



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DESPLIEGUE DE UNA β -GLUCOSIDASA BACTERIANA EN LA SUPERFICIE DE *Escherichia coli* ETANOLOGÉNICA UTILIZANDO EL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO Va

T E S I S

QUE PARA OBTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Iván Muñoz Gutiérrez

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Alfredo Martínez Jiménez, Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Ricardo Oropeza Navarro, Instituto de Biotecnología

Dr. Jaime Ortega López, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2013

Con amor a mi madre

*In memoriam a mi abuelo, el
primer científico que conocí*

Por la magia, princesa

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Alfredo Martínez Jiménez en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante la realización de los estudios de Doctorado se contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 226751.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de los proyectos: CONACyT-PROINNOVA 2010/138079 - 2011/154298 - 2012/184417 y DGAPA/PAPPIT/UNAM IT 200312.

AGRADECIMIENTOS

A mi mentor el Dr. Alfredo Martínez Jiménez (IBt-UNAM)

A mi comité tutorial:

Dr. Jaime Ortega López (Cinvestav)

Dr. Ricardo Oropeza Navarro (IBt-UNAM)

A los miembros del jurado:

Dr. Edmundo Calva Mercado (IBt-UNAM)

Dra. Katy Juárez López (IBt-UNAM)

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos (CCG-UNAM)

Dra. Teresa Ponce Noyola (Cinvestav)

Dr. Joel Osuna Quintero (IBt-UNAM)

Al personal académico del laboratorio 4 del IBt-UNAM:

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Q. I. Luz María Martínez Mejía

M. C. Georgina Hernández Chávez

C. D. Mercedes Enzaldo Cruz

A la unidad de biblioteca del IBt-UNAM:

B.A. Dip.Lib. A.L.A. Shirley Ainsworth

Sr. Omar Arriaga

A la unidad de síntesis y secuenciación del IBt-UNAM:

Dr. Rubén Paul Gaytan Colín

M. C. Jorge Arturo Yáñez Ponce de León

Q. I. Santiago Becerra Ramírez

M. C. Eugenio López Bustos

Al Dr. Thomas F. Meyer del Instituto Max Planck, Berlín, Alemania, por la donación del plásmido pJM7.

Al Dr. David B. Wilson de la Universidad de Cornell, EUA, por la donación del plásmido pNS6.

Al Dr. José Luis Puente García del IBt-UNAM por la donación de ADN de *Escherichia coli* EHEC O157:H7.

A mi mamá la Sra. Esperanza Gutiérrez Zamudio.

Se agradece a todas las personas que brindaron ideas, apoyo técnico y/o reactivos:

Dr. Adelfo Escalante Lozada
M. C. Adriana Garibay Hernández
Dr. Alejandra Vargas Tah
M. C. Andrea Sabido Ramos
L. Antonio Bolaños Guillén
Sra. Aurelia González Guzmán
M. C. Berenice Trujillo Martínez
Dra. Clarita Olvera Carranza
M. C. Cesar Aguilar Martínez
Ing. Cessna Moss Acosta
Sra. Delia Caro Cárdenas
M. C. Estefanía Sierra Ibarra

Sra. Gloria Villa Herrera
Ing. Jalil Saab Hassanille
Dr. José Utrilla Carreri
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Marco Tulio Fernández Sandoval
M. C. María Elena Rodríguez Alegría
Biol. Mario Caro Bermudez
M.C. Martín Patiño Vera
Dra. Noemí Flores Mejía
M. C. Ramón de Anda Herrera
M. C. Sara Centeno Leija
Sra. Silvia Velázquez

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Etanol carburante a partir de lignocelulosa, una alternativa renovable y amigable con el medio ambiente	1
Hacia el Bioproceso Consolidado	5
Despliegue de Enzimas Sacarolíticas en la Superficie Celular	7
Despliegue de Proteínas Utilizando el Sistema de Proteínas Autotransportadoras.....	8
Alcance de la Tesis.....	10
CAPÍTULO 2. DESPLIEGUE DE LA β -glucosidasa BglC DE <i>T. fusca</i> EN LA SUPERFICIE DE LA CEPA ETANOLOGÉNICA <i>E. coli</i> MS04 UTILIZANDO EL SISTEMA AIDA-I	11
Introducción.....	11
Objetivo General.....	12
Objetivos Particulares.....	12
Primera Sección.....	13
Efecto del Etanol y Acetato Sobre la Actividad de BglC Soluble.....	13
Materiales y Métodos	13
Resultados y Discusión.....	15
Segunda Sección.....	16
Construcción del sistema de secreción AIDA-BglC	16
Demostración de que el sistema AIDA-I ancla en la superficie celular a BglC.....	17
Fermentación de celobiosa con <i>E. coli</i> MS04 expresando el sistema AIDA-BglC	19
Co-fermentación de celobiosa y glucosa con <i>E. coli</i> MS04 expresando el sistema AIDA-BglC	22
Estudio de la carga metabólica por plásmido	23
Medición de la actividad de BglC anclada en la superficie de MS04	24
Efecto del etanol sobre la estabilidad de BglC anclada en la superficie de MS04.....	25
Conclusión	26
CAPÍTULO 3. DESPLIEGUE DE LA β -glucosidasa BglC DE <i>T. fusca</i> EN LA SUPERFICIE DE LA CEPA ETANOLOGÉNICA <i>E. coli</i> MS04 UTILIZANDO EL SISTEMA Ag43	28
Introducción.....	28
Objetivo General.....	29
Objetivos Particulares.....	29
Materiales y Métodos	29
Biología Molecular	29
Construcción del sistema de secreción Ag43-BglC	30
Tratamiento con tripsina de células completas y purificación de PME	32
Condiciones de cultivo	32
Análisis	33

Resultados y Discusión.....	34
Construcción del sistema de secreción Ag43-BglC	34
Demostración de que el sistema Ag43 ancla en la superficie celular a BglC	34
Fermentación de celobiosa con <i>E. coli</i> MS04 expresando el sistema Ag43-BglC.....	35
Conclusión	36
CAPÍTULO 4. SECRECIÓN DE LA β -glucosidasa DE <i>T. fusca</i> AL MEDIO EXTERIOR DE LA CEPA ETANOLOGÉNICA <i>E. coli</i> MS04 UTILIZANDO EL SISTEMA EspP ...	37
Introducción.....	37
Objetivo General.....	37
Objetivos Particulares.....	37
Materiales y Métodos	38
Biología Molecular.....	38
Condiciones de cultivo	40
Resultados y Discusión.....	40
Construcción del sistema de secreción EspP-BglC	40
Cultivo en celobiosaa de <i>E. coli</i> MS04 expresando el sistema EspP-BglC	41
Conclusión	41
CAPÍTULO 5. COMENTARIOS GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	42
Perspectivas	43
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXO 1. Presentación del manuscrito: "Cell surface display of a β -glucosidase employing the type V secretion system on ethanologenic <i>Escherichia coli</i> for the fermentation of cellobiose to ethanol	57
ANEXO 2. Presentación del manuscrito de revisión: "Polysaccharide Hydrolysis with Engineered <i>Escherichia coli</i> for the Production of Biocommodities"	70
ANEXO 3. Presentación del manuscrito de divulgación: EL ALCOHOL COMO BIOCOMBUSTIBLE. EL EJEMPLO BRASILEÑO	96
ANEXO 4. Resumen de la participación en el: "34 th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals"	102
ANEXO 5. Resumen de la participación en el: XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Composición de la lignocelulosa.....	2
Figura 1.2	Estructura de la lignocelulosa.....	2
Figura 1.3	Hidrólisis enzimática de celulosa.....	4
Figura 1.4	Vías fermentativas de <i>E. coli</i> MG1655 y <i>E. coli</i> MS04.....	5
Figura 1.5	Bioproceso consolidado.....	6
Figura 1.6	Ejemplos del despliegue de proteínas en la superficie celular.....	8
Figura 1.7	Secreción de proteínas autotransportadoras.....	10
Figura 2.1	Efecto de etanol y acetato sobre la actividad de BglC soluble.....	15
Figura 2.2	Estructura del sistema AIDA-BglC.....	17
Figura 2.3	Análisis del tratamiento con tripsina de <i>E. coli</i> MS04 transformada con pAIDABglCRHis.....	18
Figura 2.4A	Cinéticas de fermentación de celobiosa con MS04/pAIDABglC y MS04/pAIDABglCRHis.....	20
Figura 2.4B	Cinética de fermentación de una mezcla celobiosa y glucosa con MS04/pAIDABglCRHis.....	20
Figura 2.5	Cinética de fermentación de glucosa con MS04 transformada con el plásmido pTrc99A2, pAIDABglCRHis o sin plásmido.....	23
Figura 2.6	Efecto del etanol a diferentes concentraciones sobre la actividad y estabilidad de BglC anclada en la membrana externa de MS04/pAIDABglCRHis.....	26
Figura 3.1	Esquema de la construcción del plásmido pAg43pol.....	31
Figura 3.2	Esquema de la construcción del plásmido pAg43BglC.....	31
Figura 3.3	Análisis del tratamiento con tripsina de <i>E. coli</i> MS04 transformada con pAg43BglC.....	35
Figura 3.4	Cinética de fermentación con celobiosa de <i>E. coli</i> MS04 transformada con pAg43BglC.....	35
Figura 4.1	Esquema de la construcción del plásmido pEspPpol.....	39
Figura 4.2	Esquema de la construcción del plásmido pEspPBglC.....	40
Figura 4.3	Cinética de fermentación con celobiosa de <i>E. coli</i> MS04 transformada con pEspPBglC.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Despliegue de enzimas sacarolíticas en la superficie de <i>E. coli</i> y sus aplicaciones.....	7
Tabla 2.1	Despliegue de proteínas heterólogas y homólogas en la superficie de <i>E. coli</i> utilizando el sistema AIDA-I.....	12
Tabla 2.2	Parámetros cinéticos y de crecimiento de <i>E. coli</i> MS04 y derivados.....	20
Tabla 2.3	Actividad de BglC anclada durante el crecimiento celular en condiciones de fermentación.....	25
Tabla 3.1	Lista de oligonucleótidos empleados en el Capítulo 3.....	30
Tabla 3.2	Parámetros cinéticos y de crecimiento de <i>E. coli</i> MS04/pAg43BglC en fermentación de celobiosa.....	36
Tabla 4.1	Lista de oligonucleótidos empleados en el Capítulo 4.....	39

ABREVIATURAS

AIDA-I	" <u>A</u> dhesin <u>i</u> nvolved in <u>d</u> iffuse <u>a</u> dherence"
Ag43	" <u>A</u> ntigen <u>43</u> "
BglC	β -glucosidasa de <i>Thermobifida fusca</i>
BPC	<u>B</u> ioproceso <u>c</u> onsolidado
DO	<u>D</u> ensidad <u>o</u> ptica
EHEC	" <u>E</u> ntero <u>h</u> emorrhagic <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli"
EspP	" <u>E</u> xtracellular <u>s</u> erine <u>p</u> rotease, <u>p</u> lasmid-encoded"
INP	" <u>I</u> ce <u>n</u> ucleation <u>p</u> rotein"
IPTG	<u>I</u> sopropil- β -D-1- <u>t</u> iogalactopiranosido
IVM	<u>I</u> ngeniería de <u>v</u> ías <u>m</u> etabólicas
LB	"Luria Broth"
PBS	" <u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline"
PCR	" <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction"
PM	<u>P</u> eso <u>m</u> olecular
PME	<u>P</u> roteínas de <u>m</u> embrana <u>e</u> xterna
pNPG	" <u>p</u> - <u>N</u> itrophenyl β -D-glucopyranoside"
PS	<u>P</u> éptido <u>s</u> eñal
SDS-PAGE	" <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate polyacrylamide gel <u>e</u> lectrophoresis"
SFS	<u>S</u> acarificación y <u>f</u> ermentación <u>s</u> imultanea
SSTII	<u>S</u> istema de <u>s</u> ecreción <u>t</u> ipo <u>I</u> I
SSTV	<u>S</u> istema de <u>s</u> ecreción <u>t</u> ipo <u>V</u>
TA	<u>T</u> emperatura <u>a</u> mbiente
UT	<u>U</u> nidad de <u>t</u> ranslocación
μ	Velocidad específica de crecimiento

RESUMEN

Para reducir los costos de producción del etanol lignocelulósico, se requiere diseñar microorganismos con la capacidad de fermentar todos los azúcares presentes en la lignocelulosa (pentosas y hexosas) y secretar las enzimas necesarias para la hidrólisis de celulosa (celulasas y β -glucosidasas). Esta idea se conoce como bioproceso consolidado (BPC) y tiene la ventaja de que la co-fermentación de azúcares, la producción de enzimas y la sacarificación de la celulosa se puede realizar en un solo reactor. La bacteria *Escherichia coli* es una candidata potencial para el BPC, ya que puede fermentar las pentosas y las hexosas, su metabolismo, su fisiología y su genética se conocen ampliamente, y existen muchas herramientas disponibles para su manipulación genética. Aunque *E. coli* no produce etanol como producto principal de fermentación, la ingeniería de vías metabólicas ha permitido el desarrollo de cepas homoetanológicas como *E. coli* MS04 (*E. coli* MG1655: $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH$, $\Delta ldhA$, $PpflB::pdc_{Zm}-adhB_{Zm}$, Δreg 27.3 kb, *gatC* S184L, $\Delta midarpA$), diseñada en nuestro grupo de investigación.

