

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMÍCAS



EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN EXTRACELULAR DE  
CELULASAS RECOMBINANTES USANDO *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Por

IQ. LUIS FRANCISCO CEPEDA MORALES

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con  
Orientación en Procesos Sustentables

Mayo del 2021

EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN EXTRACELULAR DE  
CELULASAS RECOMBINANTES USANDO *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Revisión de tesis:

---

Dr. Eduardo Soto Regalado

ASESOR

---

Dr. José Rubén Morones Ramírez

COASESOR

---

Dra. Mónica María Alcalá Rodríguez

COMITÉ TUTORIAL

---

Dr. Carlos Escamilla Alvarado

COMITÉ TUTORIAL

---

Dr. Héctor Javier Amézquita García

COMITÉ TUTORIAL

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a toda aquella persona e institución que directa o indirectamente estuvo presente y me ayudo durante el desarrollo de este proyecto.

A la Facultad de Ciencias Químicas, al Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología y al CONACyT por el apoyo económico que me brindaron, así como por facilitar el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

A mi asesor y mi coasesor de tesis, el Dr. Eduardo Soto y el Dr. Rubén Morones por darme la oportunidad de realizar esta meta en la vida. De apoyarme en todo, a lo largo de este proyecto con consejos, conocimientos, palabras de animo y ganas de siempre dar lo mejor.

A mi comité tutorial, Dra. Mónica Alcalá, Dr. Carlos Escamilla y Dr. Héctor Amézquita, por su apoyo, por tomar su tiempo para revisar este trabajo, por los consejos dados, las observaciones para siempre mejorar profesionalmente y por sus ánimos durante este tiempo que trabajamos juntos.

A todos mis compañeros del laboratorio de Biología Sintética, que se convirtieron en otros asesores y mentores más, que me ayudaron cuando las cosas no salían y me daban ánimos para seguir adelante. Que me tuvieron paciencia en mis momentos de estrés y de mal humor.

A toda mi familia y amigos que me apoyaron en cumplir esta meta y poder sacar la espinita que tenia en cuestión de hacer un posgrado. Que siempre estuvieron allí, aunque fuera algunos de ellos a la distancia, pero siempre presentes.

Quiero agradecer a la vida por darme la oportunidad de lograr este objetivo y de darme la oportunidad de conocer a muchas personas que se que de ahora en adelante representan una parte importante en mi vida tanto personal como profesional.

# DEDICATORIA

*Este trabajo esta dedicado a mi familia.*

*Mi madre Claudia Morales y a mi padre Juan Cepeda, que a pesar de todo siempre se  
que cuento con su apoyo.*

*Para mi hermana Cecilia Cepeda.*

*Y para mi*

*Que este trabajo sea una prueba de las cosas que puedes hacer si crees en ti mismo.*

# TABLA DE CONTENIDO

Capitulo	Pagina
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
1.1 LA CELULOSA Y LA PROBLEMÁTICA EN SU APROVECHAMIENTO.....	7
1.2 CELULASAS Y LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	10
1.3 BIOLOGÍA SINTÉTICA: UNA HERRAMIENTA PARA NUEVAS SOLUCIONES .....	13
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>16</b>
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
3.1 HIPÓTESIS .....	24
3.2 OBJETIVO GENERAL .....	24
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>26</b>
4.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO .....	26
4.2 CEPAS BACTERIANAS.....	27
4.3 PRODUCCIÓN DE CELULASAS .....	27
4.4 METODOLOGÍA DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	28
4.5 GEL DE PROTEÍNAS SDS-PAGE .....	28
4.6 METODOLOGÍA DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD.....	29
4.7 METODOLOGÍA DE CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DE MILLER.....	29
4.8 MANEJO Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS.....	30
<b>5 RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>31</b>
5.1 PRODUCCIÓN DE CELULASAS EN MEDIO TERRIFIC (TB).....	31
5.2 PRODUCCIÓN DE CELULASAS EN MEDIO MÍNIMO (M9) .....	33
5.3 PRODUCCIÓN DE CELULASAS EN MEDIO LURIA-BERTANI (LB) .....	37
5.4 PRODUCCIÓN DE CELULASAS. VARIACIÓN DEL MEDIO CULTIVO. ....	39
5.5 GEL SDS-PAGE.....	43
<b>6 CONCLUSIONES</b> .....	<b>46</b>
<b>7 REFERENCIAS</b> .....	<b>47</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> PRINCIPALES COMPONENTES DE ALGUNOS RESIDUOS LIGNOCELULOSOS[3]. .....	17
<b>TABLA 2.</b> NOMENCLATURA Y ESPECIFICACIONES DE LAS MUESTRAS. PRODUCCIÓN EN MEDIO M9.....	34
<b>TABLA 3.</b> NOMENCLATURA Y ESPECIFICACIONES DE LAS MUESTRAS. PRODUCCIÓN EN MEDIO M9.....	37
<b>TABLA 4.</b> COMPOSICIÓN DEL MEDIO TB .....	41
<b>TABLA 5.</b> COMPOSICIÓN DEL MEDIO LB .....	42

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> MODELOS DE POSIBLES ACOMODOS DE LAS MICROFIBRILLAS DE LA CELULOSA[1].	8
<b>FIGURA 2.</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ACCIÓN DE LAS CELULASAS SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA CELULOSA[3].	11
<b>FIGURA 3.</b> TRES ESTRATÉGICAS DE BIOPROCESOS CONSOLIDADOS EN LA OBTENCIÓN DE MICROORGANISMO ÚTILES EN EL PROCESAMIENTO DE MATERIAS CELULÍTICAS[11].	14
<b>FIGURA 4.</b> CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES. BL21 CEPA WILD TYPE, BD3 CEPA PRODUCTORA DE CELULASAS.	32
<b>FIGURA 5.</b> ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. BL21 CEPA WILD TYPE, BD3 CEPA PRODUCTORA DE CELULASAS.	33
<b>FIGURA 6.</b> CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA BD3 DURANTE PRODUCCIÓN EN MEDIO M9.	34
<b>FIGURA 7.</b> CURVA DE CUANTIFICACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES DURANTE PRODUCCIÓN EN MEDIO M9.	35
<b>FIGURA 8.</b> CURVA DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES DE LA CEPA BD3 DURANTE PRODUCCIÓN EN MEDIO M9.	36
<b>FIGURA 9.</b> CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES DE LA CEPA BD3 EN MEDIO LB.	38
<b>FIGURA 10.</b> ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CEPA BD3 EN MEDIO LB.	39
<b>FIGURA 11.</b> CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES DE LA CEPA BD3 EN DISTINTOS MEDIOS.	40
<b>FIGURA 12.</b> ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CEPA BD3 EN DISTINTOS MEDIOS.	41
<b>FIGURA 13.</b> GEL DE POLIACRILAMIDA, SDS-PAGE AL 12% DE LAS CELULASAS RECOMBINANTES DE LA CEPA BD3. MARC: MARCADOR DE PESO. MUESTRAS DE SOBRENADANTE (MEDIO DE CULTIVO) DE LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS CON VARIACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO.	44
<b>FIGURA 14.</b> GEL DE POLIACRILAMIDA, SDS-PAGE AL 12% DE LAS CELULASAS RECOMBINANTES DE LA CEPA BD3. MARC: MARCADOR DE PESO. CARRIL 1: BL21 CEPA SIN MODIFICACIÓN. CARRILES 2-4: MUESTRAS PERIPLASMÁTICAS DE BD3 EN MEDIO LB. CARRILES 5-7: MUESTRAS PERIPLASMÁTICAS DE BD3 EN MEDIO TB. ESTAS MUESTRAS FUERON TOMADAS DEL EXPERIMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS CON VARIACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO.	45

## NOMENCLATURA

%	Porcentaje
μg	Microgramo
μL	Microlitro
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
°C	Grados centígrados
CMC	Carboximetilcelulosa sódica
<i>C. thermocellum</i>	<i>Clostridium thermocellum</i>
DNS	Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FPU	Unidades de papel filtro
g	Gramos
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
IU	Unidad internacional de actividad de celulasa
Km	Constante cinética Michaelis-Menten
L	Litros
m	Metro
M	Molar
min	Minuto

mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
No	Número
OD <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600 nanometros
PHB	Polihidroxibutirato
rpm	Revoluciones por minuto
<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
U	Unidades de actividad enzimática
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima

# RESUMEN

**Luis Francisco Cepeda Morales**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Fecha de graduación:** Mayo, 2021

**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Procesos Sustentables**

**Título:** Efecto del medio de cultivo en la producción extracelular de celulasas recombinantes usando *Escherichia coli* BL21 (DE3)

**Numero de paginas:**

**Área de estudio:** Bioprocesos

La celulosa es un polisacárido formado por cientos de unidades de D-glucosa y es la biomolécula más abundante estando presente en su gran mayoría en toda la biomasa terrestre. Debido a su difícil obtención y degradación en azúcares más aprovechables, así como al poco desarrollo de procesos adecuados para su aprovechamiento, la mayor parte de esta celulosa se acumula y desperdicia como residuos causando problemas medio ambientales, así como representando un desaprovechamiento de un importante recurso.

En este trabajo se utilizará una cepa de *Escherichia coli* BL21 DE3 modificada genéticamente para la producción extracelular y optimización de 2 proteínas de fusión con los sitios catalíticos de las 3 celulasas principales en la hidrólisis de la celulosa.

La expresión de celulasas extracelulares fue de 511  $\mu\text{g/mL}$  con una actividad enzimática de 1.08 UI/mL en Terrific Broth (TB). Por el contrario, no se observó la expresión extracelular en medio mínimo (M9) y Luria Bertani (LB, Miller).

Con el fin de mejorar la producción de celulasas extracelulares en medios TB, se aumentó el volumen final de cultivo (50 y 100 mL). En medio TB a 50 mL, la expresión de celulasas extracelulares fue de 355.5  $\mu\text{g/mL}$  con una actividad enzimática de 1.24 UI/mL, mientras que a 100 mL no se obtuvo expresión.

Se han detectado varios factores que afectan la producción de las celulasas, como lo es el medio de cultivo, la aeración y la concentración de inductor. Con estas variables detectadas, se espera en los resultados próximos ver una producción de celulasas optimizada con estos factores como variables ya óptimas.

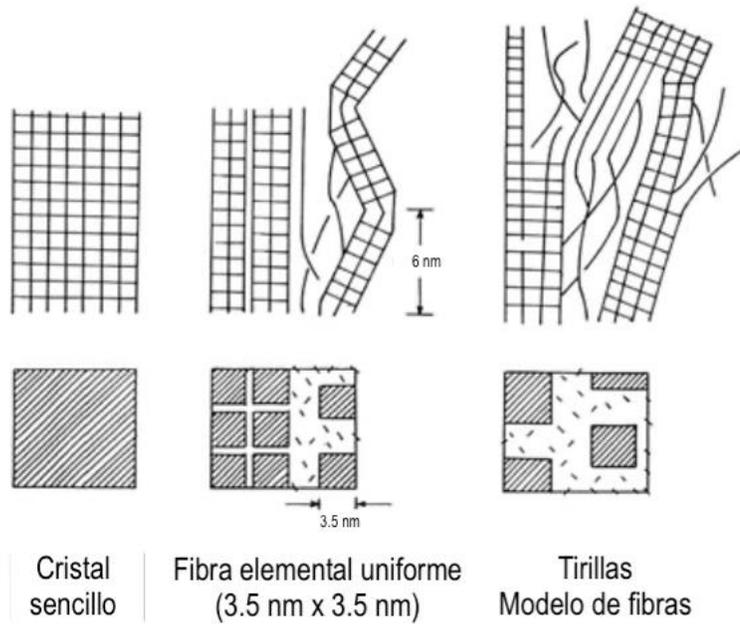
# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 La celulosa y la problemática en su aprovechamiento

La celulosa es el polímero orgánico más común en todo el mundo, estando presente en su mayoría en la biomasa terrestre estimando una producción anual de  $1.5 \times 10^{12}$  toneladas; debido a esto, es considerada como la fuente de carbono renovable más abundante de la Tierra y como una gran opción para ser utilizada como materia prima en la producción de diversos compuestos o productos de interés comercial que sean más sustentables[1].

