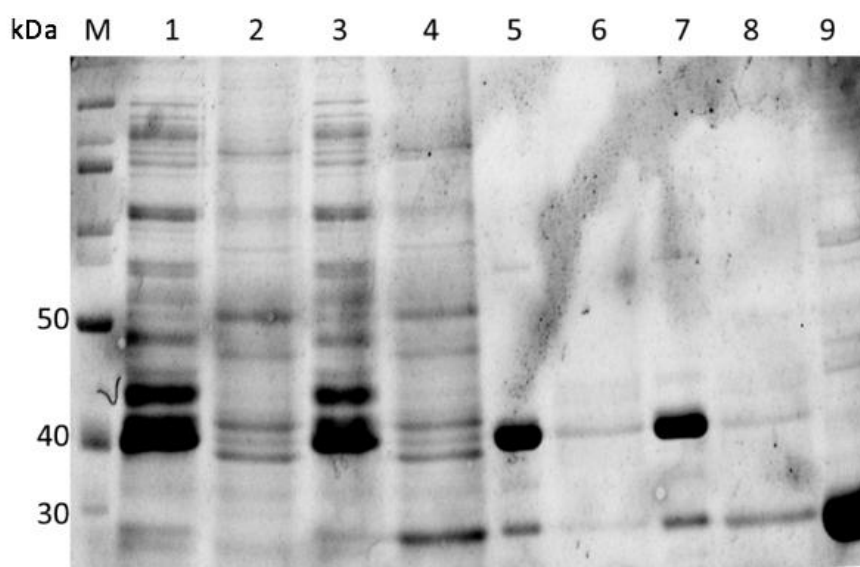


Figura 25. Electroforesis de SDS-PAGE de la interacción de la celulasa con la expansina PcEx1.

a) M: marcador de peso molecular. Carriles 1 a 4, experimento con proteínas totales: 1. Sobrenadante después de la incubación con Avicel (correspondiente a proteínas no unidas). 2. Pellet después de la incubación con Avicel (correspondiente a las proteínas unidas). 3. Sobrenadante después de la incubación con Avicel con expansina añadida. 4. Pellet después de la incubación con Avicel con expansina añadida. Carriles 5 a 8, experimento con proteínas del periplasma: 5. Sobrenadante después de la incubación con Avicel. 6. Pellet después de la incubación con Avicel. 7. Sobrenadante después de la incubación con Avicel y expansina añadida. 8. Pellet después de la incubación con Avicel y expansina añadida. 9. Expansina purificada.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

La celulasa recombinante obtenida en este estudio posee todo el marco de lectura corroborado en la secuenciación de nucleótidos y se expresó en altas concentraciones en las células *E. coli* BL21

La celulasa recombinante obtenida en este trabajo no se une a la celulosa, ni parece interactuar con la expansina posiblemente por una inestabilidad de la celulasa clonada.

6.2 Recomendaciones

Realizar la secuenciación del genoma de *Pectobacterium carotovorum* BF45 para conocer si la secuencia obtenida del gen de la celulasa se encuentra completo.

Diseñar oligonucleótidos específicos para la celulasa de 51 kDa, reportada en *Pectobacterium carotovorum* PC1, una vez que se disponga de la secuencia del genoma de *Pectobacterium carotovorum* BF45, ya que parece ser que la zona 3' es diferente a las reportadas en el NCBI.

Realizar una espectrometría de masas de la celulasa clonada para conocer si la proteína se encuentra completa o tiene alguna sección trunca.

REFERENCIAS

- Adlakha, N., Sawant, S., Anil, A., Lali, A., y Yazdani, S. S. (2012). *Specific Fusion of β -1,4-Endoglucanase and β -1,4-Glucosidase Enhances Cellulolytic Activity and Helps in Channeling of Intermediates*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7447–7454. <https://doi.org/10.1128/AEM.01386-12>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., & et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th edition). New York: Garland Science.
- Barnard, A. M. ., Bowden, S. D., Burr, T., Coulthurst, S. J., Monson, R. E., y Salmond, G. P. . (2007). *Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1165. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2042>
- Bassler, B. L. (1999). *How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing*. *Current Opinion in Microbiology*, 2(6), 582–587. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00025-9)
- Bisen, P. S. (2014). *Laboratory Protocols in Applied Life Sciences*. CRC Press.
Recuperado el 10 de noviembre del 2016 de <https://books.google.com.ec/books?id=NUjSBQAAQBAJ>
- Blanchette, C., Lacayo, C. I., Fischer, N. O., Hwang, M., y Thelen, M. P. (2012). *Enhanced Cellulose Degradation Using Cellulase-Nanosphere Complexes*. *PLOS ONE*, 7(8), e42116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042116>

- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., y Davies, G. J. (2004). *Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition*. *Biochemical Journal*, 382(Pt 3), 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>
- Bose, S., Barnes, C. A., & Petrich, J. W. (2012). *Enhanced stability and activity of cellulase in an ionic liquid and the effect of pretreatment on cellulose hydrolysis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(2), 434–443. <https://doi.org/10.1002/bit.23352>
- Collins, T., Gerday, C., y Feller, G. (2005). *Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases*. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
- Cooper, G. (2000). *A Molecular Approach* (2nd edition). Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Cosgrove, D. J. (1998). *Cell Wall Loosening by Expansins*. *Plant Physiology*, 118(2), 333–339. <https://doi.org/10.1104/pp.118.2.333>
- Cosgrove, D. J. (2000). *Loosening of plant cell walls by expansins*. *Nature*, 407(6802), 321–326. <https://doi.org/10.1038/35030000>
- Cosgrove, D. J. (2005). *Growth of the plant cell wall*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(11), 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Cosgrove, D. J. (2016). *Catalysts of plant cell wall loosening*. *F1000Research*, 5, F1000 Faculty Rev-119. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7180.1>

- Dalmaso, Z. G., Ferreira, D., y Vermelho, B. A. (2015). *Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications*. *Marine Drugs*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/md13041925>
- Dashtban, M., Maki, M., Leung, K. T., Mao, C., y Qin, W. (2010). *Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(4), 302–309. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.490938>
- de Kievit, T. R., y Iglewski, B. H. (2000). *Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships*. *Infection and Immunity*, 68(9), 4839–4849.
- Festa, F., Steel, J., Bian, X., y Labaer, J. (2013). *High-Throughput Cloning and Expression Library Creation for Functional Proteomics*. *Proteomics*, 13(9), 1381–1399. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200456>
- Franco-Cirigliano, M. N., Rezende, R. de C., Gravina-Oliveira, M. P., Pereira, P. H. F., do Nascimento, R. P., Bon, E. P. da S., y Coelho, R. R. R. (2013). *Streptomyces misionensis PESB-25 Produces a Thermoacidophilic Endoglucanase Using Sugarcane Bagasse and Corn Steep Liquor as the Sole Organic Substrates*. *BioMed Research International*, 2013, 584207. <https://doi.org/10.1155/2013/584207>
- Gaur, R., y Tiwari, S. (2015). *Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from Bacillus vallismortis RG-07*. *BMC Biotechnology*, 15, 19. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0129-9>

- Georgelis, N., Nikolaidis, N., y Cosgrove, D. J. (2015). *Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes*. Applied microbiology and biotechnology, 99(9), 3807–3823. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6534-0>
- Georgelis, N., Yennawar, N. H., y Cosgrove, D. J. (2012). *Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(37), 14830–14835. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213200109>
- Hall, J., Black, G. W., Ferreira, L. M., Millward-Sadler, S. J., Ali, B. R., Hazlewood, G. P., & Gilbert, H. J. (1995). *The non-catalytic cellulose-binding domain of a novel cellulase from Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa is important for the efficient hydrolysis of Avicel*. Biochemical Journal, 309(Pt 3), 749–756.
- Hélias V, Hamon P, Huchet E, van der Wolf J, y Andrivon D. (2011). *Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of Pectobacterium and Dickeya*. Plant Pathol, V. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02508.x>.
- Hervé, C., Rogowski, A., Blake, A. W., Marcus, S. E., Gilbert, H. J., y Knox, J. P. (2010). *Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(34), 15293–15298. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005732107>

- Hildén, L., y Johansson, G. (2004). *Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity*. *Biotechnology Letters*, 26(22), 1683–1693. <https://doi.org/10.1007/s10529-004-4579-8>
- Júnior, F. L. S., Dias, A. C. F., Fasanella, C. C., Taketani, R. G., de Souza Lima, A. O., Melo, I. S., y Andreote, F. D. (2013). *Endo- and exoglucanase activities in bacteria from mangrove sediment*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 969–976.
- Kerff, F., Amoroso, A., Herman, R., Sauvage, E., Petrella, S., Filée, P., y Cosgrove, D. J. (2008a). *Crystal structure and activity of Bacillus subtilis YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44), 16876–16881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809382105>
- Kerff, F., Amoroso, A., Herman, R., Sauvage, E., Petrella, S., Filée, P., y Cosgrove, D. J. (2008b). *Crystal structure and activity of Bacillus subtilis YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44), 16876–16881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809382105>
- Kim, S. C., Kang, S. H., Choi, E. Y., Hong, Y. H., Bok, J. D., Kim, J. Y., y Cho, K. K. (2016). *Cloning and Characterization of an Endoglucanase Gene from Actinomyces sp. Korean Native Goat 40*. *Asian-*