A pesar de que *E. coli* fermenta una gama amplia de azúcares, es incapaz de fermentar celobiosa (dímero de glucosa producido durante la hidrólisis enzimática de la celulosa). En la presente tesis, se ancló en la membrana externa de la cepa etanológica *E. coli* MS04, la β -glucosidasa BglC de *Thermobifida fusca*, confiriéndole la capacidad de hidrolizar y fermentar celobiosa en etanol, evitando de esta manera el empleo de β -glucosidasas comerciales. El despliegue de BglC se logró utilizando las proteínas autotransportadoras AIDA-I y Ag43, pertenecientes al sistema de secreción tipo Va (SSTVa). La cepa MS04 que expresa en plásmido los sistemas AIDA-BglC o Ag43-BglC, logró fermentar 40 g/L de celobiosa como única fuente de carbono a etanol en medio mineral en 60 y 48 h respectivamente, con un rendimiento del 81 % respecto al máximo teórico. Un estudio de las proteínas de membrana externa de células tratadas con tripsina, analizadas por SDS-PAGE y Western-blot, permitió demostrar que BglC se ancla en la cara exterior de la membrana externa. BglC desplegada en las células con el sistema AIDA-I, mostró una actividad celobiasa de 173 U/g_{CDW}, tuvo una actividad relativa del 93.3 % en presencia de 40 g/L de etanol y retuvo el 100 % de su actividad después de dos días de incubación a 37 °C con la misma concentración de etanol. Finalmente, se construyó un

sistema para secretar a BglC al medio exterior de MS04 utilizando la proteína autotransportadora EspP, permitiendo el crecimiento de esta cepa en 40 g/L de celobiosa como única fuente de carbono en medio mineral. Este trabajo muestra el potencial del SSTV y de BglC como herramientas para el desarrollo del BPC con *E. coli*.

ABSTRACT

To reduce lignocellulosic ethanol production costs, it is necessary to construct strains capable of fermenting all the sugars present in lignocellulose (pentoses and hexoses), and of secreting the enzymes needed to hydrolyze cellulose (cellulases and β -glucosidases). This idea is known as consolidated bioprocessing (CBP), and has the advantage that the co-fermentation of sugars, enzyme production and cellulose saccharification can be performed in a single reactor. *Escherichia coli* is a good candidate for the CBP, since it ferments pentoses and hexoses, it is a well-known microorganism in its physiology, biochemistry and genetics, and a wide array of genetic tools are available to facilitate its genetic modification. Although *E. coli* does not produce ethanol as its main fermentation product, the development of homoethanogenic strains in our research group, such as *E. coli* MS04 (*E. coli* MG1655: $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH$, $\Delta ldhA$, $PpflB::pdc_{Zm}-adhB_{Zm}$, Δreg 27.3 kb, $gatC$ S184L, $\Delta midarpA$), has been achieved with the help of metabolic engineering.

Although *E. coli* can ferment a broad range of sugars, it cannot hydrolyze cellobiose (glucose dimer produced during the enzymatic hydrolysis of cellulose). To avoid the use of commercial β -glucosidases, in the present work, the *Thermobifida fusca* β -glucosidase BglC was attached to the cell surface of *E. coli* MS04. BglC was displayed with the autotransporters AIDA-I and Ag43, which belong to the type V secretion system (TVSS). MS04 that had been transformed with a plasmid that carries the AIDA-BglC or Ag43-BglC secretion system, fermented 40 g/L cellobiose as the sole carbon source in mineral medium at 60 and 48 h, respectively, with an ethanol yield of 81 % of the theoretical maximum. When displayed on the cell surface with AIDA-I, BglC had a cellobiase activity of 173 U/g_{CDW}, showed 93.3 % relative activity in the presence of 40 g/L ethanol and retained 100 % of its activity following 2 days of incubation at 37 °C with the same ethanol concentration. Finally, a secretion system with the autotransporter EspP was constructed. MS04 transformed with the EspP-BglC system, secreted BglC into the milieu, allowing the cell to grow in 40 g/L cellobiose as the sole carbon source in mineral medium. This study shows the potential of the TVSS and BglC as tools in the CBP with *E. coli*.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL¹

Etanol carburante a partir de lignocelulosa, una alternativa renovable y amigable con el medio ambiente

Actualmente, el mundo se está enfrentando al fin de la era del petróleo barato y de fácil acceso (18, 91, 92, 104); aún así, la demanda mundial por hidrocarburos sigue en aumento, sin tomar en cuenta que la producción global petrolera ya alcanzó su pico máximo (18, 91, 92, 104). Aunado a lo anterior, la contaminación asociado a la quema de combustibles fósiles ha causado un incremento en los gases de efecto invernadero como el CO₂, el cual desde los inicios de la revolución industrial ha aumentado de forma exponencial (53, 54). Por tales razones, es imperativo desarrollar la ciencia y la tecnología para la producción de compuestos químicos sustitutos de derivados del petróleo a partir de fuentes renovables y amigables con el ambiente. Una opción es la transformación de azúcares, mediante procesos de fermentación, en compuestos químicos (metabolitos) que puedan reemplazar los petroquímicos (28). Un ejemplo es el alcohol etílico, ya que puede utilizarse como combustible en las máquinas de combustión interna actuales (2, 19, 42). De hecho, existen en el mercado mundial automóviles que pueden funcionar con gasolina, etanol o sus mezclas denominados "vehículos de combustible flexible", y en países como Brasil, sus ventas son mayores al 95% del total de automóviles (2, 19, 42).

La lignocelulosa es el polímero más abundante en la tierra y es un material rico en azúcares fermentables (19, 44, 145). Además, la transformación y el empleo de este biopolímero no compiten con la cadena de producción de alimentos (19, 20, 44, 124). Su

¹ La introducción general fue adaptada de un manuscrito de revisión sometido para su publicación que se muestra en el Anexo 2:

Iván Muñoz-Gutiérrez and Alfredo Martínez. Polysaccharide Hydrolysis with Engineered *Escherichia coli* for the production of Bio-Commodities. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (2012) submitted Novembre 10, 2012.

estructura consiste principalmente por tres grandes facciones: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina (Figura 1.1 y 1.2) (20, 43). La celulosa, es un homopolímero de glucosa; la hemicelulosa, es un heteropolímero constituido de pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (glucosa, manosa y galactosa); y la lignina es un heteropolímero de fenilpropanoides (Figura 1.2) (43, 112).

Figura 1.1
Composición de la lignocelulosa. Los promedios están dados en porcentaje del peso total. Xilosa, xil; arabinosa, ara; manosa, man; glucosa, glu; galactosa, gal.
Diagrama tomado de: Jarboe *et al.* 2007 (57).

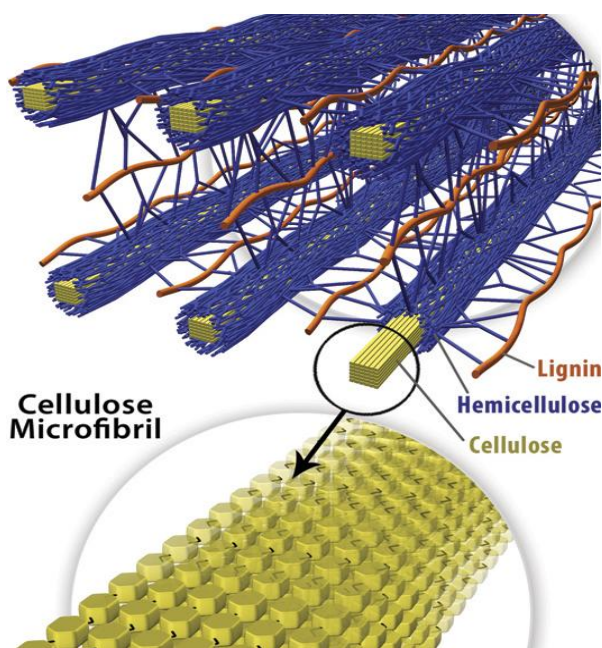
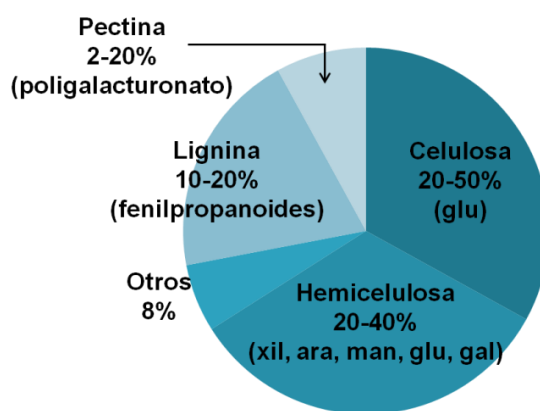


Figura 1.2 Estructura de la lignocelulosa. Varias cadenas de celulosa se asocian con puentes de hidrógeno generándose estructuras cristalinas altamente ordenadas llamadas microfibrillas. La hemicelulosa se une a la superficie de las microfibrillas, cubriéndolas y evitando que tengan contacto directo las microfibrillas, dando flexibilidad al material. La lignina es el sello que encapsula a los polisacáridos. Diagrama tomado de: National Renewable Energy Laboratory, USA.
<http://www.nrel.gov/>

La lignocelulosa puede obtenerse a partir de residuos forestales (11, 85) y agrícolas (32, 78, 79), papel de reciclaje (136, 144), o incluso a partir de cultivos energéticos dedicados a la producción de lignocelulosa como algunos tipos de árboles (77, 140), pastos

de rápido crecimiento (37, 118) o plantas de agave (27, 73). Para liberar los azúcares fermentables de la lignocelulosa, la biomasa se somete primeramente a un pretratamiento cuya finalidad es romper el sello de lignina, solubilizar la fracción hemicelulósica y hacer la fracción celulósica más accesible a la digestión enzimática durante el proceso de sacarificación (90, 141). El pretratamiento puede ser físico, químico o una combinación de ambos, y éste determina en cierto grado la cantidad y la mezcla óptima de enzimas sacarolíticas requeridas en el siguiente paso (87, 90). Es importante mencionar que, aunque la hemicelulosa está constituida por pentosas y hexosas, su hidrólisis genera principalmente xilosa (32, 73, 78, 79, 93, 118, 140). También, existen algunos residuos agrícolas como la cáscara de los cítricos y las pulpas de la remolacha azucarera y de la manzana que son ricas en pectina, heteropolímero constituido principalmente de ácido galacturónico (29).

Después del pretratamiento, el material se exprime, se lava (removiendo el jarabe rico en pentosas) y se acondiciona para el proceso de sacarificación, donde la celulosa se digiere de forma sinérgica mediante la acción de glucanasas que rompen los enlaces β (1 \rightarrow 4) de las cadenas. Estas enzimas se clasifican en endocelulasas, exocelulasas y β -glucosidasas y su mecanismo de acción se presenta en la Figura 1.3 (106, 128). Si durante el pretratamiento no se hidrolizó la fracción hemicelulósica y/o la pectina, el coctel enzimático tendrá que enriquecerse con enzimas accesorias como: xilanasas, β -xilosidasas, estereasas, arabinosidasas, pectinasas, etc. (10, 87).

Una de las mayores limitantes para la producción de etanol lignocelulósico es el costo de las enzimas empleadas durante la sacarificación (67, 101). A diferencia del almidón, que es un polisacárido de reserva con una estructura fácilmente hidrolizable, la lignocelulosa tiene una función estructural que otorga rigidez a las plantas, por lo que es más resistente a la hidrólisis (87). Si comparamos la cantidad de enzima en peso, se necesita de 40 a 100 veces más enzima para hidrolizar celulosa que almidón (87). Otra limitante importante de estas hidrolasas es la inhibición por producto, ya que por un lado, las endo y las exocelulasas se inhiben con celobiosa, mientras que por el otro, las β -glucosidasas se inhiben por glucosa (87, 121, 128). A nivel industrial, las celulasas y las β -glucosidasas se producen a partir de los hongos *Trichoderma reesie* y *Aspergillus niger*, respectivamente (87, 121, 128).

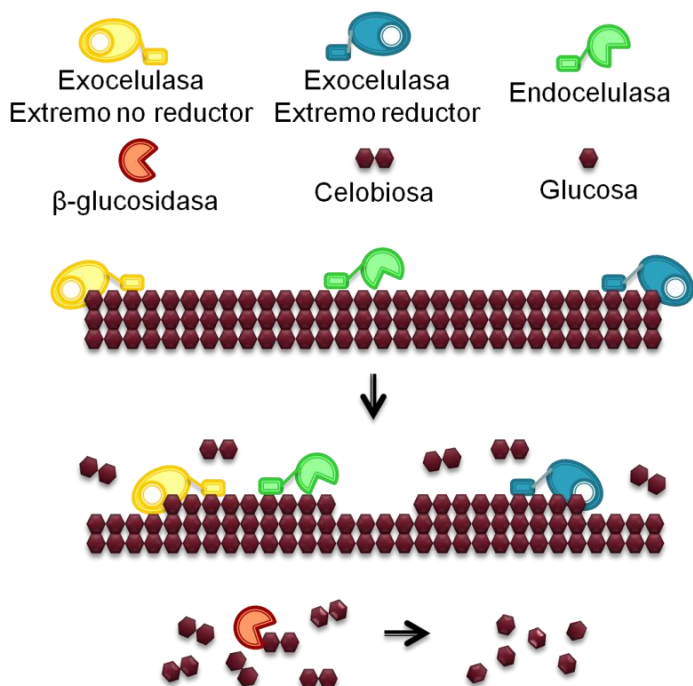


Figura 1.3 Hidrólisis enzimática de celulosa. La celulosa es un polisacárido insoluble en agua, por lo que las endo y exocelulasas poseen dominios de unión a celulosa que les permiten adsorberse sobre el polímero. Los enlaces glucosídicos internos son rotos por las endocelulasas, mientras que las exocelulasas hidrolizan de forma prosesiva a partir de los extremos liberando celobiosa (dímeros de glucosa), que ya es soluble en agua. Las β -glucosidasas hidrolizan celobiosa generando glucosa.