A nivel molecular, este polímero está formado por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1-4 formando largas cadenas lineales. A su vez, estas cadenas se acoplan uniéndose por enlaces de puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals formando estructuras empaquetadas conocidas como microfibrillas; estas, al estar formadas, van acoplándose de manera paralela una encima de la otra hasta formar una estructura cristalina altamente ordenada. Sin embargo; a pesar de la estructura tan estable que se llega a formar, la celulosa presenta regiones donde este empaquetado no logra completarse del todo formando regiones amorfas o dejando pequeños huecos dentro de la misma estructura[1-3].



**Figura 1.** Modelos de posibles acomodos de las microfibrillas de la celulosa. Tomada de [1].

Esta estructura, en la cual se encuentra la celulosa de manera natural la mayor parte del tiempo, le proporciona ciertas propiedades como hidrofiliidad, quiralidad, degradabilidad y amplia variabilidad química. A esto se le suma la diversidad de estructuras y morfologías de fibras cristalinas que hacen de la celulosa un biomaterial con una alta resistencia[1,4]. Dicha resistencia hace de la celulosa un compuesto difícil de degradar volviéndolo uno de los principales problemas para su aprovechamiento como fuente de carbono llegando a estimar su vida media de millones de años, estando a condiciones de pH neutro y en ausencia de enzimas[2].

Como se menciona al principio, la celulosa se encuentra presente, en su mayoría, en la biomasa terrestre ya que es sintetizada por plantas como parte primordial de su pared celular constituyendo entre el 35 y 50% del peso seco de estas; así como también es sintetizada por algunos otros microorganismos como bacterias y algas[2]. Es importante

mencionar que la pared celular de las plantas no solo se conforma de celulosa, sino también de otros compuestos como la hemicelulosa y la lignina. Estos tres en conjunto forman una estructura donde la celulosa forma el esqueleto que es rodeado por hemicelulosa y lignina. Este acomodo hace que la celulosa se encuentre menos disponible para ser utilizada como materia prima[3,5].

La biomasa es toda la materia biológica de los organismos vivos; hablando particularmente de la celulosa, esta se encuentra en la biomasa de plantas ya que es sintetizada por las mismas en su proceso natural de la fotosíntesis. Esta biomasa proviene de distintas fuentes como la agricultura, los bosques y los residuos[6].

Los residuos de biomasa, o también conocidos como residuos lignocelulosos, son en su mayoría biomasa residual que no logra ser aprovechada en su totalidad debido a diversos factores pero que sigue teniendo la presencia de diversos compuestos químicos que, con el debido proceso y tratamiento, pueden ser aprovechados en la producción de diversos productos de interés como el etanol, biogás, biomateriales o enzimas, solo por mencionar algunos. Debido a esto, el no uso de estos residuos lignocelulosos representa una pérdida importante de una potencial materia prima provocando además la acumulación de estos desechos causando un daño al medio ambiente[3].

Por todo lo anterior, la celulosa es considerada una fuente de carbono con suma importancia y con tantas ventajas que puede colocarse como la materia prima principal en varias industrias; sin embargo, su compleja obtención y separación de otros compuestos, así como su difícil degradación a azúcares más simples hacen del aprovechamiento de la celulosa todo un reto para las industrias.

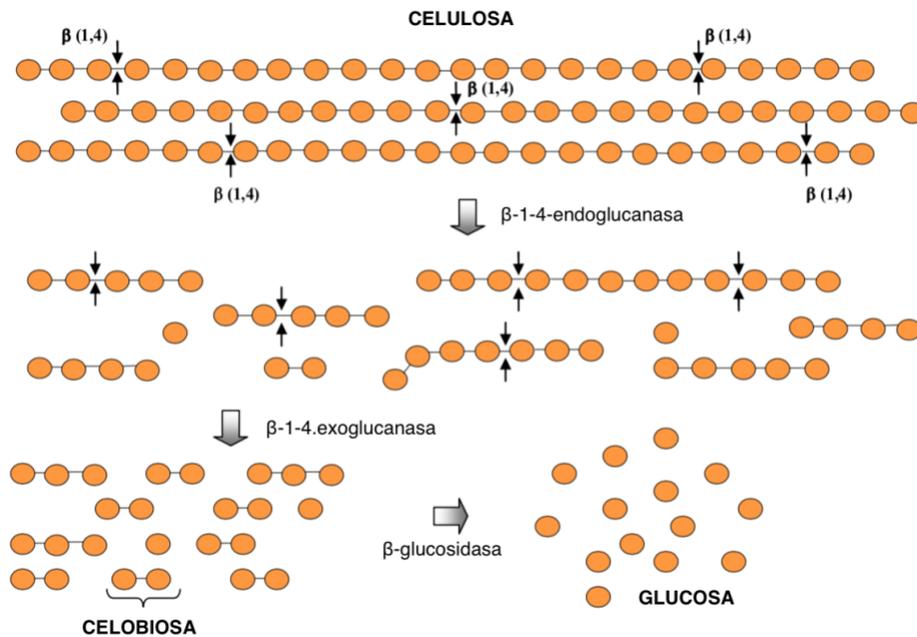
## 1.2 Celulasas y la hidrólisis enzimática

Es claro que actualmente el uso de la celulosa no es tan sencillo en las industrias a pesar de ser una comprobada materia prima de muy bajo costo. Esto ha llevado a los científicos a realizar investigaciones con varios enfoques y uno de ellos ha sido la hidrólisis de la celulosa[7].

La hidrólisis enzimática de la celulosa es hecha por las celulasas, que con las enzimas específicas encargadas de este proceso. Estas son producidas en la naturaleza por distintos microorganismos, en los cuales los principales productores son los hongos seguidos por algunas bacterias[8]. También se ha demostrado la presencia de los genes de algunas celulasas en algunos miembros de la familia de los artrópodos como lo son en moluscos o algunos insectos[9].

A diferencia de otras enzimas, cuando se habla de las celulasas siempre se hace referencia a un conjunto de ellas, ya que actúan de manera sinérgica y conjunta para la degradación de la celulosa. En la naturaleza, este conjunto es compuesto principalmente por 3 grupos de celulasas:  $\beta$ -1-4-endoglucanasa (EC 3.2.1.4),  $\beta$ -1-4-exoglucanasa (EC 3.2.1.91.) y  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21.) [8]. Su manera de acción es hidrolizar los enlaces  $\beta$ -1,4- glucosídicos en la celulosa dando como productos principales glucosa, celobiosa y celooligosacáridos[10]. Este mecanismo de acción se lleva a cabo de tal manera que las  $\beta$ -1-4-endoglucanasas cortan de manera aleatoria el interior de baja cristalinidad de la celulosa creando nuevos oligosacáridos de diversas longitudes y, con ello, nuevos extremos de cadena libre. En estos extremos de la cadena las  $\beta$ -1-4-exoglucanasas actúan de manera progresiva degradándolos en glucosa o celobiosa; además, trabaja en las zonas de alta cristalinidad de la celulosa. En la última etapa, las  $\beta$ -glucosidasas se encargan de

hidrolizar la celobiososa y otros  $\beta$ -1,4-oligoglucósidos de cadena corta en glucosa[2,3,10,11].



**Figura 2.** Representación esquemática de la acción de las celulasas sobre la estructura de la celulosa[3].

Las celulasas, como muchas enzimas, presentan características adecuadas para ser usadas a nivel industrial como lo es su alta especificidad, la generación de pocos desechos y, en algunos casos, las condiciones extremas a las que pueden llegar a trabajar. Sin embargo; por su misma naturaleza protéica son dadas a presentar inhibición, desnaturalización o una baja actividad debido a los distintos cambios en las condiciones del proceso en el que se usan; esto a su vez lleva a usar una mayor cantidad de enzimas para compensar dichos problemas[2,8,12,13].

A pesar de lo anterior, el principal problema para el uso a nivel industrial de estas enzimas es el alto costo en que establecen las celulasas comerciales, ya que en procesos como la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulosos se han reportado estudios donde se necesita usar cantidades de celulasas con una actividad de 15 FPU que

equivalen a usar aproximadamente 30 g de enzimas por 1 L de etanol producido[13]. A lo anterior se le puede sumar el actual aumento en la demanda de estas enzimas para su uso en otras industrias como lo son la industria alimentaria, textil, papelera, de detergentes, entre varias otras[7,14].

A nivel industrial, la hidrólisis enzimática ha tomado mucho interés debido al desarrollo y crecimiento de las industrias de biocombustibles o biorefinerías. Estas industrias buscan producir combustibles y productos químicos a partir de la biomasa; sin embargo, la mayoría de ellos son producidos utilizando la celulosa como fuente de carbono, para ello se necesita que esta se encuentre en la forma mas simple que es la molécula de D-glucosa. Siendo la hidrólisis el proceso natural, han querido llevarla a cabo a nivel industrial pero debido a los diversos problemas con costos y actividad de las celulasas esto se vuelve un paso muy complicado a nivel industrial[15].

Por esto mismo, se han establecido procesos para la hidrólisis de la celulosa sin tener que usar enzimas. En general, el proceso es llevado a cabo por vía química usando distintos compuestos ácidos o alcalinos[3]. La metodología mayormente reportada es el uso de ácidos inorgánicos y altas temperaturas que, además de hidrolizar la celulosa llegan a producir otros compuestos como ácidos débiles, furanos y compuestos fenólicos que son tóxicos para los microorganismos que se usan en la fermentación y además de ser peligrosos para el medio ambiente[14,16]. Este proceso se vuelve viable debido a los costos eficientes que presenta pero con un bajo rendimiento y pobre calidad del producto final[16]; por lo que se vuelve necesario el uso de un proceso extra para remover todos esos componentes[14,17].

Por el contrario, la vía biológica que usa las celulasas es más eficiente, en algunos casos puede llevarse a condiciones ambientales y no genera componentes ni residuos

tóxicos. Lo que hace entender el gran interés que se tiene por mejorar todos los procesos que envuelve a la hidrólisis enzimática y a las celulasas[18].