- Australasian Journal of Animal Sciences, 29(1), 126–133.
<https://doi.org/10.5713/ajas.15.0616>
- Kohli, P., y Gupta, R. (2015). *Alkaline pectinases: A review*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 4(3), 279–285.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.07.001>
- Kuusk, S., Sørli, M., y Väljamäe, P. (2015). *The Predominant Molecular State of Bound Enzyme Determines the Strength and Type of Product Inhibition in the Hydrolysis of Recalcitrant Polysaccharides by Processive Enzymes*. The Journal of Biological Chemistry, 290(18), 11678–11691. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.635631>
- Lee, Y., y Kende, H. (2002). *Expression of α -Expansin and Expansin-Like Genes in Deepwater Rice*. Plant Physiology, 130(3), 1396–1405.
<https://doi.org/10.1104/pp.008888>
- Lodish, H., Zipursky, S., & et al. (2000). *Molecular Cell Biology* (4th edition). New York: W. H. Freeman.
- Loh, J., Pierson, E. A., Pierson III, L. S., Stacey, G., y Chatterjee, A. (2002). *Quorum sensing in plant-associated bacteria*. Current Opinion in Plant Biology, 5(4), 285–290. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00274-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00274-1)
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66(3), 506–577.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>

- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., y Foster, G. D. (2012). *Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology*. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Marowa, P., Ding, A., y Kong, Y. (2016). *Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement*. *Plant Cell Reports*, 35, 949–965. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1948-4>
- Martínez-Gomariz, M., Perumal, P., Mekala, S., Nombela, C., Chaffin, W. L., y Gil, C. (2009). *Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of Candida albicans*. *Proteomics*, 9(8), 2230–2252. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700594>
- Mergulho, F. J., y Monteiro, G. A. (2007). *Periplasmic Targeting of Recombinant Proteins in Escherichia coli*. En *Protein Targeting Protocols* (Vol. 390, pp. 47–61). Recuperado el 10 de noviembre del 2016 de http://www.springerprotocols.com/Abstract/doi/10.1007/978-1-59745-466-7_4
- Miller, G. L. (1959). *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Miller, M. B., y Bassler, B. L. (2001). *Quorum Sensing in Bacteria*. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 165–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>

- Mohnen, D. (2008). *Pectin structure and biosynthesis*. Physiology and Metabolism - Edited by Markus Pauly and Kenneth Keegstra, 11(3), 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
- Nakano, Y., Yamaguchi, M., Endo, H., Rejab, N. A., y Ohtani, M. (2015). *NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants*. Frontiers in Plant Science, 6, 288. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00288>
- Nikolaidis, N., Doran, N., y Cosgrove, D. J. (2014). *Plant Expansins in Bacteria and Fungi: Evolution by Horizontal Gene Transfer and Independent Domain Fusion*. Molecular Biology and Evolution, 31(2), 376–386. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst206>
- Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., y Petering, D. H. (2014). Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. *Metallomics: integrated biometal science*, 6(5), 1068–1078. <https://doi.org/10.1039/c4mt00033a>
- Olarte-Lozano, M., Mendoza-Nuñez, M. A., Pastor, N., Segovia, L., Folch-Mallol, J., y Martínez-Anaya, C. (2014). *PcEx11 a Novel Acid Expansin-Like Protein from the Plant Pathogen Pectobacterium carotovorum, Binds Cell Walls Differently to BsEXLX1*. PLoS ONE, 9(4), e95638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095638>
- Onkendi, E. M., Maluleke, L. N., y Moleleki, L. N. (2013). *First Report of Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense Causing Soft Rot*

and Blackleg of Potatoes in Kenya. *Plant Disease*, 98(5), 684–684.