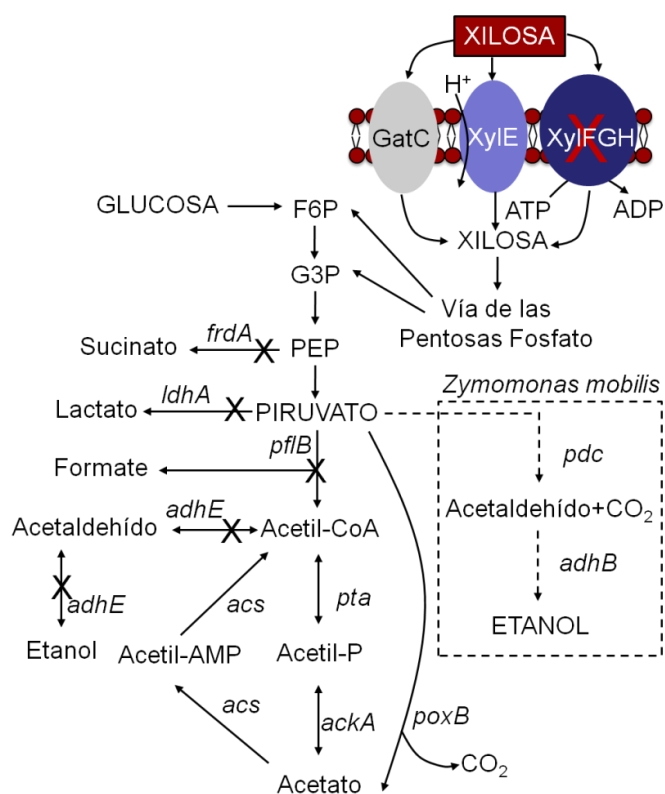
La hidrólisis de la lignocelulosa produce un espectro muy amplio de azúcares fermentables de 5 y 6 carbonos (Figura 1.1) (57, 112). Además, la biomasa rica en pectina produce ramnosa y ácido galacturónico (29). Aunque la fermentación se puede llevar a cabo con organismos naturalmente etanológicos como *Saccharomyces cerevisiae* o *Zymomonas mobilis*, estos microorganismos carecen de la capacidad de fermentar las pentosas y el ácido galacturónico (4, 57), desperdiándose la fracción hemicelulósica.

Por otro lado, aunque *Escherichia coli* no tiene la capacidad de producir etanol como único producto de fermentación, tiene la habilidad de fermentar una gama muy amplia de azúcares que incluyen: pentosas, hexosas, ácidos urónicos y polioles (102). Además, las cepas de *E. coli* (no patógenas) que se usan ampliamente tanto a nivel industrial como de laboratorio, pueden crecer en medios minerales sin suplementos complejos (81). Aunque se sabe que muchos compuestos tóxicos formados durante el pretratamiento de la lignocelulosa pueden inhibir las fermentaciones con *E. coli* (40); actualmente se cuentan con cepas capaces de fermentar azúcares provenientes de biomasa pretratada, incluso en presencia de compuestos tóxicos como: el furfural, el hidroximetilfurfural y el acetato (34, 39).

Escherichia coli es un microorganismo que se utiliza ampliamente a escala industrial para la producción de compuestos biotecnológicos y que se conoce bien desde el

punto de vista microbiológico, fisiológico y genético; además, existen muchas herramientas moleculares disponibles que facilitan su manipulación genética (24, 51, 102, 105). Por tales razones, *E. coli* ha sido modelo de estudio en la ingeniería de vías metabólicas (IVM) para la producción de compuestos químicos y combustibles que sustituyan los petroquímicos (34, 52, 103, 131, 132). En este sentido, nuestro grupo de investigación ha trabajado por varios años en la IVM de *E. coli* para la producción de etanol a partir de hidrolizados lignocelulósicos (34, 52, 80, 103). Actualmente, el laboratorio cuenta con la cepa etanológica *E. coli* MS04 (*E. coli* MG1655: $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH$, $\Delta ldhA$, *Ppf1B::pdc_{Zm}-adhB_{Zm}*, Δreg 27.3 kb, *gatC* S184L, $\Delta midarpA$) desarrollada por Utrilla *et al.* (131, 132) y Fernández-Sandoval *et al.* (34), capaz de fermentar pentosas y hexosas de forma eficiente, y tolerar altas concentraciones de acetato (Figura 1.4).

Figura 1.4 Vías fermentativas de *E. coli* MG1655 y *E. coli* MS04. Las vías nativas se muestran con líneas sólidas. La vía heteróloga para la producción de etanol se muestra con líneas interrumpidas. Los genes que codifican para las enzimas se indican en *itálicas*. El símbolo "X" indica genes eliminados para reducir la producción de productos secundarios. Alcohol deshidrogenasa, *adhE*; fumarato reductasa, *frdA*; lactato deshidrogenasa, *ldhA*; piruvato formato liasa, *pflB*; fosfoacetilasa, *pta*; acetato quinasa A, *ackA*; acetil Co-A sintetasa, *acs*; piruvato oxidasa, *poxB*; piruvato descarboxilasa de *Z. mobilis*, *pdc*; alcohol deshidrogenasa B de *Z. mobilis*, *adhB*. Diagrama adaptado de: Fernández-Sandoval *et al.* (34) y Utrilla *et al.* (132).

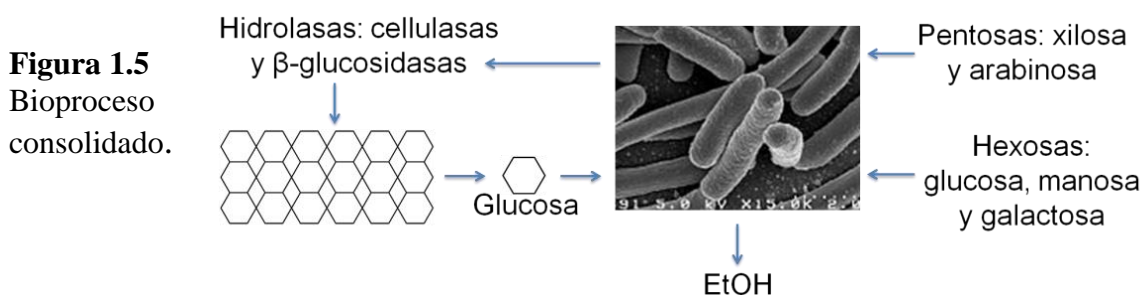


Hacia el Bioproceso Consolidado

Para reducir los costos y simplificar el proceso de producción de biocombustibles, se requiere de microorganismos con la capacidad de fermentar todos los azúcares presentes en

la lignocelulosa en el metabolito de interés y de secretar enzimas sacarolíticas; ésto permitiría realizar la producción de enzimas, la sacarificación y la co-fermentación de azúcares en un solo reactor (Figura 1.5). Adicionalmente, se eliminaría la inhibición enzimática por producto, ya que las células lo irían fermentando, por lo que las enzimas trabajarían a su máxima actividad (Figura 1.5) (75). Esta idea ha sido motivo de estudio desde 1936 por Veldhuis *et al.* (134), en un inicio fue denominada conversión microbiana directa (48), y posteriormente, renombrada bioproceso consolidado (BPC) por Lynd (76). Tomando ventaja de las características antes mencionadas de *E. coli*, esta bacteria es buena candidata para el BPC.

Debido a que las celulasas y β -glucosidasas comerciales son de origen fúngico y funcionan a pHs de 4.5-5 y a temperaturas de máxima hidrólisis de 50 °C (87, 121, 128), es muy importante encontrar enzimas bacterianas que se adapten a las condiciones de *E. coli* para lograr el BPC, *id est* pH 7 y 37°C. De esta forma, tanto las enzimas como las células trabajarían a su máxima actividad.



Aunque *E. coli* puede fermentar una gama muy amplia de azúcares, no tiene la capacidad de fermentar polisacáridos ni algunos oligosacáridos como las celodextrinas y las xilodextrinas. Este hecho ha motivado el desarrollo de estrategias que le confieran a *E. coli* la capacidad de secretar enzimas sacarolíticas con la finalidad de producir metabolitos directamente de carbohidratos estructurales o de reserva, reduciendo la adición externa de enzimas sacarolíticas (93). La secreción de enzimas hidrolíticas tiene muchas ventajas: las enzimas tienen acceso libre a los sustratos insolubles como la celulosa y los oligosacáridos pueden hidrolizarse sin la necesidad de que crucen la envoltura celular (93). Si las enzimas se “inmovilizan” sobre la superficie celular, el biocatalizador puede ser más estable y recuperarse con las células para subsecuentes procesos de fermentación y/o de

sacarificación (93). Actualmente, el anclaje de enzimas sacarolíticas para la hidrólisis de sustratos no naturales de *E. coli* está adquiriendo mucha relevancia en la producción de algunos metabolitos; especialmente, la secreción de enzimas involucradas en la hidrólisis de polisacáridos de bajo costo (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Despliegue de enzimas sacarolíticas en la superficie de *E. coli* y sus aplicaciones.

Proteína Ancla	Proteína(s) pasajera(s)	Aplicación
Lpp-OmpA de <i>E. coli</i> (36)	Exoglucanasa de <i>Cellulomonas fimi</i>	Hidrólisis de celulosa
Blc de <i>E. coli</i> (129)	β -glucosidasa de <i>Thermobifida fusca</i>	Hidrólisis de celobiosa
Blc de <i>E. coli</i> (123)	β -glucosidasa de <i>T. fusca</i>	Producción de isopropanol a partir de celobiosa
AIDA-I de <i>E. coli</i> (94) ¹	β -glucosidasa de <i>T. fusca</i>	Producción de etanol a partir de celobiosa
INP de <i>P. syringae</i> (63)	Carboximetilcelulasa de <i>B. subtilis</i>	Hidrólisis de carboximetilcelulosa
INP de <i>P. syringae</i> (65)	Carboximetilcelulasa de <i>B. subtilis</i>	Análisis de librerías de enzimas
INP de <i>P. syringae</i> (74)	Endoglucanasa de <i>Clostridium phytofermentans</i>	Análisis de librerías de enzimas
PgsA de <i>B. subtilis</i> (95)	α -amilasa de <i>Streptococcus bovis</i>	Hidrólisis de almidón de maíz
PgsA de <i>B. subtilis</i> (115)	Endocelulasa, exocelulasa y β -glucosidasa de <i>Clostridium cellulolyticum</i>	Producción de etanol a partir de celulosa de rastrojo de maíz
PgsA de <i>B. subtilis</i> (23)	Xilanasas de <i>C. fimi</i>	Aumento en la estabilidad de la enzima

¹Trabajado desarrollado en el presente proyecto

Despliegue de Enzimas Sacarolíticas en la Superficie Celular

El despliegue en la superficie celular se basa en el empleo de proteínas de membrana externa (PME) como acarreadoras; la proteína pasajera (la enzima a ser secretada) se fusiona por el amino- o el carboxilo terminal a la PME, y cuando la quimera llega al espacio periplásmico, la proteína pasajera se transloca a través de la membrana externa y se

mantiene anclada con la ayuda de la PME (Figura 1.6) (14, 93, 139). Existe una gran variedad de PMEs empleadas como acarreadoras para el despliegue de proteínas en *E. coli*. Algunas son propias de *E. coli*, como el sistema híbrido desarrollado por Francisco *et al.* (35) que consiste del péptido señal y de los primeros nueve aminoácidos de la Lipoproteína Lpp fusionada a cinco de las ocho asas transmembranales de la PME OmpA (figura 1.6A). Otras PME pertenecen a bacterias Gram negativas como la "ice nucleation protein" (INP) de *Pseudomonas syringae* (Figura 1.6B). Incluso, existen reportes de proteínas de bacterias Gram positivas que se pueden utilizar como acarreadoras en *E. coli*, tal es el caso de la poli- γ -glutamato sintasa (PgsA) de *Bacillus subtilis*. Sin embargo, son pocos los reportes de anclaje de enzimas sacarolíticas en *E. coli* (93); y sólo tres reportes a la fecha (incluido el presente trabajo) demuestran el despliegue de enzimas sacarolíticas para producir metabolitos de interés a partir de la hidrólisis de carbohidratos no naturales de *E. coli* (Tabla 1.1).

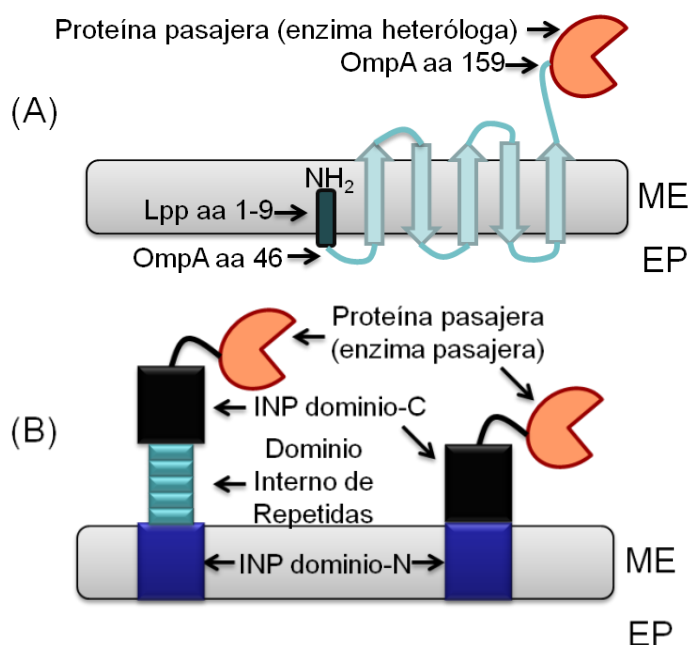


Figura 1.6 Ejemplos del despliegue de proteínas en la superficie celular. **(A)** Anclaje de una enzima heteróloga por su N-terminal utilizando el sistema híbrido Lpp-OmpA (35). **(B)** Anclaje de una enzima heteróloga por su N-terminal utilizando la INP (63). El dominio interno de repetidas puede modularse en tamaño o removerse. ME, membrana externa; EP, espacio periplásmico; aa, aminoácidos; OmpA, proteína de membrana externa A; Lpp, lipoproteína; INP, "ice nucleation protein".

Despliegue de Proteínas Utilizando el Sistema de Proteínas

Autotransportadoras

En las bacterias Gram negativas se han descrito siete sistemas diferentes que les permiten secretar proteínas, ayudándolas a cruzar las membranas interna y externa (41, 50). De éstos, el sistema de secreción tipo II (SSTII) se ha utilizado para la secreción de enzimas

sacarolíticas en *E. coli* (30, 46, 146). Sin embargo, el SSTII es una estructura muy compleja, que consiste de 12 a 15 proteínas diferentes, que cruzan la membrana interna y externa (68). Además, aunque el SSTII está muy conservado, posee una alta especificidad por sus proteínas blanco, ya que discrimina entre proteínas de especies muy cercanas como *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia carotovora* (46), por lo que hace complicada la secreción de proteínas heterólogas (hidrolasas) en *E. coli*.