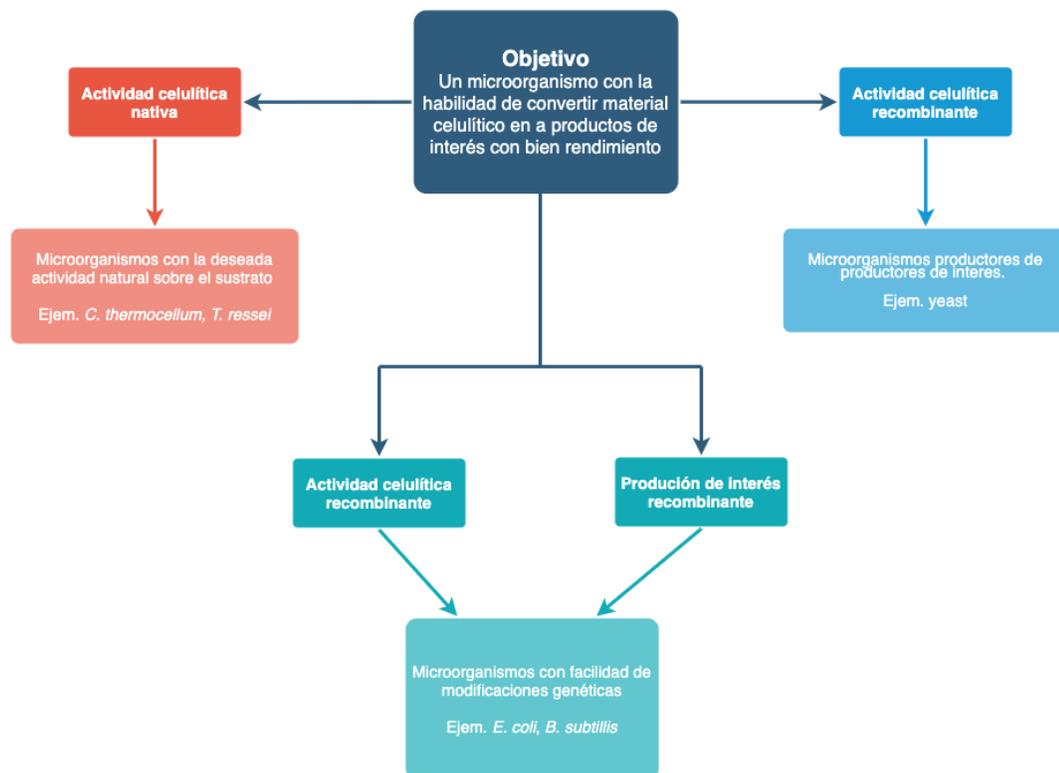
### 1.3 Biología sintética: una herramienta para nuevas soluciones

Diversas estrategias se han estudiado en los últimos años para solucionar la problemática del uso de celulasas a nivel industrial enfocándose en el aumento de la producción de las celulasas para disminuir los costos como buscar microorganismos hiperproductores de celulasas[8], realizar investigación más detallada de los mecanismos de regulación para aumentar su producción en los organismos ya existentes[2], optimización de las condiciones de producción de los microorganismos productores[19], el uso co-cultivos de distintos microorganismos productores para aumentar la cantidad de celulasas producidas[20], entre otras. Otros estudios se han enfocado en la parte catalítica de las celulasas modificando sus estructuras para incrementar su actividad en nuevos sustratos o mejorar la estabilidad a temperaturas extremas o pH[12].

Una alternativa que ha tomado interés entre los investigadores es el uso de la biología sintética como herramienta para mejorar la producción de estas enzimas, esto debido a los avances favorables que se han logrado obtener en los últimos años.

No se tiene una definición exacta de lo que es la biología sintética; sin embargo, en base a los distintos trabajos y áreas que se han desarrollado gracias a su uso, se puede definir como la disciplina que busca la creación de sistemas biológicos que no existen en la naturaleza regulando, modificando y replicando los sistemas biológicos conocidos[21–23].

Actualmente, la biología sintética se ve como una herramienta muy prometedora debido a que se pueden llegar a establecer procesos muy amplios y de interés industrial desde un microorganismo como lo es el uso de cepas como biorefinerías, donde un solo microorganismo pueda producir una gran variedad de compuestos de interés[24], todo en un mismo proceso; o como es el establecimiento de consorcios microbianos sintéticos donde se puedan controlar las interacción de todos los microorganismos presentes para distintas aplicaciones[23].



**Figura 3.** Tres estrategias de bioprocesos consolidados en la obtención de microorganismo útiles en el procesamiento de materias celulíticas[11].

En el ámbito particular de las celulasas, el uso de la biología sintética como herramienta ha abierto nuevos caminos para el desarrollo de una producción industrial

mejorada de las celulasas[21]. Se han hecho investigaciones mejorando la expresión de las celulasas en microorganismo naturalmente productores como los hongos, bacterias e incluso plantas modificando la expresión de los genes específicos de las celulasas en ellos[14]. También se ha llegado a producir celulasas en microorganismos que naturalmente no son productores de celulasas pero que por la amplia investigación en ellos representan una oportunidad en la producción de proteínas recombinantes como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, son algunos ejemplos de ellos[21,25,26].

*Escherichia coli* es el microorganismo más ampliamente estudiado y usado dentro de la biología sintética, especialmente en la producción de proteínas recombinantes y, específicamente, en la expresión de celulasas. Los principales motivos para el uso de este microorganismo es el crecimiento rápido en medios muy económicos, la habilidad de alcanzar altas densidades celulares, así como altas expresiones de proteínas y el amplio conocimiento disponible de su fisiología, genética y de la manipulación genética en éste[11,27,28].

Esto a llevado a colocarlo como la primera opción cuando se habla de modificaciones genéticas que tienen como fin su uso en un proceso a nivel industrial y aunque presenta desventajas como ocasionales problemas en la expresión recombinante o bajos rendimientos finales, siguen siendo la mejor opción para ser considerada en la industria[29,30].

Estas tecnologías en desarrollo nos proporcionan nuevos caminos para investigar mejoras en los procesos industriales ya existentes, como la producción de celulasas y el mejor aprovechamiento de los residuos lignocelulosos, y lograr avances importantes hacia la implementación de procesos más sustentables en la industria.

## CAPÍTULO 2

### 2. ANTECEDENTES

La producción de celulasas es un proceso que se ha estudiado durante mucho tiempo; sin embargo, en los últimos años la investigación y desarrollo en su producción ha aumentado considerablemente debido a la creciente demanda de estas en el mercado global. Esto anterior es causado por el aumento del interés en las industrias de establecer procesos más sustentables a causa del cambio climático.

Esto se ido realizando de muchas maneras, desde los distintos tipos de residuos lignocelulosos a usar como fuente de carbono y su influencia en la expresión de las celulasas, su composición precisa y el mecanismo de acción de las celulasas sobre cada uno de ellos hasta la modificación genética en bacterias u hongos para lograr una mejor producción de estas, todo con la finalidad de encontrar mejoras que ayuden a establecer un mejor proceso de hidrólisis enzimática a nivel industrial.

En cuestión de los residuos lignocelulosos, a lo largo de los años se han reportado el uso de una gran variedad de residuos como fuente de carbono para la producción u obtención de celulasas como el uso del bagazo de caña de azúcar en Brasil[31], el uso de residuos de papel y de aserrín en India[32] o el uso de residuos de maíz, trigo y arroz en México[10]. Aunque estos son algunos ejemplos puntuales de su uso, es común que se

usen residuos lignocelulosos como sustratos en la producción de celulasas a nivel industrial como lo es la paja de arroz, la paja de trigo y el bagazo de caña en industrias como la textil y la alimenticia[33].

**Tabla 1.** Principales componentes de algunos residuos lignocelulosos[3].

Residuo lignoceluloso	Celulosa (%peso)	Hemicelulosa (%peso)	Lignina (%peso)
Paja de cebada	33.8	21.9	13.8
Mazorca	33.7	31.9	6.1
Tallo de maíz	35	16.8	7
Tallo de algodón	58.5	14.4	21.5
Paja de avena	39.4	27.1	17.5
Paja de arroz	36.4	19	9.9
Paja de centeno	37.6	30.5	19
Tallo de soya	34.5	24.8	19.8
Bagazo de caña de azúcar	40	27	10
Tallo de girasol	42.1	29.7	13.4
Paja de trigo	32.9	24	8.9

Para facilitar la selección de los residuos en este proceso, se han reportado a lo largo de los años las composiciones en porcentaje de peso seco de celulosa, hemicelulosa y lignina en diferentes residuos lignocelulosos (Tabla 1) así como los mecanismos de acción de las enzimas sobre estos[34,35]. Estos mecanismos de acción son de ayuda para entender el comportamiento de las enzimas sobre los residuos lignocelulosos y determinar el posible efecto de estos en su producción.

La investigación activa de las celulasas tiene registros de su comienzo en la década de 1950 donde se comenzó a tomar interés por el potencial uso de los residuos lignocelulosos como una muy importante materia prima, aunque su aplicación a nivel industrial no se dio sino hasta la década de 1980 donde comenzó su uso en la alimentación en animales[36].

Los hongos fueron los principales microorganismos con los cuales se realizaron las primeras investigaciones. Uno de los motivos que llevaron al uso de los hongos es que son los principales degradadores de los residuos lignocelulosos en la naturaleza; por eso, para 1976 ya se tenían 14000 especies de hongos identificadas capaces de degradar la celulosa[17].

Kuhad *et al.*[37] y Dashtban *et al.*[17] realizan un recuento de algunos de los hongos estudiados a lo largo de los años. Estos mencionan también otras características que encontraron conforme el avance en la investigación en estos microorganismos como la gran variedad de enzimas que los hongos podían secretar para hidrolizar los residuos lignocelulosos, así como que algunas especies tenían la habilidad de degradación produciendo las enzimas de manera extracelular.

Debido a que los hongos han sido los microorganismos más estudiados se encontraron puntos débiles en el uso de estos[38], lo que llevo al análisis de la producción de celulasas usando otros microorganismos productores como los son las bacterias.

Las ventajas de usar bacterias en lugar de hongos como organismos productores de celulasas fueron reportadas a conforme se fue aumentando la investigación en estos primeros. Sadhu *et al.*[39] realiza un recuento de las ventajas mostradas en el uso de bacterias como productoras de celulasas presentando una mayor tasa de crecimiento que un hongo permitiendo una producción mas rápida. Otra ventaja que muestra es que debido

a la variedad de ambientes en las que pueden llegar a vivir algunas bacterias son capaces de soportar condiciones extremas y al mismo tiempo producir enzimas que también son estables a estas condiciones lo que las hace más útiles en un proceso de producción como por ejemplo en las biorefinerías dedicadas a la producción de etanol.

A lo largo de los años, se han ido realizando estudios tanto con hongos como bacterias, buscando mejorar la producción de celulasas para poder ser llevados a nivel industrial y sean una solución a los problemas en la demanda creciente de estas enzimas. Sukumaran *et al.*[8] y Yang *et al.*[13] mencionaron algunas de las muchas investigaciones que se han realizado con microorganismos como *Aspergillus niger*, *Penicillium funniculosum*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas flavigena*, *Clostridium thermocellum*, por mencionar algunos.

Se han buscado diferentes caminos en la mejora de la producción con estos microorganismos, que van desde la selección del mejor pretratamiento para los residuos lignocelulosos para desencadenar una mejor producción de celulasas, hasta la optimización de las condiciones de cultivo para lograr la mejor producción de celulasas en términos de la actividad enzimática.

Sukumaran *et al.*[18] usaron dos distintos pretratamientos (ácido y alcalino) para los residuos que usaron en la producción de celulasas y reportan un mejor rendimiento en términos de azúcares reductores usando el tratamiento alcalino que el ácido en todos los residuos que usaron como fuente de carbono.

Gutiérrez-Rojas *et al.*[2] nos dan un análisis a profundidad de los mecanismos de acción de algunos de algunos hongos y una propuesta del comportamiento de cada uno de ellos al momento de la hidrólisis enzimática.

Rana *et al.*[20] llevaron a cabo la hidrólisis enzimática usando un coctel de celulasas in situ usando a *Trichoderma reesei* RUT-C30 y *Aspergillus saccharolyticus* obteniendo resultados iguales a usar cocteles de celulasas comerciales, lo que muestra una forma en la que se pueden obtener los mismos resultados llevando a cabo el proceso en el lugar.