<https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0988-PDN>

Pandey, S., Kushwah, J., Tiwari, R., Kumar, R., Somvanshi, V. S., Nain, L., y Saxena, A. K. (2014). *Cloning and expression of β -1, 4-endoglucanase gene from Bacillus subtilis isolated from soil long term irrigated with effluents of paper and pulp mill*. *Microbiological Research*, 169(9–10), 693–698.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.02.006>

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., y Martínez, J. (2002). *Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview*. *International Microbiology*, 5(2), 53–63.
<https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>

Pérombelon, M. C. M. (2002). *Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis*. *Plant Pathology*, 51(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x>

Ryu, J. S., Shary, S., Houtman, C. J., Panisko, E. A., Korripally, P., St. John, F. J., y Hammel, K. E. (2011). *Proteomic and Functional Analysis of the Cellulase System Expressed by Postia placenta during Brown Rot of Solid Wood*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7933–7941. <https://doi.org/10.1128/AEM.05496-11>

Saha, N. D., Chaudhary, A., Singh, S. D., Singh, D., Walia, S., y Das, T. K. (2015). *Plant Pathogenic Microbial Communication Affected by Elevated Temperature in Pectobacterium carotovorum subsp.*

carotovorum. *Current Microbiology*, 71(5), 585–593.

<https://doi.org/10.1007/s00284-015-0888-5>

Sammond, D. W., Payne, C. M., Brunecky, R., Himmel, M. E., Crowley, M. F., y Beckham, G. T. (2012). *Cellulase Linkers Are Optimized Based on Domain Type and Function: Insights from Sequence Analysis, Biophysical Measurements, and Molecular Simulation*. *PLoS ONE*, 7(11), e48615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048615>

Sampedro, J., Carey, R. E., y Cosgrove, D. J. (2006). *Genome histories clarify evolution of the expansin superfamily: new insights from the poplar genome and pine ESTs*. *Journal of Plant Research*, 119(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s10265-005-0253-z>

Sampedro, J., y Cosgrove, D. J. (2005). *The expansin superfamily*. *Genome Biology*, 6(12), 242–242. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-12-242>

Sánchez, C. (2009). *Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi*. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>

Sashihara, N., Kudo, T., y Horikoshi, K. (1984). *Molecular cloning and expression of cellulase genes of alkalophilic Bacillus sp. strain N-4 in Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 158(2), 503–506.

Šiurkus, J., y Neubauer, P. (2011). *Heterologous production of active ribonuclease inhibitor in Escherichia coli by redox state control and chaperonin coexpression*. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-65>

- Smalla, K., Jechalke, S., y Top, E. M. (2015). *Plasmid detection, characterization and ecology*. *Microbiology spectrum*, 3(1), 10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014>
- Welch, M., Todd, D. E., Whitehead, N. A., McGowan, S. J., Bycroft, B. W., y Salmond, G. P. C. (2000). *N-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in Erwinia*. *The EMBO Journal*, 19(4), 631–641.
<https://doi.org/10.1093/emboj/19.4.631>
- Yaniv, O., Frolow, F., Levy-Assraf, M., Lamed, R., y Bayer, E. A. (2012). *Chapter thirteen - Interactions Between Family 3 Carbohydrate Binding Modules (CBMs) and Cellulosomal Linker Peptides*. En Harry J. Gilbert (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. Volume 510, pp. 247–259). Academic Press. Recuperado el 10 de noviembre del 2016 de
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124159310000136>
- Zhang, H., Zhang, G., Yao, C., Junaid, M., Lu, Z., Zhang, H., y Ma, Y. (2015). *Structural Insight of a Trimodular Halophilic Cellulase with a Family 46 Carbohydrate-Binding Module*. *PLoS ONE*, 10(11), e0142107.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142107>
- Zhang, Z., Kuipers, G., Niemiec, Ł., Baumgarten, T., Slotboom, D. J., de Gier, J.-W., y Hjelm, A. (2015). *High-level production of membrane*

proteins in E. coli BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG. Microbial Cell Factories, 14, 142. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0328-z>

Zhou, C., y Wu, Q. (2012). *Recent Development in Applications of Cellulose Nanocrystals for Advanced Polymer-Based Nanocomposites by Novel Fabrication Strategies*. En S. Neralla (Ed.), *Nanocrystals - Synthesis, Characterization and Applications* (p. Ch. 06). Rijeka: InTech. <https://doi.org/10.5772/48727>

Zitomer, S. W., y Eveleigh, D. E. (1987). *Cellulase screening by iodine staining: An artefact*. *Enzyme and Microbial Technology, 9(4), 214–216. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90017-2](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90017-2)*

ANEXOS

Curva calibrado Glucosa-DNS