El sistema de secreción tipo Va (SSTVa), también conocido como el sistema de las proteínas autotransportadoras, es considerado el sistema de secreción más sencillo (9, 26, 71, 114), lo que ha permitido emplearlo para la secreción de proteínas heterólogas (60, 114). Toda la información requerida para la secreción en el SSTVa está contenida en un solo gen que codifica para una pre-proteína multidominio que contiene un péptido señal (PS) en el N-terminal, una proteína pasajera en el centro, y una unidad de translocación (UT) en el C-terminal (Figura 1.7A) (26, 71, 114). A la vez, la proteína pasajera posee una autochaperona en el C-terminal (12, 100, 107, 125); y la UT está formada por un conector en el N-terminal y un barril- β en el C-terminal (Figura 7A) (26, 71, 114). En la Figura 1.7B se esquematiza el mecanismo de secreción y se observa que el PS conduce a la pre-proteína al espacio periplásmico a través del sistema Sec, en donde una peptidasa señal remueve el péptido señal (26, 71, 114). Posteriormente, el barril- β de la UT se embebe en la membrana externa y la proteína pasajera se transloca a través de la membrana externa mediante la UT (26, 71, 114). Finalmente, el conector ancla a la proteína pasajera a la superficie celular (Figura 1.7B) (26, 71, 114). Sin embargo, algunas proteínas pasajeras se procesan proteolíticamente después de translocarse, ya sea por sitios de autoproteólisis (5, 22, 47) o por proteasas de membrana externa (31). Aunque, dentro de éstas, algunas permanecen unidas a la UT por interacciones no covalentes después de ser procesadas (16, 21). Para poder desplegar una proteína de interés sirviéndose del sistema de proteínas autotransportadoras, se necesita reemplazar la región que codifica para la proteína pasajero endógena por la proteína heteróloga (60, 61).

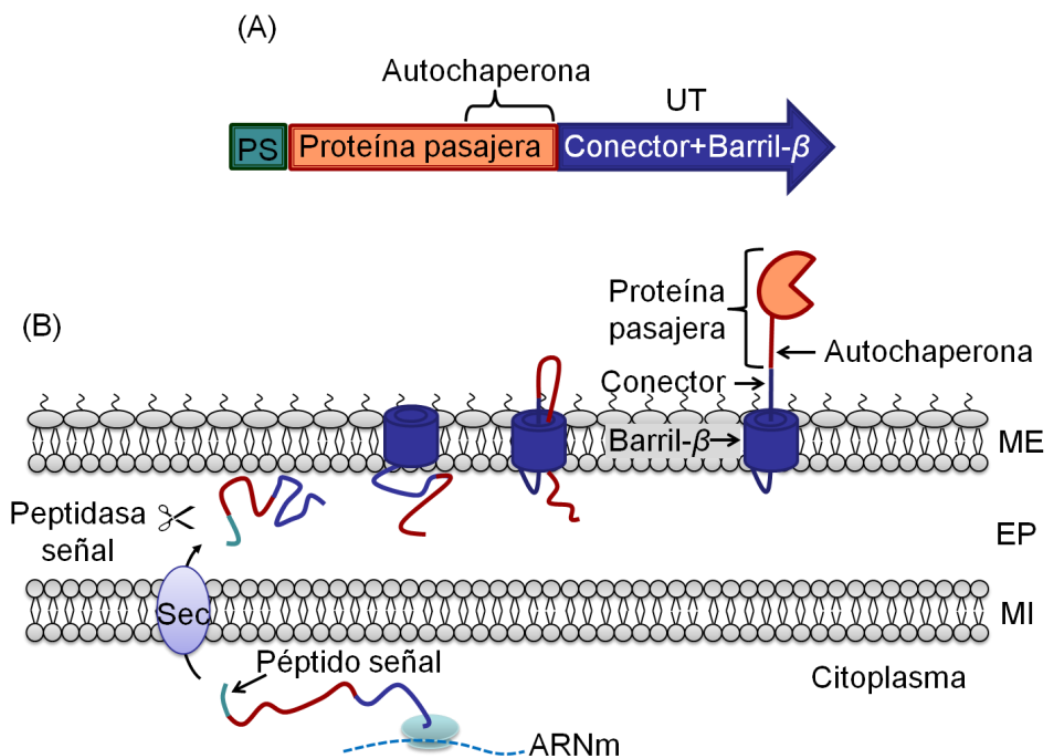


Figura 1.7 Secreción de proteínas autotransportadoras. (A) Estructura de la pre-proteína multidominio. (B) Mecanismo del anclaje de una proteína pasajera del SSTVa. Péptido señal, PS; unidad de translocación, UT; membrana externa, ME; espacio periplásmico, EP; membrana interna, MI.

Alcance de la Tesis

Las β -glucosidasas tienen un papel muy importante durante la sacarificación de celulosa, ya que al hidrolizar la celobiosa producida durante la hidrólisis de celulosa, elimina la inhibición por producto que ejerce este compuesto a las celulasas (3, 87, 121, 128). Además, dado que a nivel industrial el hongo *T. reesie* produce bajos títulos de β -glucosidasas, los cocteles enzimáticos tienen que enriquecerse con β -glucosidasas de *A. niger* (3, 87, 121, 128). Por lo tanto, como un primer acercamiento hacia el BPC, en el presente proyecto se propuso la secreción de una β -glucosidasa en la cepa etanológica *E. coli* MS04 utilizando el sistema de las proteínas autotransportadoras. De esta forma, se confirió la capacidad a *E. coli* MS04 de fermentar la celobiosa en etanol.

CAPÍTULO 2

DESPLIEGUE DE LA β -glucosidasa BglC DE *T. fusca* EN LA SUPERFICIE DE LA CEPA ETANOLOGÉNICA *E. coli* MS04 UTILIZANDO EL SISTEMA AIDA-I¹

Introducción

La adhesina involucrada en la adherencia difusa de *E. coli* diarreogénica ("adhesin involved in diffuse adherence", AIDA-I) (7, 8), es una de las proteínas autotransportadoras más estudiadas y utilizadas para anclar proteínas heterólogas y homólogas en la superficie celular (60, 61). Después de su descripción por Benz y Schmidt (7, 8), el grupo del Profesor Thomas F. Meyer (que también describió la primera proteína autotransportadora, la proteasa de la inmunoglobulina A1 de *Neisseria gonorrhoeae* (108)) estudió el tamaño mínimo de la UT de AIDA-I, para la secreción de una proteína pasajera heteróloga (82, 83). A partir de esos trabajos pioneros, AIDA-I se ha utilizado para el despliegue de proteínas de importancia biotecnológica como los que se muestran en la Tabla 2.1.

Debido a que AIDA-I se ha utilizado ampliamente para el anclaje de proteínas heterólogas en *E. coli* (Tabla 2.1) (60, 61), fue seleccionada como proteína autotransportadora modelo en el presente proyecto. La β -glucosidasa seleccionada fue BglC de *Thermobifida fusca* (anteriormente nombrada *Thermomospira fusca*), ya que ha sido expresada de forma funcional en *E. coli* y sus características cinéticas se ajustan a las

¹ Parte de los resultados del presente capítulo fueron publicados en la referencia que se da a continuación y se muestra en el Anexo 1:

Muñoz-Gutiérrez I, Oropeza R, Gosset G, Martínez A (2012) Cell surface display of a β -glucosidase employing the type V secretion system on ethanologenic *Escherichia coli* for the fermentation of cellobiose to ethanol. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39(8):1141-1152.

condiciones de crecimiento de *E. coli*, *id est*, pH 7 y 37°C (126). Además, BglC no es inhibida por glucosa (33, 126), es una β -glucosidasa monomérica (126) y tiene un peso molecular (PM) de 53 kDa (126)) que se ajusta a los PMs de las proteínas secretadas con el sistema AIDA-I (61). Finalmente, BglC es una enzima citoplasmática que no forma puentes disulfuro, punto muy importante, ya que se ha reportado que la formación de puentes disulfuro en el espacio periplásmico interfiere con la secreción de proteínas heterólogas del sistema AIDA-I (61).

Tabla 2.1 Despliegue de proteínas heterólogas y homólogas en la superficie de *E. coli* utilizando el sistema AIDA-I.

Proteína	Origen	Fuente
Subunidad B de la toxina del cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	(82)
β -lactamasa	-----	(70)
Adrenodoxina bovina	Bovino	(59)
Esterasa	<i>Burkholderia gladioli</i>	(119)
Sorbitol deshidrogenasa	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	(62)
Organofosforo hidrolasa	<i>Moraxella</i> sp.	(72)
Proteína de unión a maltosa	<i>E. coli</i>	(113)
Proteína SefA	<i>Salmonella enteritidis</i>	(97)
β -glucosidasa	<i>T. fusca</i>	(94) ¹

¹Trabajado desarrollado en el presente proyecto

Objetivo General

Anclar a BglC en la superficie de la cepa etanológica *E. coli* MS04 utilizando el sistema AIDA-I para hidrolizar y fermentar la celobiosa a etanol.

Objetivos Particulares

1. Determinar el efecto del etanol y acetato sobre la actividad de BglC soluble.
2. Construir el sistema de secreción AIDA-BglC.
3. Transformar la cepa MS04 etanológica con el sistema AIDA-BglC y demostrar el anclaje de BglC en la superficie celular.

4. Caracterizar cinéticamente la cepa MS04 que expresa el sistema AIDA-BglC en medio mineral y utilizando celobiosa como única fuente de carbono.
5. Determinar la actividad de BglC anclada durante las fermentaciones.
6. Determinar la estabilidad de BglC anclada en presencia de etanol.

El presente capítulo está dividido en dos secciones, en la primera se presenta el primer objetivo particular con sus respectivos materiales, métodos, resultados y discusión. En la segunda, se discuten de forma resumida los objetivos particulares restantes, ya que, los materiales, métodos, resultados y discusión de estos objetivos, se describen *in extenso* con la presentación en el Anexo 1 del manuscrito publicado en el "Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology".

Primera Sección

Efecto del Etanol y Acetato Sobre la Actividad de BglC Soluble

Además de requerir una β -glucosidasa que sea compatible con el sistema de secreción AIDA-I y las condiciones de crecimiento de *E. coli*, se necesita una enzima compatible con las condiciones que se encuentran durante la fermentación, siendo el etanol un posible inhibidor de su actividad enzimática. En el caso particular de los hidrolizados lignocelulósicos, las concentraciones altas de algunos compuestos formados durante el pretratamiento, como el acetato, también pueden causar inhibición enzimática si los hidrolizados son utilizados directamente en la fermentación (78, 79). Finalmente, es importante mencionar que la cepa etanológica *E. coli* MS04 requiere de 2 g/L de acetato para su crecimiento (34). Por lo tanto, es importante conocer el desempeño de BglC en presencia de estos compuestos.

Materiales y Métodos

Para la producción de BglC soluble se utilizaron células de *E. coli* BL21 (F⁻ *ompT hsdSB*(rB⁻, mB⁻) *gal dcm* (DE3)) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) transformadas con el plásmido pNS6 que tiene clonado el gen *bglC* de *T. fusca* (49). El plásmido pNS6 (donado por el Prof. Dr. Wilson de la Universidad Cornell, NY, USA) es un derivado del plásmido

de expresión pET-26b(+)¹ (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), cuya expresión se induce con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Este plásmido fue construido por Spiridonov y Wilson (49).

Una alícuota de células competentes de *E. coli* BL21 (50 μ L) se transformó por electroporación (116) con 2 μ L de plásmido pNS6 (1-2 ng/ μ L) y se recuperaron en 1 mL de medio SOC (116) por 1 h a 37 °C y 300 rpm. Posteriormente, las células se sembraron en medio Luria (Luria Broth, LB) con agar (1.5%) (116) más kanamicina (30 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C hasta observar colonias. A continuación, se tomaron tres colonias con un asa bacteriológica y se sembraron en 50 mL de medio LB kanamicina (30 μ g/mL) y se dejaron crecer por 12 h a 37 °C y 300 rpm. Después, los 50 mL se inocularon en 950 mL de LB kanamicina (30 μ g/mL) a 37 °C y 300 rpm, permitiendo que las células alcanzaran una densidad óptica a 600 nm de longitud de onda (DO_{600}) de 0.5. En seguida, las células se indujeron con 0.5 mM de IPTG (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 20 °C hasta que alcanzaron una DO_{600} de entre 1.5 y 2. Las células se recuperaron por centrifugación durante 10 min a 4 °C y 4,000 \times g. El pellet se lavó dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 y se recuperó en 4 mL de solución amortiguadora. A continuación, las células se prensaron a 900 psi con una prensa francesa para lograr la extracción de la enzima. Finalmente, los restos celulares se separaron por centrifugación durante 30 min a 4°C y 13,400 \times g.

La actividad de BglC se midió a 37 °C utilizando celobiosa (10 mM, Sigma) en solución amortiguadora fosfatos 50 mM pH 7. Para observar el efecto del etanol en la actividad celobiasa, se midió la actividad en presencia de etanol, variando la concentración de éste entre 0 y 100 g/L (J.T. Baker, Avantor Performance Materials, Phillipsburg, NJ, USA). Para estudiar el efecto del acetato en la actividad celobiasa, se midió la actividad en presencia de acetato de sodio (J.T. Baker), variando su concentración entre 0 y 10 g/L. Las reacciones se realizaron en tubos de ensaye con un volumen de reacción de 2 mL que se atemperó durante 5 min a 37 °C. Las reacciones se iniciaron adicionando 0.15 U por mL de reacción y se siguieron tomando 200 μ L de muestra a intervalos de tiempo regulares. Para inactivar la enzima, las muestras se colocaron en baño María por 5 min. La glucosa liberada se midió con un analizador enzimático (Modelo 2700, YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA). Bajo las condiciones de reacción establecidas anteriormente, se encontró

experimentalmente que el extracto enzimático de BglC tenía una actividad celobiasa de 130 U/mL.