Muhammad *et al.*[19] llevaron a cabo la optimización de la producción de celulasas con *Aspergillus tubingensis* IMMIS2 con diferentes sustratos usando la metodología de superficie de respuesta como herramienta de optimización obteniendo una actividad máxima de 112  $\mu\text{g/mL/min}$  y obteniendo los factores significativos para el aumento en la actividad.

A esta búsqueda de soluciones a la producción de celulasas se le ha abierto el uso de la biología sintética y la manipulación genética como nuevas herramientas que abren nuevas opciones para la producción de celulasas a nivel industrial.

Ellilä *et al.*[31] usaron a una cepa de *Trichoderma reesei* genéticamente modificada que secreta celulasas en la presencia específica de ciertos azúcares y agregaron los genes para la expresión  $\beta$ -glucosidasa para mejorar la degradación de esta, obteniendo que estas con estas modificaciones genéticas mejoraron la producción y degradación de los sustratos usados.

Debido a los resultados amplios usando la biología sintética como herramienta y la producción de celulasas, los investigadores comenzaron a usar microorganismos que naturalmente no son productores de celulasas pero que han demostrado su uso siendo usados a nivel industrial. Lambertz *et al.*[28] proporcionaron un resumen de todos los retos y ventajas que se han topado a lo largo de los años en el uso de la biología sintética para la producción de proteínas recombinantes en diferentes microorganismos; mientras

que, Srivastava *et al.*[21] centran este mismo tema hacia la producción específica de celulasas recombinantes y las ventajas que esto demuestra para la demanda actual.

Esto llevó a ver a *Escherichia coli* como una opción viable para la producción de celulasas a nivel industrial. Esta bacteria se ha convertido en una de las opciones más prometedoras debido al gran uso que se le da como productora de muchos compuestos y es el microorganismo que más se ha estudiado, esto último a dado mucha información importante para lograr su manipulación genética, principalmente en la producción de proteínas recombinantes, e información de su uso a nivel industrial[40].

En cuestión de la producción de celulasas en *Escherichia coli*, se tienen varias investigaciones que han mostrado resultados favorables. Wulff *et al.*[41] reportan la clonación del gen Xf818, de una endoglucanasa de la planta *Xylella fastidiosa*, la expresión y la purificación de la celulasa en *Escherichia coli* para facilitar su obtención y caracterización; logrando obtener la degradación de CMC a un pH de 5.2 y temperatura de 65 °C.

Zafar *et al.*[42] realizaron la clonación, expresión, purificación y caracterización del gen de una endoglucanasa de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 en *Escherichia coli* BL21 (DE3) logrando obtener una actividad enzimática de 18.25 U/mL/min. Además, los resultados demostraron la resistencia de la enzima en temperaturas arriba de 90 °C a rangos de pH entre 3 a 8 y demostraron la resistencia de esta celulasa a inhibidores como Tween 80.

Li *et al.*[43] realizaron la clonación, expresión y purificación del gen de una endocelulasa de *Bacillus subtilis* DR en *Escherichia coli* BL21 (DE3) logrando obtener una producción 3 veces mayor en la cepa recombinante que en la cepa original.

Amraini *et al.*[44] utilizaron la cepa de *Escherichia coli* EgRK2 modificada para la expresión extracelular de la endoglucanasa de *Bacillus sp.* RK2 para su producción usando manajo de fruta como sustrato y sus resultados mostraron que la actividad de las celulasas producidas por la cepa recombinante era mayor que la actividad con los residuos que la cepa original obteniendo 1.905 y 1.366 U/mL, respectivamente. Además de observar mejoras en las características en las celulasas de *E. coli* que las de *B. sp* como aumento en la temperatura optima de degradación de 50 °C a 60 °C, así como mejores valores de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$ .

Mohammad *et al.*[45] utilizaron la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) modificada para la expresión extracelular de la endoglucanasa FnCel5A de *Fervidobacterium nodosum*, optimizando a la par la producción mediante el uso de metodología de superficie de respuesta como herramienta logrando obtener las mejores condiciones de cultivo en 0.56 mM IPTG e incubando durante 29.5 horas a 24 °C, alcanzando la mayor actividad enzimática de 3.31 IU/ mL.

Gao *et al.*[30] utilizaron la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) modificada para la expresión extracelular de una proteína de fusión con dos sitios catalíticos de celulasas, una endoglucanasa de *Bacillus sp* y una  $\beta$ -glucosidasa de *Thermobifida fusca* YX, y ser usada como una cepa que pudiera usar celulosa como fuente de carbono. Además, modificaron la ruta metabólica de esta cepa para realizar la síntesis de 3-hidroxipirubato y, así, demostrar el uso de sustratos celulosos como fuente de carbono en la producción de este polímero. Ellos lograron detectar una actividad enzimática de cada una de las celulasas con 38 IU/mL y 46.83 IU/mL para la  $\beta$ -glucosidasa y endoglucanasa, respectivamente. A la par, obtuvieron un rendimiento de PHB entre 2.57–8.23 en % de

peso seco usando como fuente de carbono celulosa amorfa/celobiosa; demostrando la creación de una cepa que usa efectivamente celulosa como fuente de carbono para la producción de metabolitos de interés industrial.

Toda la información anterior nos da la pauta para proponer el uso de la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) para la producción de celulasas mediante el uso de la biología sintética como herramienta de modificación genética y lograr tener un microorganismo con capacidad degradadora de residuos lignocelulosos que pueda ser usada a nivel industrial, tanto en la producción de celulasas como en la producción de otros metabolitos de interés comercial. Por lo tanto, en este trabajo se utilizará una cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) modificada genéticamente para la producción extracelular y optimización de 2 proteínas: la primera es una proteína de fusión usando el dominio catalítico (CelCD) de la endo  $\beta$ -1-4 glucanasa de *Bacillus* spp. [No. de acceso M84963] fusionado con la  $\beta$ -glucosidasa de *Thermobifida fusca* (bglC) [No. de acceso AF086819.2] (excluyendo el péptido señal) y la segunda consiste en los primeros 20 aminoácidos N-terminal del dominio catalítico (Cel20) de la endo  $\beta$ -1-4 glucanasa de *Bacillus* spp. [No. de acceso M84963] fusionado con el cDNA (excluyendo el péptido señal) de la exo  $\beta$ -1,4-glucanasa de *Trichoderma reesei* (CBHII: codones optimizados para la expresión en *E. coli*). Ambos genes fueron clonados en el plásmido pETDuet-1 (Novagen) el cual fue diseñado para la coexpresión de dos genes objetivos regulados por un promotor inducible con IPTG o lactosa. Esto con el objetivo de establecer las bases de un proceso de producción de celulasas a base de residuos lignocelulosos.

## CAPÍTULO 3

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótesis

La cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) podrá expresar de manera extracelular las celulasas modificando el medio de cultivo.

#### 3.2 Objetivo General

Establecer un medio de cultivo para la producción extracelular de celulasas usando la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3).

### 3.3 Objetivos Específicos

- Producir celulasas extracelulares con la cepa BL21(DE3) usando medio mínimo (medio m9) como medio de cultivo.
- Producir celulasas extracelulares con la cepa BL21(DE3) usando medio Luria-Bertani (medio LB) como medio de cultivo.
- Producir celulasas extracelulares con la cepa BL21(DE3) usando medio Terrific Broth (medio TB) como medio de cultivo.
- Optimizar la producción extracelular de celulasas a nivel matraz.

## CAPÍTULO 4

### 4. METODOLOGÍA

#### 4.1 Materiales, reactivos y equipo

Para las diversas pruebas a realizar en este proyecto se utilizó el siguiente material: Matraces Erlenmeyer 125, 250 y 500 mL marca JENAerGLAS, tubos para cultivo marca HACH, tubos de ensayo de 15 y 50 mL marca Corning, Placas de 96 pocillos marca Corning, celdas para espectrofotómetro de 10 mm marca Brand, micropipetas de 2-20, 20-200 y 100-1000  $\mu\text{L}$  con sus respectivas puntillas marca Eppendorf, frascos de 250 mL de vidrio con rosca, tubos para microcentrífuga de 1.5 mL marca Eppendorf.

De los reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto se utilizaron: medio de cultivo Luria-Bertani, ampicilina, IPTG, CMC-sódica, extracto de levadura, triptona, glicerol,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , NaOH,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Los siguientes equipos, que se encuentran en el laboratorio de Biología Sintética y de Sistemas en el Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL, se utilizaron para el desarrollo de las pruebas incluidas en el presente estudio: incubadora estática y con agitación, balanza analítica, campana de flujo laminar, autoclave, refrigerador y congelador Norlake,

espectrofotómetro Optizen 2120 UV Plus, lector de placas Multiskan GO Thermo Scientific y cámara de electroforesis Biorad.

#### 4.2 Cepas bacterianas

La cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3), trabajada durante este proyecto como BD3, fue proporcionada por nuestro mismo grupo de investigación pertenecientes al laboratorio de Biología Sintética y de Sistemas de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

#### 4.3 Producción de celulasas

Para la producción de celulasas se preparó un cultivo overnight, a partir de un cultivo líquido de medio a usar suplementado con Ampicilina (1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). Se tomó una cantidad de 100  $\mu\text{L}$ , se inoculó en un matraz con 100 mL de medio fresco y se dejó incubando por 18 – 20 horas a 37 °C y 150 rpm.

Del cultivo overnight, se tomó la densidad óptica a 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) en un espectrofotómetro Optizen 2120 UV Plus y se realizó los cálculos para determinar la cantidad necesaria de cultivo a agregar a todos los cultivos para establecerlos en una  $\text{OD}_{600}$  inicial de 0.1.

Se inoculó en un matraz con 50 mL de medio fresco, el cual se dejó incubar a 37 °C y 150 rpm. Se dejó alcanzar una  $\text{OD}_{600}$  de 0.6 y se indujo con IPTG a una concentración de 0.5 mM. Los cultivos inducidos se dejaron en una incubadora estacionaria a 37 °C y 150 rpm durante 20 h.

Este procedimiento se usó para cada uno de los diferentes medios que se requirió usar durante el proyecto. Todas las producciones se corren por triplicado.

#### 4.4 Metodología de ensayos de actividad enzimática

Para el ensayo de actividad enzimática se tomó 1 mL del cultivo de la producción de celulasas en un tubo de 1.5 mL. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga Marca Thermo Scientific. Una vez centrifugado el cultivo, se tomaron 100 µL del sobrenadante, considerado como suspensión de proteínas, y se pasaron a un nuevo tubo de 1.5 mL. Se le adicionaron 900 µL de Buffer Britton-Robinson (CH<sub>3</sub>COOH 0.04 M, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.04 M, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.04 M, NaOH 0.2 M) con CMC sódica 1% y se agitaron por medio de un vortex para lograr una mezcla homogénea.

Se dejaron las muestras en incubación durante 30 min a 37 °C a 900 rpm en un Termomixer Marca Eppendorf. Todas las muestras se corrieron por triplicado.

#### 4.5 Gel de proteínas SDS-PAGE

Para visualizar la producción de las celulasas, se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se preparó un gel de poliacrilamida de resolución al 12% y un gel concentrador al 4%.

Se cargaron las muestras, un marcador de peso Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard (Genescript) y BSA como control. Se corrió a 180 volts, durante 2 h.

Después de la electroforesis, se retiró la parte del gel concentrador y el gel de resolución restante fue sumergido en una solución teñidora (40% agua destilada, 10%

ácido acético, 50% metanol, 0.25% Azul de Coomassie R-250) y se dejó incubando durante 4 h con movimiento suave a temperatura ambiente.

Al pasar el tiempo de tinción, se retiró la solución teñidora y se lavó con agua destilada para retirar el sobrante del gel. Después, fue sumergido en una solución desteñidora (67.5% agua destilada, 7.5% ácido acético, 25% metanol) y se dejó incubar durante 4 h con movimiento suave a temperatura ambiente. La solución para desteñir se cambió cada 2 h, hasta que las bandas lograron ser visibles.

Al finalizar, se retiró la solución desteñidora y se lavó el gel con agua destilada. Se mantuvo en refrigeración a 4 °C, en agua destilada.

#### 4.6 Metodología de cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para la cuantificación de proteínas se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones de estándar BSA (500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml, 31.2 µg/ml, 15.6 µg/ml, 0 µg/ml). En una placa de 96 pocillos, se agregaron 20 mL de las muestras estándar como de las muestras a analizar. Posteriormente, se adicionaron 180 mL del reactivo Bradford a cada una de las muestras procurando una adecuada mezcla. Se dejaron templar las muestras por 5 minutos. Se realizó la medición de la absorbancia en un lector de microplacas marca Thermo Scientific Modelo Multiskan GO a una longitud de onda de 595 nm. Todas las muestras se corrieron por triplicado.

#### 4.7 Metodología de cuantificación de azúcares reductores por el método de Miller

Para la cuantificación de azúcares reductores se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones de estándar glucosa (5 mg/ml, 3 mg/ml, 1 mg/ml, 0.8 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0 mg/ml). En tubos de 1.5 mL se agregaron 25 mL de las muestras estándar como de las muestras a analizar. Posteriormente, se adicionaron 25 mL del reactivo DNS a cada una de las muestras procurando una adecuada mezcla. Después se colocaron a hervir durante 5 minutos a 100 °C en un Termomixer Marca Eppendorf. Inmediatamente pasado el tiempo, se coloraron todas las muestras en un baño de hielo para cortar la reacción y se dejaron hasta que consiguieron una temperatura ambiente. Después se agregaron 250 mL de agua destilada a cada uno de los tubos con muestra. Se tomaron los 300 mL de cada tubo y se colocaron en pocillos de una placa de 96 pocillos. Se realizó la medición de la absorbancia en un lector de microplacas marca Thermo Scientific Modelo Multiskan GO a una longitud de onda de 540 nm. Todas las muestras se corrieron por triplicado.

#### 4.8 Manejo y disposición de residuos

Los residuos generados durante la realización del proyecto de investigación fueron gestionados de acuerdo con las características de estos, siguiendo los lineamientos establecidos por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas utilizando los recipientes proporcionados por este departamento, en base a la Norma PR-CLB-SRR-000.

## CAPÍTULO 5

### 5 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Con el fin de establecer los nutrientes necesarios para el proceso de producción de las celulasas y, al mismo tiempo, lograr una expresión extracelular, se analizó su producción en distintos medios de cultivo para ver su efecto. Se realizó el seguimiento de la cantidad de proteínas en el medio y la cantidad de azúcares reductores como medida indirecta de la actividad enzimática.

Se utilizó la cepa BL21 sin modificación como cepa control en los distintos experimentos. Cada uno de los experimentos de producción de celulasas se realizó con base a lo planteado en la **sección 4.3** con pequeñas variaciones necesarias en cada experimento que se mencionan en cada uno de ellos.

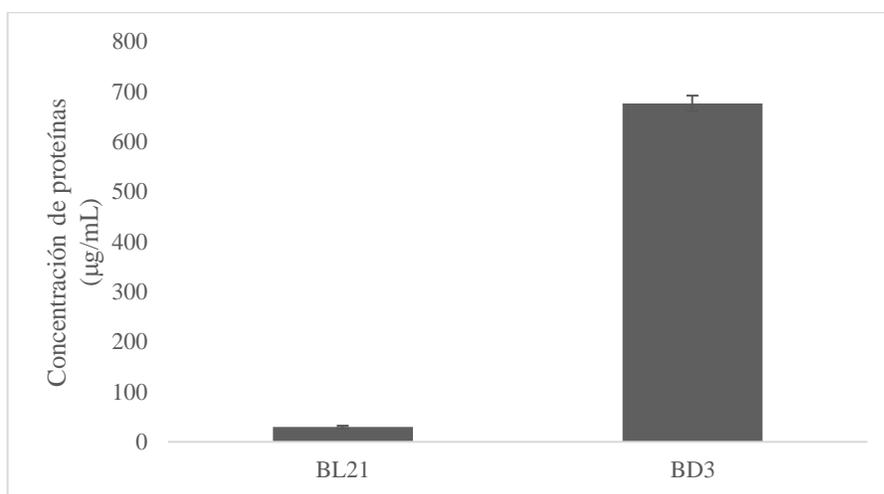
#### 5.1 Producción de celulasas en medio Terrific (TB)

Se realizó la producción de celulasas en medio TB como primer paso para establecer el proceso de producción y como replica a los resultados reportados por el grupo de investigación de esta cepa.

Como se puede ver en la **figura 4**, se obtuvo una cantidad de proteínas extracelular de 676.0 µg/mL en la cepa BD3 mostrando una diferencia significativa contra la cepa

control mientras que en la **figura 5** podemos ver el análisis de la actividad enzimática en cada uno de los sobrenadantes de las cepas, obteniendo un resultado para la cepa BD3 de 1.15 UI/mL mostrando de igual manera una diferencia significativa a la cepa control.

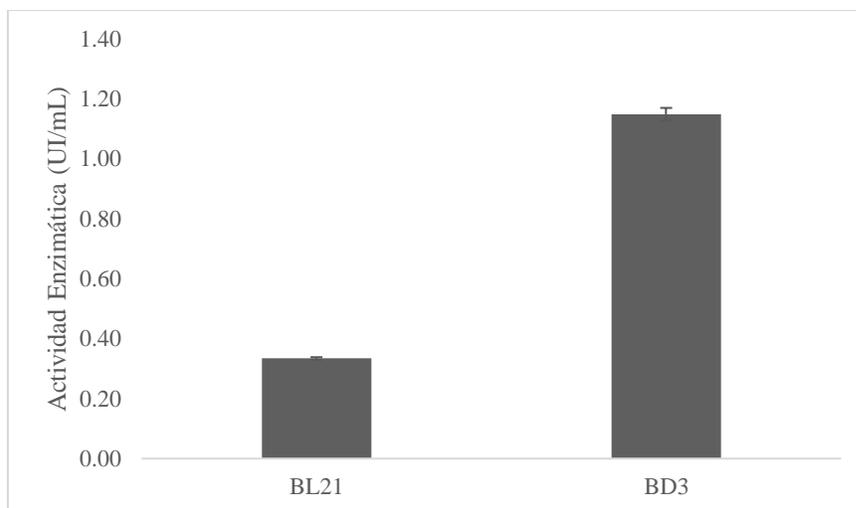
En base a los dos resultados se puede decir que tenemos una expresión extracelular de proteínas que muestran actividad celulósica, por lo que podemos indicar que la mayor parte de estas proteínas son las celulasas que se deseaban producir.



**Figura 4.** Cuantificación de proteínas extracelulares. BL21 cepa wild type, BD3 cepa productora de celulasas.

Estos resultados obtenidos son los esperados con respecto a lo reportado por Lerma-Escalera[46] en experimentos anteriores dentro del grupo de investigación.

Ellos reportan la expresión extracelular de las celulasas usando la cepa de BL21(DE3) y medio TB como medio de cultivo, realizado a nivel matraz con un volumen de 50 mL y a nivel reactor con un volumen de 2.5 L.



**Figura 5.** Actividad enzimática. BL21 cepa wild type, BD3 cepa productora de celulasas.

## 5.2 Producción de celulasas en medio mínimo (M9)

Con los resultados de la producción de celulasas en un medio con muchos nutrientes como el TB y con el fin de controlar principalmente la cantidad de azúcares en el medio de cultivo se realizó la producción en medio M9 para tener un control en los nutrientes durante todo el proceso de producción.

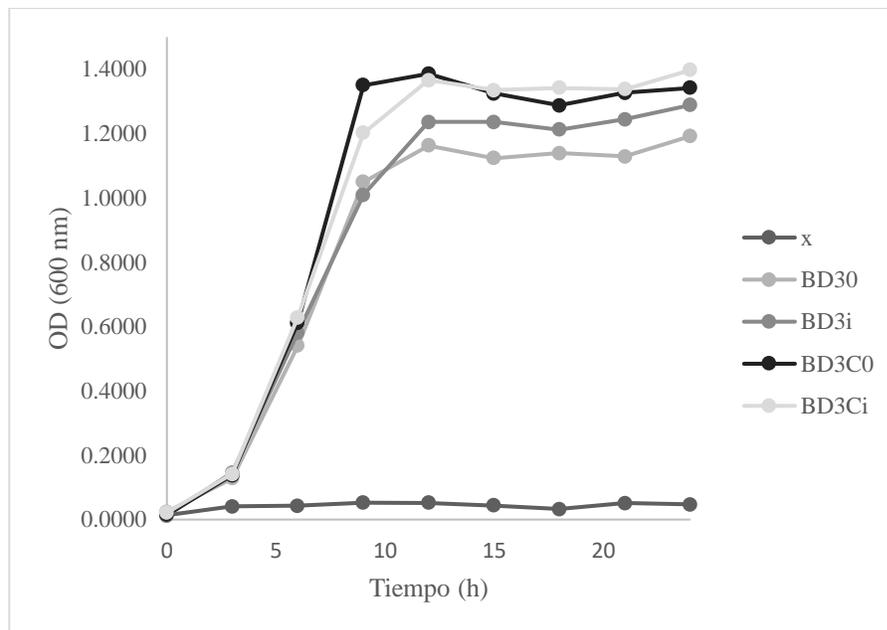
El punto de controlar los nutrientes en el medio se basaba en la idea de garantizar el aprovechamiento de una fuente de carbono externa como lo pudieran ser los residuos lignocelulosos.

Durante este experimento se siguieron las variables de crecimiento, cantidad de proteínas y cantidad de azúcares reductores durante toda la producción, realizando análisis cada 3 horas. La **tabla 2** muestra la nomenclatura de cada muestra y su especificación.

El crecimiento de la cepa BD3 no se vio afectado en medio M9, como se puede apreciar en la **figura 6**. La presencia del inductor IPTG y de la CMC-sódica no afectaron el crecimiento de la cepa significativamente.