Resultados y Discusión

Para estudiar el efecto del etanol en la actividad celobiasa se seleccionó una concentración de 100 g/L como límite superior, ya que se sabe que a esta concentración el crecimiento de *E. coli* se inhibe totalmente (142, 143), aunque el objetivo tecnológico con hidrolizados lignocelulósicos es obtener valores por arriba de 35 g/L (4, 38). También cabe mencionar que se han realizado fermentaciones donde MS04 produce cerca de 25 g/L de etanol con glucosa (34). En la Figura 2.1A se muestra la gráfica a diferentes concentraciones de etanol contra la actividad, en la que los valores se normalizaron tomando la actividad sin etanol como 100 %. En la gráfica se observa que hasta 50 g/L de etanol no se presenta una disminución en la actividad relativa de BglC. Es sólo después de esta concentración que hay una disminución, llegándose a tener un 70 % de actividad a 100 g/L del alcohol. Por otro lado, entre los 10 y 20 g/L de etanol la enzima presenta una activación. Este fenómeno de activación también se ha observado con β -glucosidasas de *Monascus purpureus*, *Melanocarpus. sp* y *Pichia anomala* (25, 64, 127).

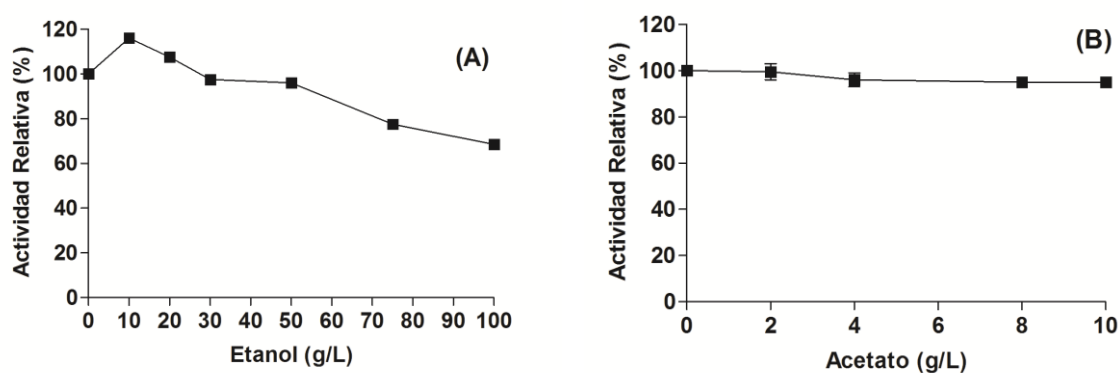


Figura 2.1 Efecto de etanol (A) y acetato (B) sobre la actividad de BglC soluble. Las reacciones se realizaron por duplicado.

El acetato es el compuesto inhibitorio que se encuentra en mayor concentración en materiales lignocelulósicos pretratados con ácido diluido y que puede alcanzar concentraciones por arriba de 10 g/L (78, 79). En la Figura 2.1B se muestra la gráfica del

barrido de acetato contra la actividad, en la que los valores se normalizaron tomando la actividad sin acetato como 100%. En la gráfica se observa que la actividad enzimática no se ve afectada por ninguna de las concentraciones de acetato utilizadas.

Estos resultados muestran que BglC tiene potencial para utilizarse en sacarificación y fermentación simultánea (SFS) con *E. coli* MS04. Cuando menos a las condiciones que se planearon para el presente trabajo, donde se esperaba producir cerca de 20 g/L de etanol y se requería añadir 2 g/L de acetato de sodio al medio de cultivo.

Segunda Sección

Construcción del sistema de secreción AIDA-BglC

Para modular la secreción de BglC con el sistema AIDA-I, se decidió utilizar el vector pTrc99A que posee el promotor *trc* inducible por IPTG (1). El sitio de clonación múltiple posee el sitio *NcoI* (CCATGG) para clonar la región 5'. Sin embargo, el nucleótido G localizado después del ATG, modifica el codón del segundo aminoácido de PS de AIDA-I (5' ATG ATT AAA...). Debido a que las secuencias de los PSs son blancos muy importantes durante el transporte de proteínas al espacio periplásmico, se necesita mantener la secuencia intacta. Por lo tanto, el sitio *NcoI* se sustituyó por *NdeI* (CATATG) mediante mutagénesis sitio dirigida. Posteriormente, el sitio *NdeI* que se localiza en la posición 2699 en pTrc99A se eliminó con una mutación sitio dirigida, dando origen al plásmido derivado pTrc99A2.

La amplificación del PS y la UT de AIDA-I se realizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa ("polymerase chain reaction", PCR) utilizando el plásmido pJM7 como templado (plásmido donado por el Prof. Thomas F. Meyer del Instituto Max Planck, Berlín, Alemania) (82). Para la amplificación del gen *bglC* se utilizó el plásmido pNS6 (126) como templado. Después de las amplificaciones por PCR, cada dominio se clonó en forma secuencial en el pTrc99A2 obteniéndose el plásmido derivado pAIDABglC. Adicionalmente se construyó una versión de pAIDABglC con una etiqueta de histidinas entre *bglC* y la UT, que se utilizó para rastrear la traducción de este gen a través de "Western blot". La Figura 2.2 describe las proteínas quiméricas y los sitios de restricción

importantes utilizados durante la construcción de ambos plásmidos. El peso molecular calculado para la proteína quimérica sin el PS es de 103 kDa, por lo que se nombró P103.

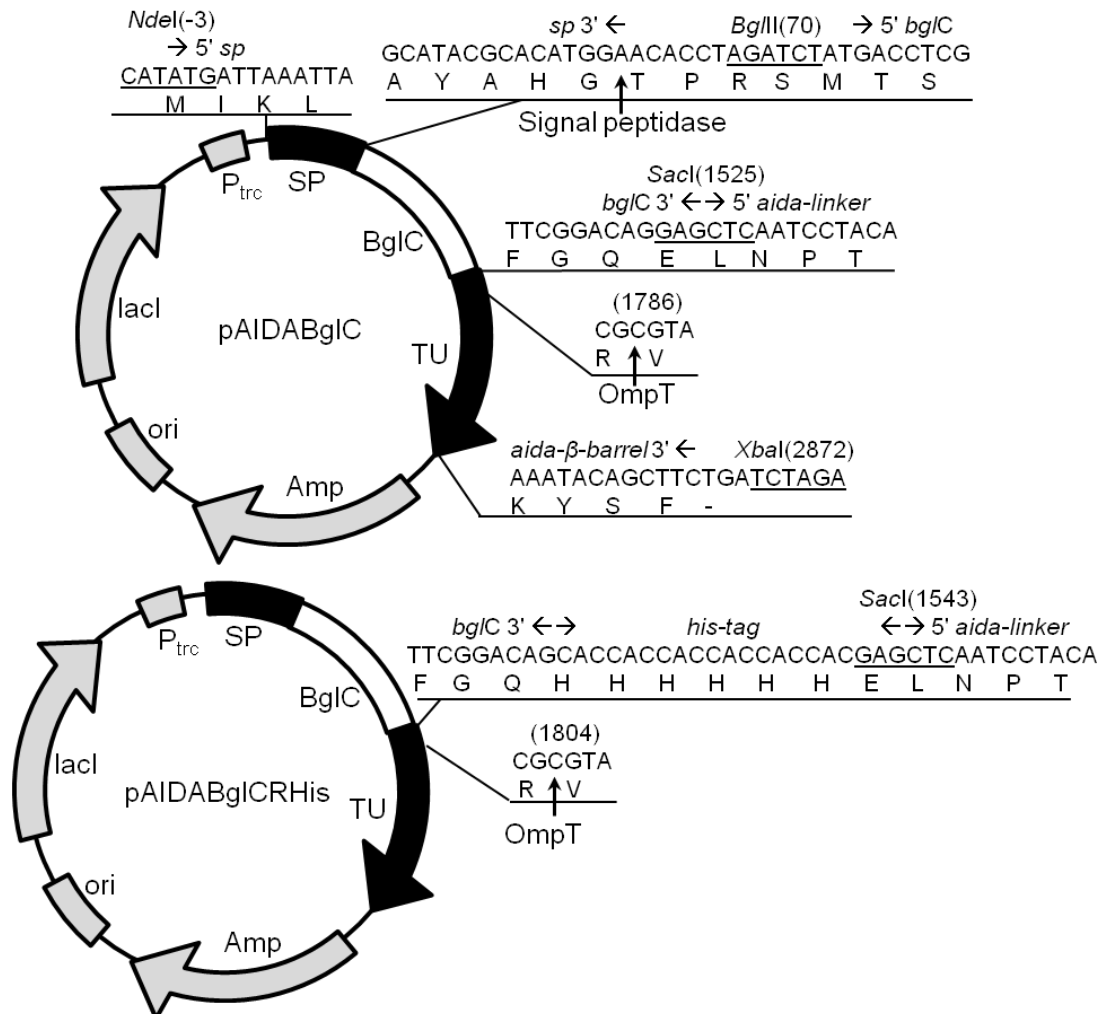


Figura 2.2 Estructura del sistema AIDA-BglC. Las fronteras entre cada dominio se muestran como secuencias y están indicadas con las *flechas horizontales*. Los sitios de restricción empleados durante la construcción de los plásmidos están *subrayados*. El sitio de corte para la proteasa OmpT y para la peptidasa señal están indicados con *flechas verticales*. SP, péptido señal; BglC, β-glucosidasa de *T. fusca*; TU, unidad de translocación.

Demostración de que el sistema AIDA-I ancla en la superficie celular a BglC

Para demostrar que BglC se expone sobre la superficie de la membrana externa, las células completas de MS04 que expresan pAIDABglCRHis se trataron con tripsina del siguiente

modo: después de crecerse en LB e inducirse con 10 μ M de IPTG, las células se sometieron a un tratamiento con tripsina para "rasurar" las proteínas expuestas en la superficie, y posteriormente, las PME se purificaron. Como control negativo se emplearon células transformadas con pTrc99A2.

La Figura 2.3A muestra un gel de poliacrilamida con las PME purificadas de células tratadas y sin tratar con tripsina. A diferencia del control negativo, las células que expresan el sistema AIDA-BglC muestran una banda al nivel de los 100 kDa, sin embargo, cuando las células se trataron con tripsina, la banda P103 desapareció, demostrando así que P103 está expuesta en la cara exterior de la membrana externa. Finalmente, las PME se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se probaron con un anticuerpo anti-His, que revelaron una señal correspondiente a la proteína P103 (Figura 2.3B). Las bandas observadas en la Figura 2.3A al nivel del marcador molecular de 35 kDa corresponden a las PME OmpF y OmpA. La PME OmpC, que migra junto a OmpF, no se indica en la figura, ya que durante la evolución de la cepa MS04, se perdió una región cromosomal que contenía el gen *ompC* (34).

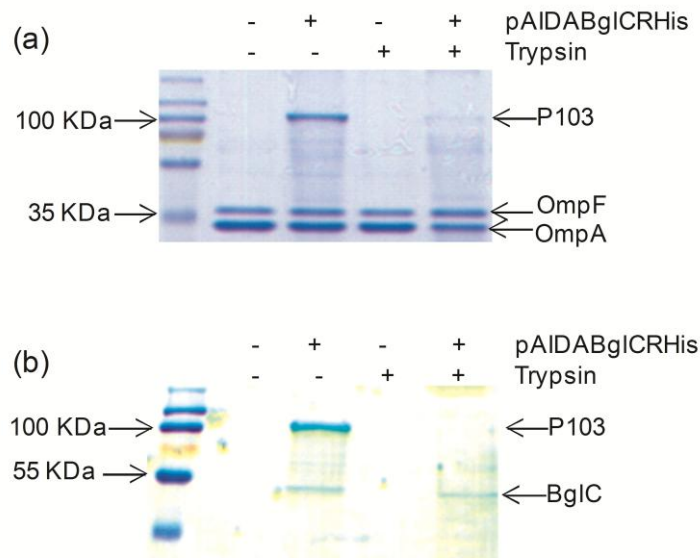


Figura 2.3 Análisis del tratamiento con tripsina de *E. coli* MS04 transformada con pAIDABglCRHis. (A) SDS-PAGE y (B) Western-blot que muestran la accesibilidad de BglC anclada en la membrana externa a la tripsina. P103 es el producto de la expresión del plásmido pAIDABglCRHis y representa la suma de la UT de AIDA-I más BglC. El plásmido pTrc99A fue utilizado como control negativo. El símbolo *menos* en la línea de pAIDABglCRHis, representa proteínas de cultivos realizados con MS04/pTrc99A.

La proteína OmpA tiene un sitio susceptible a la hidrólisis por tripsina expuesto en el periplasma. Este sitio puede utilizarse para evaluar la integridad de la membrana externa durante el despliegue de proteínas (70, 82). Si la membrana externa se daña por el anclaje de una proteína, la tripsina puede penetrar al periplasma e hidrolizar OmpA. Una comparación de las PME purificadas después del tratamiento con tripsina (Figura 2.3A) no revela ningún cambio en OmpA, lo que prueba que el despliegue de BglC no afectó la integridad del recubrimiento celular.

Fermentación de celobiosa con *E. coli* MS04 que expresa el sistema AIDA-BglC

Para probar que BglC anclada en MS04 es funcional, y que la introducción de la etiqueta de histidinas no afecta sus propiedades enzimáticas, se realizaron fermentaciones con celobiosa (40 g/L) como única fuente de carbono. Los cultivos se llevaron a cabo en mini-fermentadores tipo "Fleaker" (6), con 200 mL de medio mineral AM1 (81), sin aireación, a pH 7, 37°C y a 150 rpm. El pH se mantuvo constante mediante la adición automática de KOH 2 N. Los inóculos se prepararon con celobiosa a 20 g/L. La inducción del sistema de secreción se realizó desde el tiempo cero con 10 μ M de IPTG, tanto en los inóculos como en las cinéticas.