**Tabla 2.** Nomenclatura y especificaciones de las muestras. Producción en medio M9.

Muestra	Especificación
X	Medio sin fuente de carbono
BD30	Medio con glucosa (sin IPTG)
BD3i	Medio con glucosa (IPTG)
BD3C0	Medio con glucosa y CMC-sódica (sin IPTG)
BD3Ci	Medio con glucosa y CMC-sódica (IPTG)



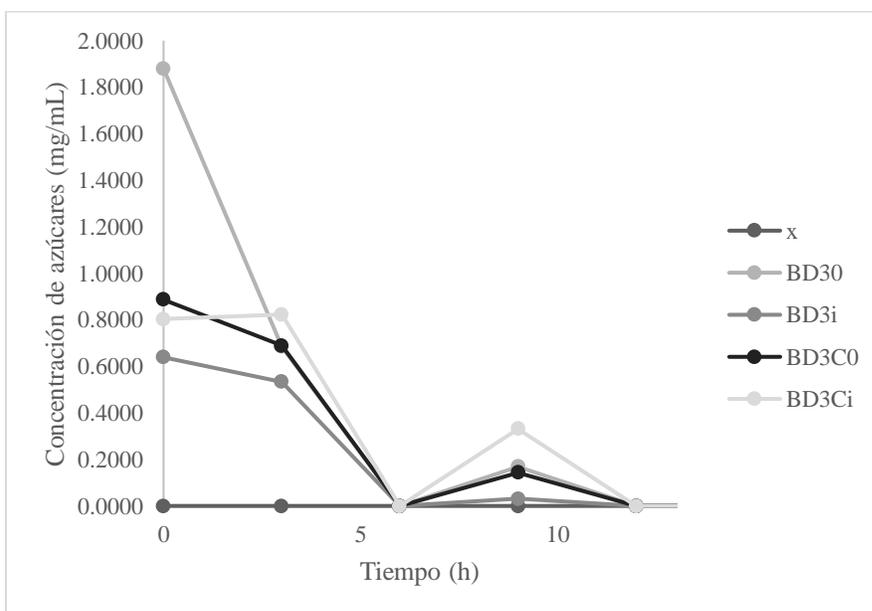
**Figura 6.** Curva de crecimiento de la cepa BD3 durante producción en medio M9.

La fuente de carbono en medio M9 es glucosa, un azúcar reductor, que es el principal regulador del crecimiento en este medio. En este punto, logramos observar que el consumo de azúcares en las muestras se comporta de manera inversa al crecimiento, como se puede apreciar en la **figura 7**. Esto es un comportamiento esperado durante el crecimiento de cualquier microorganismo.

Como reactivo adicional, se agregó CMC-sódica en algunas de las muestras para poder analizar la actividad presente de las celulasas producidas y si era posible lograr su degradación en ese medio. Este efecto esperado no sucedió, ya que no se logró ver un cambio significativo en el crecimiento de la cepa con CMC-sódica lo que hubiera indicado su aprovechamiento como fuente de carbono y, por ende, la presencia de celulasas activas.

En cuestión de la producción de celulasas, es importante recalcar que esta se inicia al momento de agregar el inductor IPTG al medio de cultivo, por lo que se esperaba que la cantidad de las celulasas fuese aumentando con respecto al tiempo hasta llegar a un máximo en su producción. Sin embargo, como se puede apreciar en la **figura 8**, no se tiene presencia de proteínas en el sobrenadante del medio M9.

Lo que se esperaba era que, una vez inducido el medio de cultivo, conforme fuera aumentando el crecimiento aumentaría de igual manera la cantidad de celulasas en el medio, aunque no se esperaba que fuera de igual magnitud como en un medio rico como el TB.

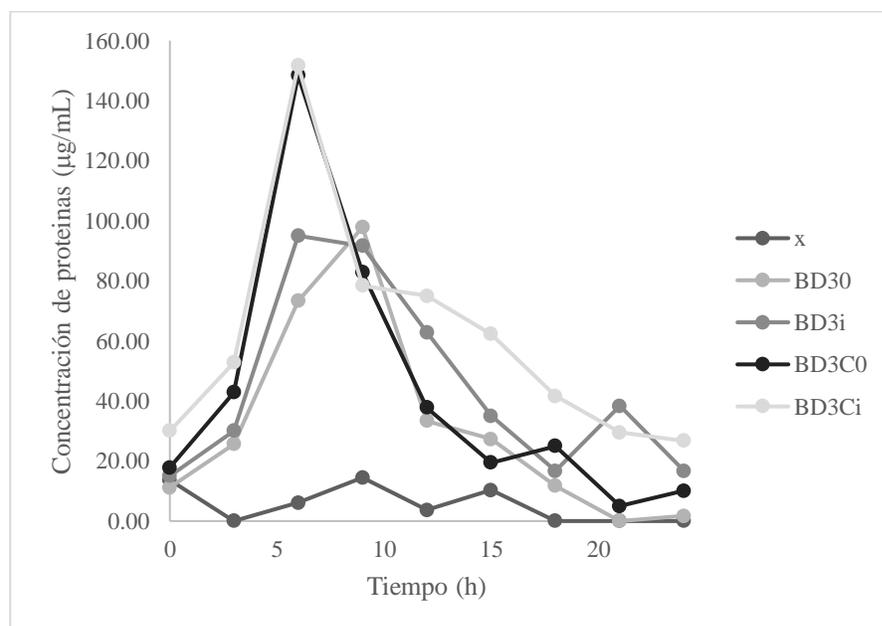


**Figura 7.** Curva de cuantificación de azúcares reductores durante producción en medio M9.

Estos resultados indicaron que el medio M9 permitía controlar los nutrientes para la cepa BD3 pero que estos nutrientes no eran necesarios para desencadenar la producción de proteínas. Lo anterior puede ocurrir debido a que los pocos nutrientes presentes en el medio son usados por la cepa para crecer y sobrevivir, dejando de lado otras rutas metabólicas que no son indispensables como lo sería la producción de las celulasas.

Esto llevo a que la falta de nutrientes en el medio M9 con la cepa BD3 afectaba considerablemente la producción de proteínas, hasta el punto de no llegar a producir.

Una opción con este medio era el buscar la producción de celulasas modificando los nutrientes poco a poco hasta un punto donde fuese considerable la producción y después realizar una optimización para lograr la mejor producción de celulasas; sin embargo, por cuestiones de tiempo esta opción era complicada de llevarse acabo durante este proyecto.



**Figura 8.** Curva de cuantificación de proteínas extracelulares de la cepa BD3 durante producción en medio M9.

### 5.3 Producción de celulasas en medio Luria-Bertani (LB)

Pensando en un aumento de los nutrientes para lograr una buena producción, se optó por el uso del medio LB como medio de cultivo para la producción. Este medio de cultivo es el de mayor uso cuando se habla de producción de proteínas recombinantes en *E. coli* y se ha usado como medio de cultivo en la degradación de residuos.

De igual manera que en el medio M9, en este experimento se adicionó CMC-sódica como fuente de carbono suplementaria como detección de celulasas activas en el medio. En la **tabla 3** se muestra la nomenclatura de cada muestra.

**Tabla 3.** Nomenclatura y especificaciones de las muestras. Producción en medio M9.

<b>Muestra</b>	<b>Especificación</b>
Control	Medio sin BD3
BD30	Medio con BD3 (sin IPTG)
BD3i	Medio con BD3 (IPTG)

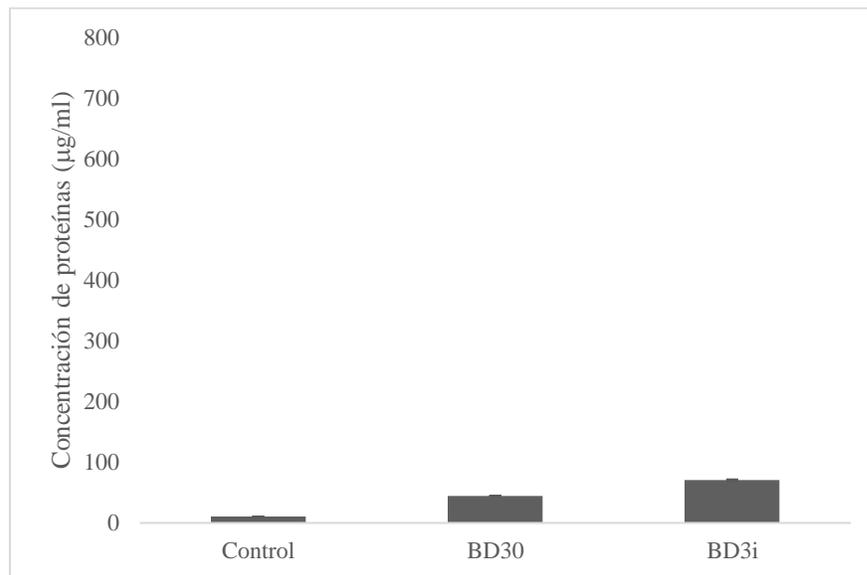
La **figura 9** muestra la cantidad de proteína detectada de manera extracelular en la producción hecha en este medio. La diferencia no es muy significativa por lo que se podría decir que la producción de celulasas no se obtuvo usando este medio de cultivo.

De igual manera en la **figura 10**, no se detecta una diferencia significativa en la actividad enzimática lo que sustenta la no producción de las celulasas.

En ambas metodologías no se logra apreciar una diferencia estadísticamente significativa como para poder declarar una producción de celulasas.

A diferencia con el medio M9, el medio LB es el medio más comúnmente usado en la expresión de proteínas recombinantes ya que cuenta con los nutrientes necesarios

para llevar un crecimiento del microorganismo y realizar otras funciones metabólicas con normalidad. Sin embargo, este experimento no es concluyente en el sentido de si la falta de nutrientes era un problema en el medio M9; o si, además de la falta de nutrientes, existe otra variable o condición que este afectando la producción de las celulasas en estos dos medios.

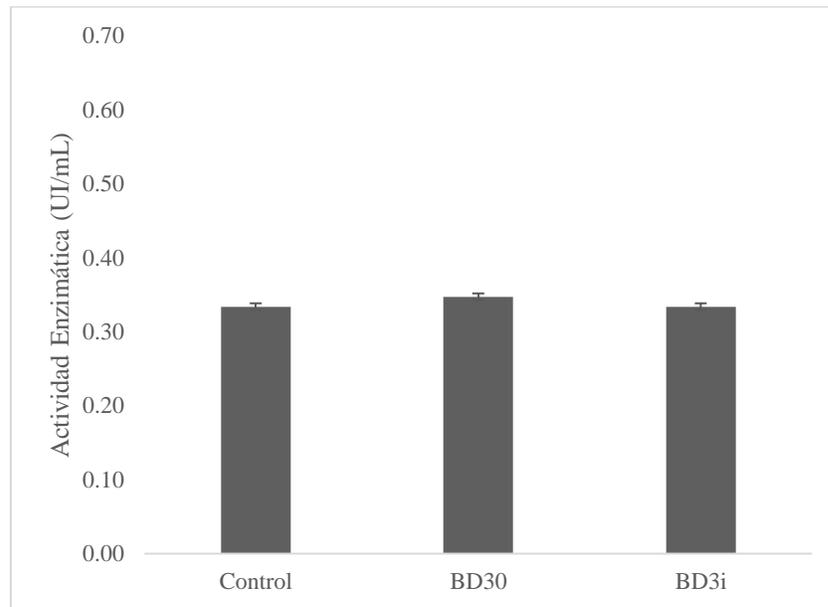


**Figura 9.** Cuantificación de proteínas extracelulares de la cepa BD3 en medio LB.

En base a toda la información recopilada, es ampliamente conocido que uno de los principales problemas al trabajar con *E. coli* es su incapacidad de exportar proteínas al medio de cultivo debido a varias características fisiológicas por lo que se han estado investigando maneras de poder favorecer la expresión extracelular de proteínas. Esta podría ser el inconveniente que estaría pasando en la producción de las celulasas.

Sin embargo, es importante resaltar que en las etapas iniciales de la experimentación se logro obtener la producción de celulasas usando el medio TB, por lo

que el problema de la secreción de las celulasas podría estar dado por algunas condiciones físicas mismas de los diferentes medios como lo podrían ser la diferencia en la cantidad de nutrientes o de la presencia de ciertos compuestos particulares de cada uno de ellos que favorezcan la secreción de las celulasas.