La Figura 2.4A muestra el crecimiento celular, el consumo de celobiosa y la producción de etanol durante las fermentaciones con MS04/pAIDABglC o con MS04/pAIDABglCRHis. La velocidad específica de crecimiento específica (μ), el rendimiento de etanol y la biomasa máxima alcanzada se muestran en la Tabla 2.2. Como se puede observar en la Figura 2.4A, *E. coli* MS04 transformada con cualquiera de los plásmidos mostró cinéticas muy parecidas, con una μ de 0.121-0.127 h⁻¹ (Tabla 2.2). Ambos cultivos alcanzaron masas celulares parecidas, consumieron la celobiosa al mismo tiempo y produjeron títulos de alcohol etílico semejantes (Figura 2.4A; Tabla 2.2). Estos resultados prueban que el sistema AIDA-I permite el despliegue de BglC en forma activa, y por lo tanto, la *E. coli* MS04/pAIDABglC o la MS04/pAIDABglCRHis pueden fermentar la celobiosa en etanol.

Figura 2.4 (A) Cinéticas de fermentación de celobiosa con MS04/pAIDABglC (símbolos vacíos) y MS04/pAIDABglCRHis (símbolos llenos). **(B)** Cinética de fermentación de una mezcla celobiosa y glucosa con MS04/pAIDABglCRHis. Cultivos realizados al menos por triplicado.

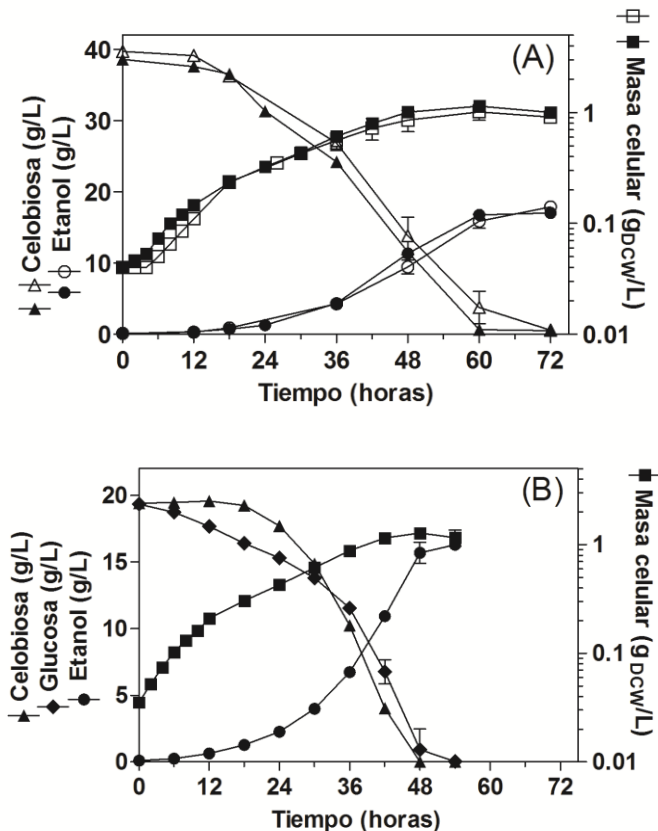


Tabla 2.2 Parámetros cinéticos y de crecimiento de *E. coli* MS04 y derivados.

Plásmido	Fuente de carbono	μ (h^{-1})	Rendimiento de etanol (% del máximo teórico)	Masa celular ¹ (g CDW/L)
Sin plásmido	Glucosa	0.306 (0.003)	93 (1.6)	1.87 (0.17)
pTrc99A2	Glucosa	0.265 (0.006)	84 (1.9)	1.47 (0.21)
pAIDABglCRHis	Glucosa	0.159 (0.012)	82 (1.4)	0.93 (0.41)
pAIDABglCRHis	Glucosa y celobiosa	0.167 (0.004)	80 (0.8)	1.28 (0.11)
pAIDABglCRHis	Celobiosa	0.121 (0.004)	81 (1.2)	1.14 (0.02)
pAIDABglC	Celobiosa	0.127 (0.011)	84 (1.8)	1.02 (0.16)

Los valores en paréntesis indican desviación estándar de resultados realizados al menos por triplicado.

¹Masa celular obtenida al inicio de la fase estacionaria.

El primer intento para producir etanol a partir de celobiosa empleando una cepa de *E. coli* etanológica (*E. coli* KO11) lo realizaron Moniruzzaman *et al.* en 1997 (89). Por medio de la expresión del operón *casAB* (sistema PTS que codifica para una Enzima $\Pi^{\text{celobiosa}}$ y una fosfo- β -glucosidasa) en un plásmido, la cepa *E. coli* KO11 fermentó 90 g/L de celobiosa y alcanzó 45.5 g/L de etanol con un rendimiento mayor al 94% (89). Aunque en el presente estudio se obtuvo un rendimiento del 84% al fermentar celobiosa (Tabla 2.2), se utilizó un medio mineral sencillo en lugar de un medio rico (LB) como el empleado por Moniruzzaman *et al.* (89). En nuestro trabajo elegimos utilizar medio mineral simple puesto que la utilización de medios ricos incrementa los costos de producción.

Después del reporte de Moniruzzaman *et al.* (89), pasaron 14 años para que aparecieran nuevas publicaciones con estrategias para lograr que *E. coli* metabolizara celobiosa. En el año 2011, Vinuselvi y Lee (135) introdujeron un promotor constitutivo en los operones crípticos *chb* y *asc* de *E. coli* MG1655 y la cepa se adaptó al crecimiento en celobiosa. La nueva cepa, CP12CHBASC30, fue capaz de crecer en condiciones aeróbicas utilizando celobiosa (4 g/L) en medio mineral, consumiendo 3 g/L y alcanzando una DO_{600} de 1.7 en 24 h. En el mismo año, Tanaka *et al.* (129) mostró el potencial de la β -glucosidasa BglC de *T. fusca* para metabolizar celobiosa en *E. coli*. La β -glucosidasa se desplegó en la superficie de la cepa JCM20137 utilizando la lipoproteína de membrana externa Blc como ancla, permitiendo que las células crecieran en medio mineral con celobiosa (2 g/L) en condiciones aeróbicas alcanzando una DO_{600} de 1 en 20 h.

Los resultados del presente estudio se publicaron en 2012, y a diferencia de los reportes de Vinuselvi y Lee (135) y Tanaka *et al.* (129), donde sólo lograron el crecimiento de *E. coli* en celobiosa, en nuestro trabajo se logró la fermentación de 40 g/L de celobiosa en etanol utilizando una cepa que fue previamente diseñada por IVM para la producción de etanol como único producto (34). En nuestro conocimiento, éste es el primer reporte que muestra la fermentación de celobiosa a etanol en medio mineral simple utilizando una cepa etanológica de *E. coli*. Además, este estudio demuestra que BglC es compatible con las condiciones de crecimiento de *E. coli*, al igual que lo reportado por Tanaka *et al.* (129), y se muestra el gran potencial del SSTV (AIDA-I) como herramienta para la secreción de despolimerasas en el área de la producción de biocombustibles lignocelulósicos.

Es importante mencionar que prácticamente al mismo tiempo que se publicaron los resultados del presente trabajo, se publicó el trabajo de Soma *et al.* (123) donde producen isopropanol (4 g/L) a partir de celobiosa (48 g/L) en un medio mineral con extracto de levadura utilizando una cepa de *E. coli* diseñada por IVM. Para hidrolizar la celobiosa, Soma *et al.* (123) utilizaron la construcción desarrollada por Tanaka *et al.* (129), desplegando en la superficie de *E. coli* la β -glucosidasa BglC de *T. fusca* con la lipoproteína de membrana externa Blc.

Co-fermentación de celobiosa y glucosa con *E. coli* MS04 que expresa el sistema AIDA-BglC

Es bien conocido que las β -glucosidasa comerciales, incluyendo las ampliamente utilizadas de *A. niger*, se inhiben fuertemente por glucosa (3). Sin embargo, la β -glucosidasa BglC de *T. fusca* no presenta inhibición por glucosa (126) por lo que se puede utilizar, por ejemplo, en procesos de pre-sacarificación y de la subsecuente SFS; es decir, la glucosa liberada durante la etapa de presacarificación no inhibirá a BglC anclada en MS04, permitiendo la hidrólisis de la celobiosa liberada por las celulasas durante la SFS y eliminando la inhibición por celobiosa a las celulasas. Para estudiar el desempeño de BglC anclada utilizando una mezcla de celobiosa y glucosa, se realizaron fermentaciones con 20 g/L de cada carbohidrato.

El crecimiento celular de MS04/pAIDABglCRHis, el consumo de celobiosa y de glucosa, y la producción de etanol durante la fermentación de la mezcla de azúcares se muestran en la Figura 2.4B. Se puede observar que BglC hidroliza la celobiosa y permite la co-fermentación de ambos azúcares en 48 h. Aunque la glucosa se consumió de forma preferente durante las primeras 18 h, posteriormente, la velocidad de consumo de celobiosa se incrementó superando la de la glucosa. Este fenómeno puede deberse a que se alcanzó una masa celular con actividad β -glucosidasa suficiente para que la hidrólisis de celobiosa se acelerara. La μ , el rendimiento de etanol y la máxima biomasa alcanzada se muestra en la Tabla 2.2. Las células MS04/pAIDABglCRHis creciendo en la mezcla de azúcares se terminaron ambas fuentes de carbono 12 h antes que las células creciendo en celobiosa (Figura 2.4) y mostraron una μ 40% mayor debido a la presencia de glucosa en la mezcla.

Estudio de la carga metabólica por plásmido

La síntesis y mantenimiento de un plásmido en ocasiones impone una carga metabólica a las células (80). Para verificar si la introducción de la construcción para la secreción de BglC estaba afectando el crecimiento de MS04, se realizaron fermentaciones en glucosa (40 g/L) sin plásmido, con el plásmido vacío (pTrc99A2) o con pAIDABglCRHis. Con los datos del cultivo de MS04/pAIDABglCRHis en celobiososa como comparación, la Figura 2.5 muestra el crecimiento celular, el consumo de la fuente de carbono y la producción de etanol durante la fermentación. La Tabla 2.2 muestra la μ , el rendimiento de etanol y la máxima masa celular alcanzada durante los cultivos.

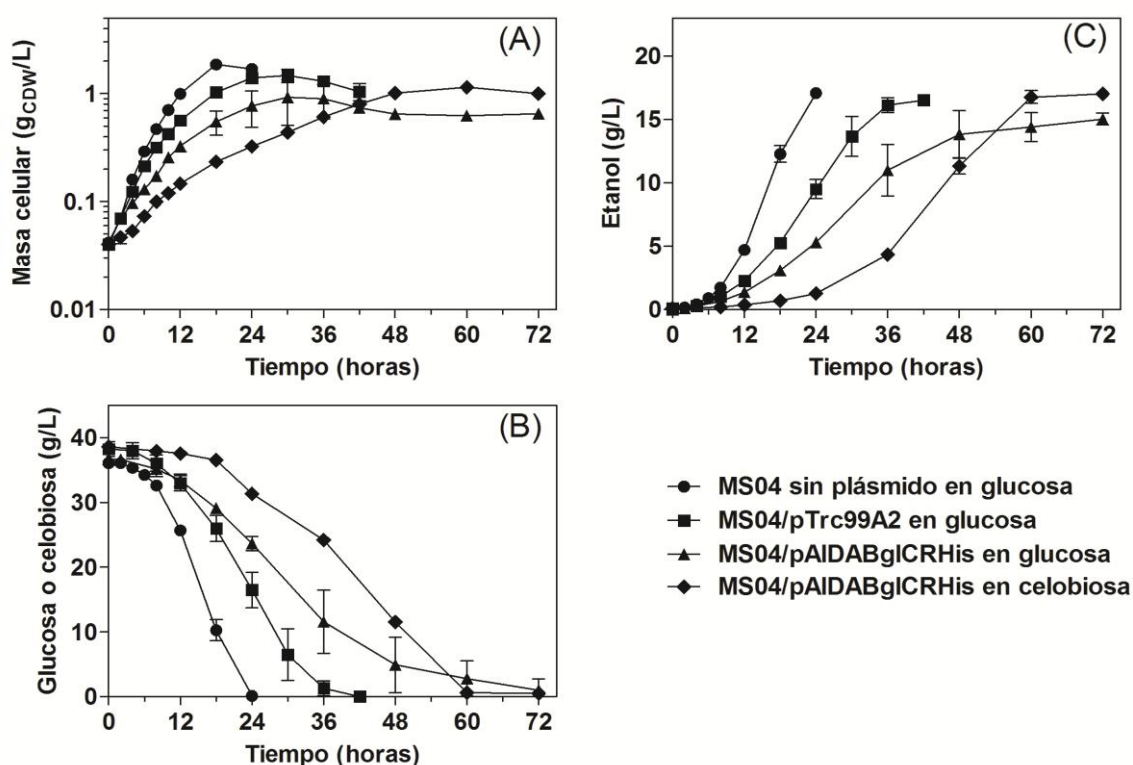


Figura 2.5 Cinética de fermentación de glucosa con MS04 transformada con el plásmido pTrc99A2, pAIDABglCRHis o sin plásmido. (A) Formación de masa celular, (B) consumo de la fuente de carbono y (C) producción de etanol. Los datos del cultivo de MS04/pAIDABglCRHis en celobiososa se incluyeron por comparación. Cultivos realizados al menos por triplicado.

Como se esperaba, las células sin plásmido presentaron el mejor desempeño mostrando la mayor μ (0.3 h^{-1} , Tabla 2.2), la mayor velocidad de consumo de fuente de carbono (acabándose la glucosa en 24 h, Figura 2.5B) y el mejor rendimiento de producción de etanol (93% respecto al máximo teórico, Tabla 2.2). Las células transformadas con el plásmido pTrc99A tuvieron una reducción de su μ y rendimiento del 13 y 10%, respectivamente, y requirieron 18 horas más para acabarse la glucosa al compararse con MS04 sin plásmido (Tabla 2.2, Figura 2.5B). Para el caso de las células transformadas con pAIDABglCRHis en glucosa o celobiosa, necesitaron 2 días más para consumir su fuente de carbono al compararse con MS04 sin plásmido, y al igual que MS04/pTrc99A2, tuvieron rendimientos menores al 85% (Tabla 2.2). Estos datos muestran que el decremento en la μ y el rendimiento observados con las células que expresan el sistema AIDA-BglC, no se puede adjudicar totalmente a la expresión y actividad de BglC, sino también a la carga metabólica que impone la presencia de plásmido como ya ha sido reportado. Por ejemplo, Martínez *et al.* (80) observaron que la adición del plásmido pUC19 a la cepa etanológica *E. coli* LY01 redujo su velocidad de crecimiento y disminuyó su rendimiento en un 50% respecto a la cepa sin plásmido.

Medición de la actividad de BglC anclada en la superficie de MS04

La actividad de BglC anclada en las células se midió durante las fermentaciones de MS04 transformada con pAIDABglC o pAIDABglCRHis. Las células se cosecharon cuando alcanzaron una DO_{600} de 1 ($0.37 \text{ g}_{\text{CDW}}/\text{l}$) y su actividad se midió utilizando *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido ("*p*-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside", pNPG, Sigma) y celobiosa como sustrato. Los parámetros cinéticos obtenidos se muestran en la Tabla 2.3. Las células transformadas con cualquiera de los plásmidos no mostraron diferencias significativas en la actividad de BglC, y en ambos casos, la actividad celobiasa fue tres veces mayor que la actividad pNPGasa. Este resultado corroboró que la inserción de la etiqueta de histidinas no redujo la actividad de BglC. Aunque las células creciendo en glucosa no se indujeron, mostraron actividad pNPGasa ya que el sistema AIDA-BglC está bajo el control del promotor fuerte *trc* que tiene expresión basal de transcripción (1).

Tabla 2.3 Actividad de BglC anclada durante el crecimiento celular en condiciones de fermentación.

Plásmido	MS04 creciendo en	Actividad pNPGasa (U / g _{CDW})	Actividad celobiasa (U / g _{CDW})
pAIDABglCRHis	Glucosa	4.6 (0.4)	ND ¹
pAIDABglCRHis	Celobiosa	42.4 (3.3)	171 (17)
pAIDABglC	Celobiosa	47.9 (2.2)	173 (6.3)

Los valores en paréntesis indican desviaciones estándar de experimentos realizados al menos por triplicado.

¹ND, no determinado.

Un punto importante a mencionar es que la cepa *E. coli* MS04 posee la proteasa de membrana externa OmpT. Está reportado que esta proteasa tiene efectos negativos durante el despliegue de proteínas a través del sistema AIDA-I, ya que corta las proteínas expuestas en la superficie (82). El conector de la UT del sistema AIDA-I posee un sitio de corte susceptible a OmpT (Figura 2.2) (82). En nuestro caso, la presencia de OmpT no interfirió con el despliegue de BglC, ya que BglC proveyó la suficiente actividad para permitir el crecimiento de *E. coli* MS04 en celobiosa.

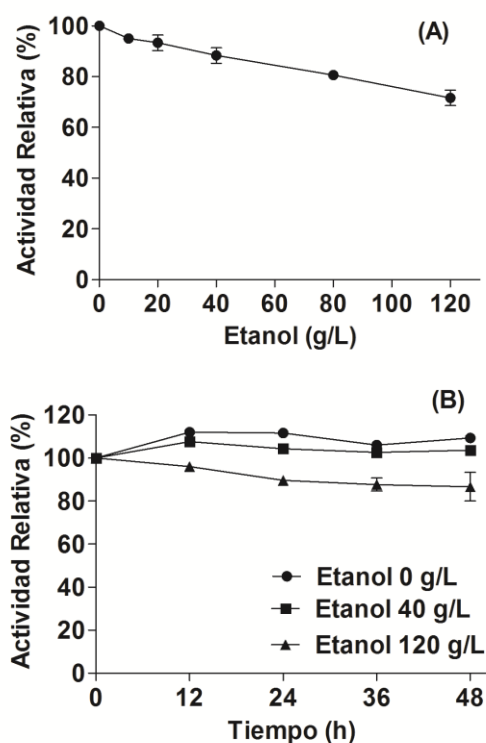
Efecto del etanol sobre la estabilidad de BglC anclada en la superficie de MS04

Las hidrolasas que se pretenden utilizar en el BPC o en SFS deben tolerar la presencia de etanol y otros inhibidores. Por esta razón, como una primera aproximación, se estudió el desempeño de BglC anclada en presencia de etanol. Aunque en el presente estudio MS04 produjo menos de 20 g/L de etanol, se decidió evaluar la estabilidad e inhibición de BglC anclada a concentraciones de hasta 120 g/L. La cepa MS04/pAIDABglCRHis se creció y se indujo en un matraz con medio LB. Para medir la inhibición, las células se lavaron y se midió su actividad celobiasa en presencia de diferentes concentraciones de alcohol etílico. En la Figura 2.6A se muestra la gráfica del barrido de etanol contra la actividad, en la que los valores se normalizaron tomando la actividad sin etanol como 100%. Como se observa, la actividad relativa decae lentamente de forma lineal a medida que se incrementa la concentración de etanol. A diferencia del experimento realizado con la enzima soluble (Figura 2.1A), BglC anclada no presenta activación entre los 10 y 20 g/L de etanol, ya que

posiblemente, la inmovilización modificó sus propiedades catalíticas. La modificación de las propiedades catalíticas es un fenómeno común durante la inmovilización enzimática y que ya ha sido observado durante la inmovilización de β -glucosidasas de *A. niger* (17, 130).

Para medir la estabilidad de BglC, las células se incubaron a 37°C con diferentes concentraciones de etanol, y la actividad residual se midió utilizando pNPG como sustrato. En la Figura 2.6B se muestra la gráfica del tiempo contra la actividad, tomando el tiempo cero como 100%. Se puede observar que BglC fue estable en la presencia de 40 g/L de alcohol durante dos días de incubación, y aún en presencia de 120 g/L del solvente. Estos datos son consistentes con los resultados obtenidos durante las fermentaciones, ya que la actividad y estabilidad de BglC se deben mantener para hidrolizar la celobiosa durante el cultivo.

Figura 2.6 Efecto del etanol a diferentes concentraciones sobre la (A) actividad y (B) estabilidad de BglC anclada en la membrana externa de MS04/pAIDABglCRHis.



Conclusión

El SSTVa (AIDA-I) permitió la secreción de la β -glucosidasa BglC de *T. fusca* en *E. coli* MS04, lográndose la fermentación en medio mineral de celobiosa en etanol sin la adición de β -glucosidasas comerciales. Además, el sistema AIDA-I ancló a BglC sin afectar la

integridad de la membrana externa. Este trabajo representa un acercamiento al BPC. Finalmente, la expresión de BglC permitió realizar fermentaciones con una mezcla de glucosa y celobiosa, lo que mostró su potencial para procesos de pre-sacarificación y subsecuente SFS.

CAPÍTULO 3

DESPLIEGUE DE LA β -glucosidasa BglC DE *T. fusca* EN LA SUPERFICIE DE LA CEPA ETANOLOGÉNICA *E. coli* MS04 UTILIZANDO EL SISTEMA Ag43

Introducción

El sistema de secreción más distribuido dentro de las bacterias Gram negativas es el de las proteínas autotransportadoras (9). Y aunque las proteínas autotransportadoras son muy parecidas en su organización y en la estructura de sus UT (Figura 7), sus proteínas pasajeras son muy heterogéneas en sus funciones específicas, puesto que incluyen proteínas pasajeras con función de adhesina (7, 45), de proteasa (15, 66), de lipasa (137), de toxina (96), de resistencia al serum (99), etc. Por lo tanto, su capacidad para secretar alguna proteína heteróloga puede variar, dependiendo de las características de la proteína autotransportadora. Por ejemplo, está reportado que el sistema AIDA-I es incapaz de secretar proteínas que forman puentes disulfuro en el periplasma (82), mientras que el sistema Ag43 (Antígeno 43) si lo puede hacer (111). También, se sabe que el anclaje de proteínas en la membrana externa se puede afectar por la presencia de la proteasa OmpT cuando se utiliza el sistema AIDA-I (82), mientras que OmpT no tiene efectos negativos cuando se utiliza el sistema Ag43 (111). Por lo tanto, resulta interesante estudiar el despliegue de BglC con otras proteínas autotransportadoras como Ag43.

Otro punto importante para estudiar a Ag43, es que a diferencia de la mayoría de las proteínas autotransportadoras que son factores de virulencia presentes en cepas patógenas, Ag43 se distribuye ampliamente en cepas patógenas y en no patógenas de *E. coli*, incluyendo la cepa *E. coli* MG1655 (138).

Objetivo General

Anclar a BglC en la superficie de la cepa etanológica *E. coli* MS04 utilizando el sistema Ag43 para hidrolizar y fermentar celobiosa a etanol.

Objetivos Particulares

1. Construir un plásmido con un sitio de clonación múltiple entre el PS y la UT de Ag43.
2. Construir el sistema de secreción Ag43-BglC.
3. Transformar la cepa MS04 etanológica con el sistema Ag43-BglC y demostrar el anclaje de BglC en la superficie celular.
4. Caracterizar cinéticamente la cepa MS04 expresando el sistema Ag43-BglC en medio mineral y utilizando celobiosa como única fuente de carbono.

Materiales y Métodos

Biología Molecular

Todas las manipulaciones genéticas realizadas por kits se ajustaron a los protocolos indicados por el proveedor. Para la propagación de plásmido se utilizó la cepa *E. coli* DH5 α (F $^-$ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK $^-$, mK $^+$) *phoA supE44* λ^- *thi-1 gyrA96 relA1*) (Invitrogen). Las reacciones en cadena de la polimerasa ("polymerase chain reaction", PCR) se llevaron a cabo con la enzima "Elongase Enzyme Mix" (Invitrogen). A las reacciones de PCR que involucraban al gen *bglC* de *T. fusca* se les adicionó dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final del 10% (v/v), debido al alto porcentaje de GCs (68%) que posee su secuencia (126). Los oligonucleótidos utilizados en el presente capítulo se enlistan en las Tablas 3.1.

Los productos de PCR se purificaron con el kit "PureLink PCR Purification Kit" (Invitrogen). Las ligaciones se realizaron con el kit "Rapid DNA Ligation Kit" (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Los plásmidos se purificaron utilizando el protocolo de lisis alcalina (116) o con el kit "PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit" (Invitrogen). Las construcciones se verificaron por patrones de restricción y por secuenciación. Las reacciones de secuenciación se realizaron con el secuenciador

automático “Perkin Elmer/Applied Biosystems 3730” de la Unidad de Secuenciación Automática de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos).

Tabla 3.1 Lista de oligonucleótidos empleados para la construcción del sistema Ag43-BglC.

Nombre	Secuencia
DfluNde	<i>NdeI</i> 5' CTA AGG AAA AGC <u>ATA TGA</u> AAC GAC ATC TG 3'
RfluHind	<i>HindIII</i> 5' CAG AGA GGC <u>GAA GCT TCT</u> GTC AGA AGG TC 3'
DfluKXB	<i>KpnI</i> <i>XhoI</i> <i>BamHI</i> 5' GAC <u>CGG TAC CCT CGA GCT</u> GAA <u>CGG ATC CAT</u> TGA CCC CAC G 3'
RfluBNE	<i>EcoRI</i> <i>NcoI</i> <i>BglII</i> 5' CGG <u>TGA ATT CCG CCA TGG</u> <u>CAG ATC</u> TGT CAG CAG CCA GCA CCG GGA G 3'

Construcción del sistema de secreción Ag43-BglC

El gen *flu* que codifica para la proteína Ag43 se amplificó a partir de ADN cromosomal de la cepa silvestre *E. coli* MG1655 (ATCC 47076) utilizando los oligonucleótidos DfluNde y RfluHind. El producto de PCR se cortó con las enzimas de restricción NdeI y HindIII, y se clonó en el vector pET-22b(+) (Novagen) con lo que se generó el plásmido derivado pETflu. La amplificación del PS y la UT de Ag43 se realizaron utilizando pETflu como templado. El PS se amplificó con los oligonucleótidos DfluNde y RfluBNE, se digirió con NdeI y EcoRI, y se clonó en pTrc99A2. Posteriormente, la UT se amplificó con los oligonucleótidos DfluKXB y RfluHind, se digirió con KpnI y HindIII, y se clonó en el plásmido derivado, obteniéndose el plásmido pAg43pol (Figura 3.1). Finalmente, el gen *bglC* se extrajo del plásmido pAIDABglC con las enzimas BglII y SacI, se purificó en gel de agarosa y se clonó en el plásmido pAg43pol obteniéndose el vector pAg43BglC (Figura 3.2).

Figura 3.1
Esquema de la construcción del plásmido pAg43pol. PS, péptido señal; UT, unidad de translocación.