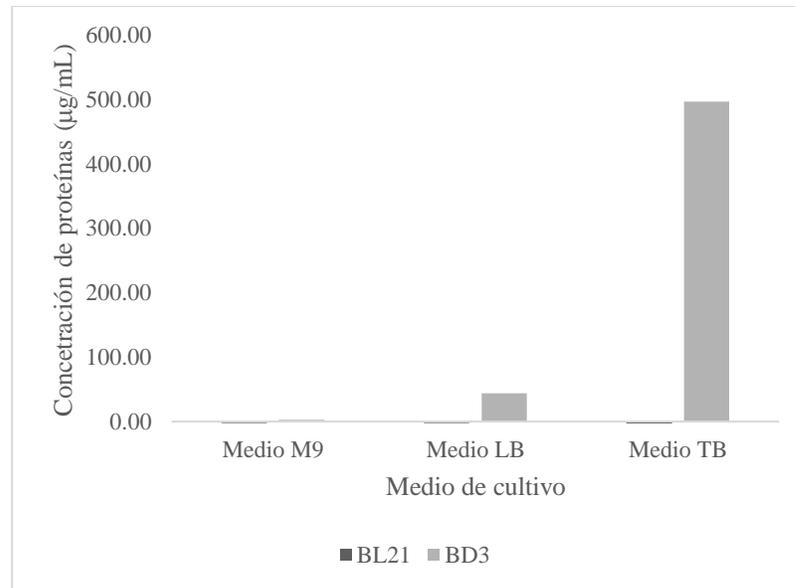
**Figura 10.** Actividad enzimática de la cepa BD3 en medio LB.

#### 5.4 Producción de celulasas. Variación del medio cultivo.

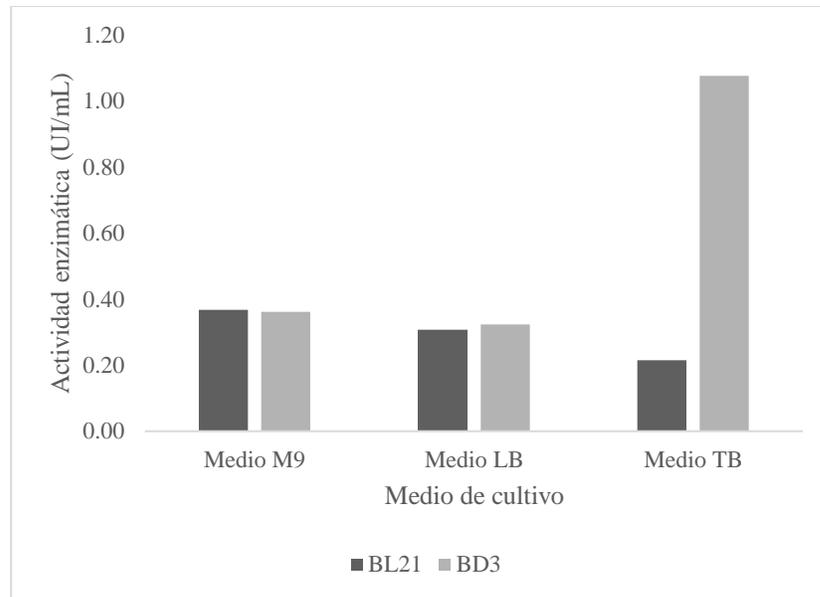
Para identificar de manera clara las diferencias en la producción de celulasas con la cepa BD3 en los distintos medios de cultivo, se realizó la producción de celulasas variando el medio de cultivo con el fin de detectar la diferencia entre cada uno de ellos.

Como se puede observar en la **figura 11**, la cantidad de proteínas en el medio de cultivo es mucho mayor en el medio TB que en los otros dos medios y, de igual manera, en la **figura 12**, se comprueba la actividad de las celulasas solo en medio TB.

Con los resultados obtenidos en este experimento se puede decir claramente que la producción de celulasas se puede dar en el medio TB mientras que en los medios M9 y LB no se logra apreciar una diferencia significativa en ambas mediciones que nos puedan indicar que si se logra una producción de las celulasas en esos dos medios.



**Figura 11.** Cuantificación de proteínas extracelulares de la cepa BD3 en distintos medios.



**Figura 12.** Actividad enzimática de la cepa BD3 en distintos medios.

En base a los resultados y a la experimentación, la producción de las celulasas en la cepa BD3 se ve afectada por los nutrientes en los medios de cultivo ya que las condiciones de experimentación fueron las mismas.

Se sabe que el medio M9, es un medio sencillo y con carencia de nutrientes debido a que su fin es controlar la cantidad de nutrientes disponibles para la cepa, por lo que es entendible que la producción de celulasas se vea afectada por la falta de nutrientes, aunque no se esperaría que fuera bloqueada totalmente.

Sin embargo, los medios LB y TB son medios ricos que presentan mucha similitud entre ambos, aunque si presentan modificaciones en sus compuestos. En las **tablas 4 y 5** se pueden visualizar los componentes de cada uno de ellos y la concentración.

**Tabla 4.** Composición del medio TB

<b>Medio TB</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>

Extracto de Levadura	24 g/L
Triptona	20 g/L
Glicerol	4 mL/L
Buffer de fofatos	0.017 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0.072 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

**Tabla 5.** Composición del medio LB

<b>Medio LB</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
Extracto de levadura	5 g/L
Triptona	10 g/L
NaCl	10 g/L

Algunos investigadores reportan haber tenido problemas con la expresión de algunas proteínas en *E. coli* usando el medio LB dando la razón a la solubilidad de la proteína expresada por la cual no logra plegarse de manera correcta debido a los nutrientes del medio. Sin embargo, no hay una razón lo suficientemente correcta como para justificar el hecho, aunque si se ha llegado a reportar la diferencia.

Una posible explicación podría estar en el pH. Mientras que el medio LB usa NaCl como fuente de sales, el medio TB usa como fuente de sales un buffer de fosfatos mismo que podría estar ayudando a controlar el pH y evitando así la inhibición de la cepa debido a un cambio en su pH de crecimiento óptimo.

Otra explicación podría ser la presencia del glicerol en el medio TB. En el área de biomateriales, este compuesto ha sido estudiado como una opción de biopolímero, así como su la mezcla con otros compuestos para forma polímeros biodegradables. Por esto mismo se han estudiado sus propiedades y se ha encontrado la facilidad que este compuesto tiene para crear una cierta plastificación en películas con base en polisacáridos

otorgando una permeabilidad dentro de estas películas.[47,48] Es efecto podría dar una explicación a la expresión extracelular de las celulasas en el medio TB, ya que la pared celular de la cepa es un compuesto prácticamente hecho de polisacáridos y la presencia del glicerol podría estar provocando una permeabilidad de la pared que ayude en la salida de las celulasas hacia el exterior.

Lo que si se sabe es que el medio TB es un medio con mucho mas nutrientes que el LB, que se puede apreciar en las **Tablas 4 y 5**, lo que ha reportado como un beneficio a la hora de expresar proteínas.

### 5.5 Gel SDS-PAGE.

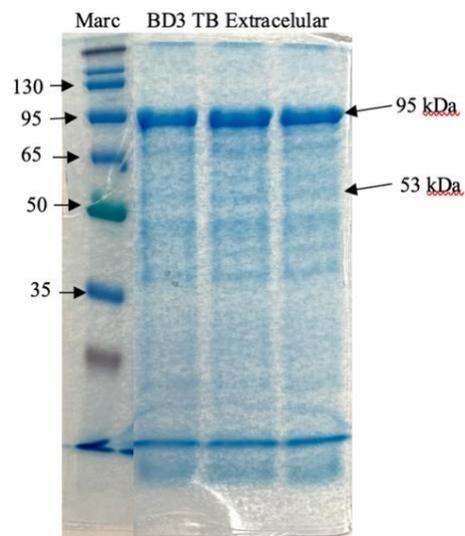
Para visualizar la producción de nuestras celulasas, se realizó un gel SDS-PAGE con las muestras del experimento de variación del medio de cultivo.

En la **figura 13** se muestra el gel de acrilamida 12% con las muestras de medio de cultivo en TB, donde se pueden observar claramente en los 3 carriles de muestra una banda de aproximadamente 95 kDa que corresponde a una de las celulasas expresada; mientras que, a la altura de 50 kDa se puede apreciar pequeñas manchas muy tenues por encima de la banda de 50 kDa las que corresponderían a la otra de las celulasas producidas.

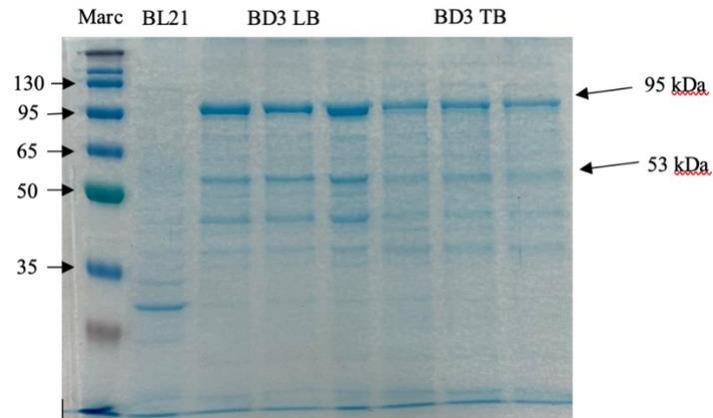
En la **figura 14** se muestra el gel de acrilamida 12% con las muestras de la parte interna de la cepa, donde se puede observar de mejor manera las bandas de ambas celulasas. En el carril 1, es la cepa BL21 sin modificación por lo que las otras bandas que se ven en la cepa BL21 modificada, son las celulasas recombinantes. En los carriles de medio LB, se pueden apreciar de mejor manera ambas bandas; mientras que en las muestras de medio TB se pueden apreciar estas mismas bandas, pero menos marcadas.

Este experimento se puede ver como la expresión de las celulasas en el medio LB se lleva a cabo por parte de la cepa, pero no logrando ser exportadas al exterior por lo que quedan atrapadas dentro de esta; mientras que en el medio TB podemos visualizar las bandas tanto en el interior de la cepa como en el sobrenadante del medio de cultivo indicando la salida de las celulasas de la cepa.

Lo anterior puede ser explicado por la presencia del glicerol en el medio TB, como se analizaba en la **sección 5.4** de esta investigación.



**Figura 13.** Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE al 12% de las celulasas recombinantes de la cepa BD3. Marc: marcador de peso. Muestras de sobrenadante (medio de cultivo) de la producción de celulasas con variación de medio de cultivo.



**Figura 14.** Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE al 12% de las celulasas recombinantes de la cepa BD3. Marc: marcador de peso. Carril 1: BL21 cepa sin modificación. Carriles 2-4: Muestras periplasmáticas de BD3 en medio LB. Carriles 5-7: Muestras periplasmáticas de BD3 en medio TB. Estas muestras fueron tomadas del experimento de la producción de celulasas con variación de medio de cultivo.

Es importante mencionar que los diversos experimentos en esta investigación fueron realizados con el propósito de utilizar la cepa en la degradación de residuos lignocelulosos, de allí parte la lógica de los experimentos, así como la falta de datos en algunos de ellos, ya que debido al alcance de este proyecto no se logró expandir la investigación hacia esos ciertos puntos.

A pesar de ello, con los datos obtenidos se puede observar un efecto importante por parte del medio de cultivo en la producción de proteínas recombinantes usando *Escherichia coli* como microorganismo lo que indica que la selección del medio de cultivo afecta considerablemente a estos procesos.

## CAPÍTULO 6

### 6 CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- Se encontró que la producción de celulasas de manera extracelular en una cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) se ve afectada de manera significativa por el medio de cultivo.
- El medio de cultivo afecta la expresión extracelular de las celulasas y no la síntesis de estas como se tenía pensado.
- La presencia de ciertos compuestos como el glicerol ayudan a la síntesis de proteínas como a la expresión extracelular de estas, presentando un efecto dual como fuente de carbono y como un compuesto de apoyo en la expulsión de las celulasas al medio.
- El medio de cultivo es un factor importante por analizar para lograr la expresión extracelular de distintas proteínas recombinantes en *Escherichia coli*.

## CAPÍTULO 7

### 7 REFERENCIAS

- [1] D. Klemm, B. Heublein, H. Fink, A. Bohn, *Polymer Science Cellulose : Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material Angewandte*, (2005) 3358–3393. doi:10.1002/anie.200460587.
- [2] I. Gutiérrez-Rojas, N. Moreno-Sarmiento, D. Montoya, *Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos*, *Rev. Iberoam. Micol.* 32 (2014) 1–12. doi:10.1016/j.riam.2013.10.009.
- [3] S. Mussatto, J. Teixeira, *Lignocellulose as raw material in fermentation processes*, *Commun. Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 2 (2010) 897–907. doi:10.1016/j.jrras.2014.02.003.
- [4] C. Brigham, *Biopolymers : Biodegradable Alternatives to Traditional Plastics*, Elsevier Inc., 2018. doi:10.1016/B978-0-12-809270-5.00027-3.
- [5] S. Li, L. Bashline, L. Lei, *Cellulose Synthesis and its Regulation*, *Arab. B.* 2014 (2014) 1–21. doi:10.1199/tab.0169.
- [6] World Bioenergy Association, *GLOBAL BIOMASS POTENTIAL TOWARDS 2035*, (2016) 6. <https://worldbioenergy.org/news/112/47/New-WBA-Factsheet-Global-biomass-potential-towards-2035>.

- [7] R. Jayasekara, Sandhya, Ratnayake, Microbial Cellulases : An Overview and Applications, IntechOpen. (2019) 21.  
doi:<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84531>.
- [8] R.K. Sukumaran, R.R. Singhanian, A. Pandey, Microbial cellulases - Production, applications and challenges, J. Sci. Ind. Res. (India). 64 (2005) 832–844.
- [9] A.C. Crawford, J.A. Krickler, A.J. Anderson, N.R. Richardson, P.B. Mather, Structure and function of a cellulase gene in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, 340 (2004) 267–274. doi:10.1016/j.gene.2004.06.060.
- [10] Á.J. Arteaga Garcés, Producción Y Caracterización De Enzimas Celulolíticas Obtenidas De Microorganismos Aislados De Materia Vegetal, 2013.
- [11] X. Zhou Zhang, Y. Heng Percival Zhang, Cellulases: Characteristics, sources, production and applications, in: Bioprocessin Technol. Biorefinery Sustain. Prod. Fuels, Chem. Polym., 2013.
- [12] P.A. Dalby, Engineering Enzymes for Biocatalysis, Recent Pat. Biotechnol. 1 (2007) 1–9. doi:<https://doi.org/10.2174/187220807779813929>.
- [13] B. Yang, Z. Dai, S. Ding, C.E. Wyman, Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass, 2 (2011) 421–449.
- [14] V. Juturu, J.C. Wu, Microbial cellulases: Engineering, production and applications, Renew. Sustain. Energy Rev. 33 (2014) 188–203.  
doi:10.1016/j.rser.2014.01.077.
- [15] S. Mohapatra, Sonali; Ray C., Ramesh; Ramachandran, Chapter 1 - Bioethanol From Biorenewable Feedstocks: Technology, Economics, and Challenges, Elsevier Inc., 2019. doi:10.1016/B978-0-12-813766-6/00001-1.
- [16] B. De, A. Khalid, M. Tayyab, A.S. Hashmi, T. Yaqub, A.R. Shakoori,

Optimization of Conditions for Maximal Production of Recombinant

Thermostable Cellulase from *Thermotoga naphthophila*, 51 (2019) 1371–1377.

- [17] D. M., S. H., Q. W., Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives, *Int. J. Biol. Sci.* 5 (2009) 578. doi:10.7150/ijbs.5.578.
- [18] R.K. Sukumaran, R.R. Singhanian, G.M. Mathew, A. Pandey, Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production, *Renew. Energy.* 34 (2009) 421–424. doi:10.1016/j.renene.2008.05.008.
- [19] M. Imran, Z. Anwar, M. Irshad, A. Javid, A. Hussain, S. Ali, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Optimization of cellulase production from a novel strain of *Aspergillus tubingensis* IMMIS2 through response surface methodology, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 12 (2017) 191–198. doi:10.1016/j.bcab.2017.10.005.
- [20] V. Rana, A.D. Eckard, P. Teller, B.K. Ahring, Bioresource Technology On-site enzymes produced from *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus saccharolyticus* for hydrolysis of wet exploded corn stover and loblolly pine, *Bioresour. Technol.* 154 (2014) 282–289. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.059.
- [21] N. Srivastava, M. Srivastava, W. Ramteke, K. Mishra, for Microbial Cellulases : An Overview, Elsevier B.V., 2019. doi:10.1016/B978-0-444-63503-7.00014-0.
- [22] J.D. Keasling, Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering, *Metab. Eng.* 14 (2012) 189–195. doi:10.1016/j.ymben.2012.01.004.
- [23] N.S. Mccarty, R. Ledesma-amaro, Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology, *Trends Biotechnol.* 37 (2019) 181–197. doi:10.1016/j.tibtech.2018.11.002.

- [24] T. Soon Lee, B.A. Simmons, C.A. Voigt, G. Bokinsky, J. Dietrich, J.D. Keasling, et al., Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pretreated switchgrass using engineered *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. 108 (2011) 19949–19954. doi:10.1073/pnas.1106958108.
- [25] T.E. Goroehowski, E. Van Den Berg, R. Kerkman, J.A. Roubos, R.A.L. Bovenberg, Using Synthetic Biological Parts and Microbioreactors to Explore the Protein Expression Characteristics of *Escherichia coli*, (2013).
- [26] F.J. Ríos-Fránquez, Ó.A. Rojas-Rejón, C. Escamilla-Alvarado, Microbial Enzyme Applications in Bioethanol Producing Biorefineries : Overview, Elsevier Inc., 2019. doi:10.1016/B978-0-12-813766-6/00013-8.
- [27] G. Ferreira, A.R. Azzoni, S. Freitas, Biotechnology for Biofuels Techno - economic analysis of the industrial production of a low - cost enzyme using *E. coli* : the case of recombinant  $\beta$  - glucosidase, Biotechnol. Biofuels. (2018) 1–13. doi:10.1186/s13068-018-1077-0.
- [28] M. Garvey, H. Klose, R. Fischer, C. Lambertz, U. Commandeur, Cellulases for biomass degradation : comparing recombinant cellulase expression platforms, Trends Biotechnol. (2013) 1–13. doi:10.1016/j.tibtech.2013.06.006.
- [29] S. Atsumi, J.C. Liao, Metabolic engineering for advanced biofuels production from *Escherichia coli*, (2008) 414–419. doi:10.1016/j.copbio.2008.08.008.
- [30] D. Gao, Y. Luan, Q. Wang, Q. Liang, Q. Qi, Construction of cellulose-utilizing *Escherichia coli* based on a secretable cellulase, Microb. Cell Fact. 14 (2015) 1–8. doi:10.1186/s12934-015-0349-7.
- [31] L. Fonseca, M. Saloheimo, M. Siika-aho, C. Uchima, S. Ellilä, V. Sacon, et al., Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei*

- for Brazilian biorefineries, *Biotechnol. Biofuels.* 10 (2017) 1–17.  
doi:10.1186/s13068-017-0717-0.
- [32] M. Devi, M. Kumar, Production, optimization and partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes, *J. Microbiol. Biotechnol.* 2 (2017) 120–128.  
<https://jmbonline.com/index.php/JMBR/article/view/93>.
- [33] M. Irfan, Q. Mushtaq, F. Tabssum, H.A. Shakir, J.I. Qazi, Carboxymethyl cellulase production optimization from newly isolated thermophilic *Bacillus subtilis* K - 18 for saccharification using response surface methodology, *AMB Express.* (2017). doi:10.1186/s13568-017-0331-3.
- [34] C. Wyman, *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, 1996.
- [35] M.G. Resch, B.S. Donohoe, J.O. Baker, S.R. Decker, E.A. Bayer, G.T.B. De, et al., Environmental Science cellulose deconstruction †, (2013) 1858–1867.  
doi:10.1039/c3ee00019b.
- [36] Bhat .M, Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology (Review), *Biotechnol. Adv.* 18 (2000) 355–383. doi:10.1016/S0734-9750(00)00041-0.
- [37] R.C. Kuhad, R. Gupta, A. Singh, *Microbial Cellulases and Their Industrial Applications*, 2011 (2011). doi:10.4061/2011/280696.
- [38] N. Srivastava, M. Srivastava, P.K. Mishra, V.K. Gupta, G. Molina, Applications of fungal cellulases in biofuel production : Advances and limitations, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 82 (2018) 2379–2386. doi:10.1016/j.rser.2017.08.074.
- [39] S. Sadhu, T.K. Maiti, Cellulase Production by bacteria : A Review *Microbiology Laboratory* , Department of Botany , The University of, (n.d.) 1–23.
- [40] K. Kleiner-Grote, Gabriele R. M.; Risse, Joe M.; Friehs, Secretion of recombinant

proteins from *E. coli*, Eng. Life Sci. 18 (2018) 532–550.

doi:10.1002/elsc.201700200.

- [41] N.A. Wulff, H. Carrer, S.F. Pascholati, Expression and Purification of Cellulase Xf818 from *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*, 53 (2006) 198–203.  
doi:10.1007/s00284-005-0475-2.
- [42] A. Zafar, S. Aftab, N. Aftab, H. Mukhtar, M. Saleem, Purification and characterization of cloned endo-1, 4- $\beta$ -glucanase gene of *Bacillus licheniformis* for saccharification of plant biomass, Pakistan J. Bot. 51 (2019) 957–966.  
doi:10.30848/PJB2019.
- [43] W. Li, W.W. Zhang, M.M. Yang, Y.L. Chen, Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*, Mol. Biotechnol. 40 (2008) 195–201. doi:10.1007/s12033-008-9079-y.
- [44] S.Z. Amraini, L.P. Ariyani, H. Hermansyah, S. Setyahadi, S.F. Rahman, D. Park, Production and Characterization of Cellulase from *E. coli* EgRK2 Recombinant Based on Oil Palm Empty Fruit Bunches, 295 (2018) 287–295.  
doi:10.1007/s12257-017-0034-2.
- [45] S.F. Mohammad, Y. Feng, G.Y. Id, Optimization of cell culture and cell disruption processes to enhance the production of thermophilic cellulase FnCel5A in *E. coli* using response surface methodology, (2019).
- [46] A.I. Lerma Escalera, Optimización en el proceso de producción de ácido shikímico utilizando una cepa de *Escherichia coli* genéticamente modificada. (Pendiente por publicar), 2018.
- [47] M. Gurgel, A. Vieira, M. Altenhofen, L. Oliveira, M.M. Beppu, Natural-based

plasticizers and biopolymer films : A review, *Eur. Polym. J.* 47 (2011) 254–263.

doi:10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011.

- [48] F. Basiak, Ewelina; Lenart, Andrzej; Debeaufort, How Glycerol and Water Contents Affect the Structural and Functional Properties of Starch-Based, *Polymers (Basel)*. 10 (2018) 2–18. doi:10.3390/polym10040412.