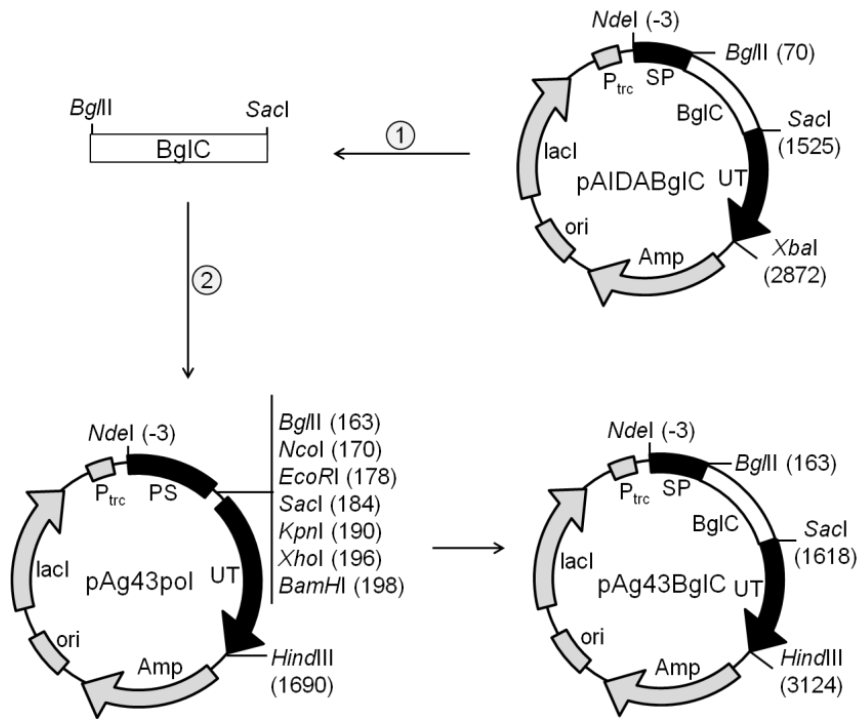
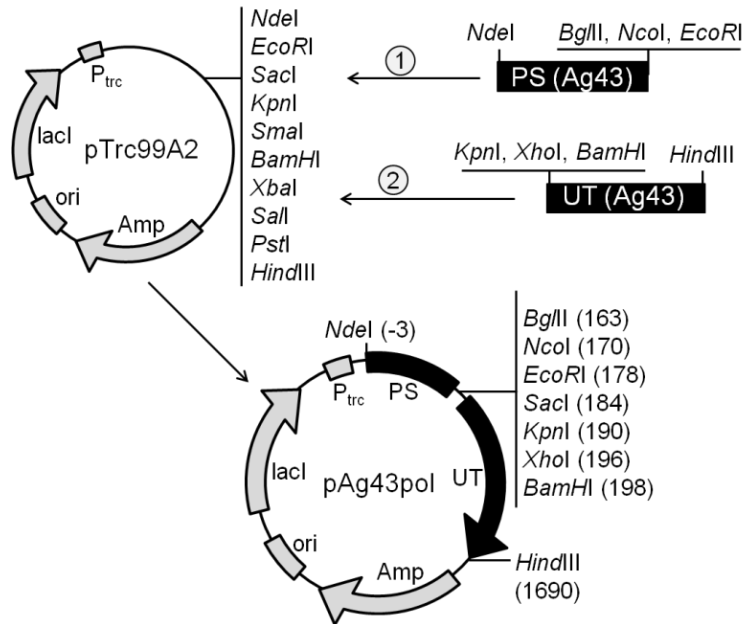


Figura 3.2
Esquema de la construcción del plásmido pAg43BglC. PS, péptido señal; BglC, β -glucosidasa de *T. fusca*; UT, unidad de translocación.

Tratamiento con tripsina de células completas y purificación de PME

El tratamiento de las células con tripsina se adaptó de Maurer *et al.* (82) y las PME se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Puente *et al.* (109). Se dejaron crecer células durante la noche en LB a 37 °C y 300 rpm. Este cultivo se utilizó para inocular 25 mL de LB, a una concentración inicial de 0.05 DO₆₀₀, dejando incubar a 37 °C y 300 rpm. Cuando las células alcanzaron 0.5 DO₆₀₀, se indujeron con 10 μM de IPTG y se dejaron crecer hasta 2.5 DO₆₀₀. A continuación, se cosecharon 4 mL del cultivo en un microtubo de 1.5 mL a temperatura ambiente (TA) y las células se lavaron 2 veces con 1 mL de amortiguador salino de fosfato ("phosphate-buffered saline", PBS) pH 7.4. Después, las células se resuspendieron en 950 μL de PBS pH 7.4 y se añadieron 50 μL de tripsina (50 mg/L, Sigma). Pasando 10 min de incubación a 37 °C, la reacción se paró lavando las células dos veces con 1 mL de PBS pH 7.4.

Para proceder a la purificación de las PME, "pellets" de células tratadas y sin tratar con tripsina se resuspendieron en 500 μL de Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.2 y se lisaron por sonicación. Los restos celulares y las bacterias intactas se removieron por centrifugación a 13,400×g durante 2 min a TA. Las membranas se recuperaron del sobrenadante por centrifugación a 13,400×g durante 30 min a 4 °C y se resuspendieron en 500 μL de Triton X-100 2%/Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.2. Después de incubar a 37 °C por 30 min, la fracción insoluble en el Triton X-100 se recuperó por centrifugación a 13,400×g durante 30 min a 4 °C. Esta fracción insoluble se lavó con 500 μL de Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.2 y se recuperó por centrifugación a 13,400×g durante 30 min a 4 °C. Finalmente, las PME se resuspendieron en 50 μL de PBS pH 7.4 para su posterior análisis electroforético en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio ("sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis", SDS-PAGE). El análisis electroforético se realizó en condiciones desnaturizantes utilizando geles al 12 % siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (69).

Condiciones de cultivo

Una alícuota de las células *E. coli* MS04 se transformaron con pAg43BglC para preparar un cultivo stock. Posteriormente, se tomó una colonia de las transformantes y se dejó crecer toda la noche a 37 °C y 300 rpm en 5 mL de LB con carbenicilina 100 mg/L. Finalmente,

las células se colocaron en criotubos de 2 mL con glicerol a una concentración final de 40 % y se almacenaron a -70 °C.

Las fermentaciones fueron tipo lote con medio mineral AM1 (81), utilizando celobiosa como única fuente de carbono (Sigma). El medio se suplementó con 0.1 g/L de ácido cítrico (J.T. Baker), 2 g/L de acetato de sodio (J.T. Baker), 100 mg/L de carbenicilina y 10 μ M de IPTG. La celobiosa se esterilizó por filtración para evitar su hidrólisis. Los cultivos se llevaron a cabo en minifermentadores tipo "Fleaker" (6) con un volumen de operación de 200 mL, sin aireación, pH 7, 37 °C y 150 rpm. El pH se mantuvo constante mediante la adición automática de KOH 2 N.

Antes de realizar las fermentaciones, las células se adaptaron al crecimiento en minifermentadores. Para lo cual, primero se tomó una muestra del cultivo stock y se creció durante toda la noche en un matraz (de un volumen de 125 mL) con 25 mL de LB con carbenicilina 100 mg/L a 37 °C y 300 rpm. Posteriormente, las células se sembraron en un minifermentador con 20 g/L de celobiosa a una DO_{600} inicial de 0.1 y se permitió que crecieran hasta alcanzar una DO_{600} de 1. Finalmente, el cultivo se almacenó a -70 °C con glicerol al 40 % (concentración final), en criotubos con alícuotas de 1.4 mL.

Para desarrollar el inóculo de las fermentaciones, se tomó un criotubo con células adaptadas a los minifermentadores y se sembró en un minifermentador con 20 g/L de celobiosa. Cuando las células alcanzaron una DO_{600} de aproximadamente 0.5, se centrifugaron a 4,000 \times g durante 10 min y se eliminó el medio gastado. Finalmente, la cinética se inició inoculando a una DO inicial de 0.1 en minifermentadores con 40 g/L de celobiosa.

Análisis

El crecimiento celular se determinó espectrofotométricamente a una DO de 600 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-70 (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA) y se convirtió a masa celular seca ("dry cell weight", DCW) por litro mediante una curva de calibración (1 DO = 0.37 g_{CDW}/L). La concentración de celobiosa se midió utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como fue descrito por Miller (88). El etanol se determinó mediante cromatografía de gas utilizando n-butanol (1 %) como estándar interno en un equipo "6859 Series GC System" (Agilent, Wilmington, DE,

USA). La concentración de la masa celular, etanol y celobiosa, se corrigieron por el cambio de volumen causado por la adición de base (KOH) durante el cultivo.

La velocidad específica de crecimiento (μ) se calculó como la pendiente de la regresión lineal del logaritmo natural de la masa celular contra el tiempo durante la fase de crecimiento exponencial. El rendimiento de etanol (g etanol/g de celobiosa) se estimó como el porcentaje del máximo teórico, tomando en cuenta que el rendimiento teórico con celobiosa es 0.54. Los cultivos se realizaron por triplicado.

Resultados y Discusión

Construcción del sistema de secreción Ag43-BglC

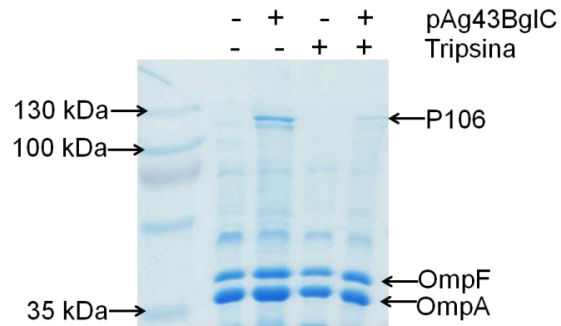
Para modular la expresión del sistema de secreción Ag43-BglC, se utilizó el plásmido pTrc99A2 (94), derivado de pTrc99A (1). Antes de construir el sistema Ag43-BglC, se diseñó el plásmido pAg43pol que tiene un sitio de clonación múltiple entre el PS y la UT, con la finalidad de tener un sistema que permitiera clonar otras proteínas de interés, además de BglC. Esto se logró adicionando sitios de restricción con los oligonucleótidos empleados para la amplificación. Durante la PCR para amplificar el PS, el oligonucleótido reverso RfluBNE (Tabla 3.2) adicionó los sitios de restricción *EcoRI*, *NcoI* y *BglIII* (Figura 3.1). Mientras que, durante la amplificación de la UT, el oligonucleótido directo DfluKXB (Tabla 3.2) adicionó los sitios de restricción *KpnI*, *XhoI* y *BamHI* (Figura 3.1). Finalmente, el plásmido pAg43BglC, que permite la secreción de BglC, se construyó clonando el gen *bglC* en pAg43pol (Figura 3.2). El peso molecular calculado para la proteína quimérica sin el PS producida durante la expresión de pAg43BglC es de 106 kDa, por lo que se nombró P106.

Demostración de que el sistema Ag43 ancla en la superficie celular a BglC

Para demostrar que el sistema Ag43 ancla en la superficie de MS04 a BglC, las células que expresan el plásmido pAg43BglC se trataron con tripsina. En la Figura 3.3 se muestran las PME purificadas de células tratadas y sin tratar con tripsina, y en donde se observa claramente como la proteína P106 desaparece después del tratamiento; así mismo se demostró que BglC está expuesta en la cara exterior de la membrana externa.

Adicionalmente, se puede observar que la intensidad de la PME OmpA no cambia después del tratamiento con tripsina, mostrando que el despliegue de BglC con Ag43 no daña la membrana externa.

Figura 3.3 Análisis del tratamiento con tripsina de *E. coli* MS04 transformada con pAg43BglC. El SDS-PAGE muestra la accesibilidad de BglC anclada en la membrana externa a la tripsina. Células MS04 transformadas con pTrc99A2 fueron utilizadas como control negativo y se muestra con el símbolo *menos* en la línea de pAg43BglC. Células que no fueron tratadas con tripsina se indican con el símbolo *menos* en la línea de tripsina. P106 es el producto de la expresión del plásmido pAg43BglC y representa la suma de la UT de Ag43 más BglC.



Fermentación de celobiosa con *E. coli* MS04 expresando el sistema Ag43-BglC

Para demostrar que BglC se despliega de forma activa, se realizaron fermentaciones en medio mineral con celobiosa (40 g/L) como única fuente de carbono. La Figura 3.4 muestra el crecimiento celular, el consumo de celobiosa y la producción de etanol durante la fermentación. La Tabla 3.2 muestra los parámetros cinéticos y de crecimiento durante la fermentación.

Figura 3.4 Cinética de fermentación con celobiosa de *E. coli* MS04 transformada con pAg43BglC.

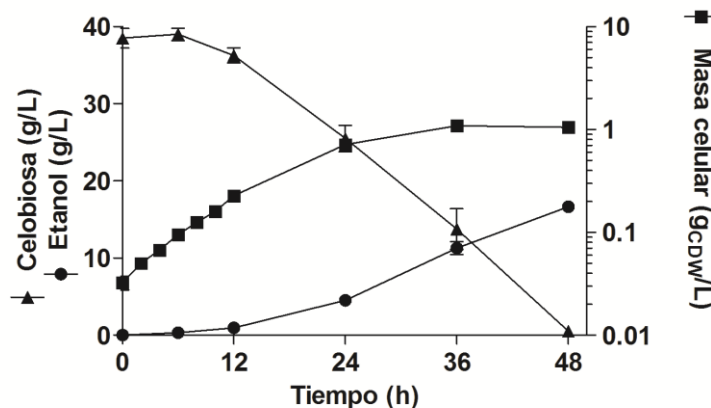


Tabla 3.2 Parámetros cinéticos y de crecimiento de *E. coli* MS04/pAg43BglC en fermentación de celobiosa.

μ (h ⁻¹)	Rendimiento de etanol (% del máximo teórico)	Masa celular ¹ (g _{CDW} /L)
0.153 (0.004)	81 (2.6)	1.1 (0.11)

Los valores en paréntesis indican la desviación estándar de tres experimentos.

¹Masa celular obtenida al inicio de la fase estacionaria.

Al comparar el crecimiento en celobiosa, se puede observar que MS04/pAg43BglC (Figura 3.4) agotó la fuente de carbono 12 y 24 horas antes que MS04/pAIDABglCRHis y MS04/pAIDABglC respectivamente (Figura 2.4). Además, MS04/pAg43BglC tuvo una μ (Tabla 3.2) en celobiosa 26 y 21 % mayor que MS04/pAIDABglCRHis y MS04/pAIDABglC respectivamente (Tabla 2.2). El rendimiento y la máxima masa celular alcanzada (Tabla 2.2) son semejantes a los obtenidos con MS04/pAIDABglC y MS04/pAIDABglCRHis (Tabla 3.2).

Conclusión

El sistema Ag43BglC permite un mejor desempeño de MS04 durante su crecimiento en celobiosa. Además, el despliegue de BglC con Ag43 mantiene la integridad de la membrana externa.

CAPÍTULO 4

SECRECIÓN DE LA β -glucosidasa BglC DE *T. fusca* AL MEDIO EXTERIOR DE LA CEPA ETANOLOGÉNICA *E. coli* MS04 UTILIZANDO EL SISTEMA EspP

Introducción

La proteína autotransportadora EspP ("extracellular serine protease, plasmid-encoded") secreta una serín proteasa en la cepa patógena *E. coli* EHEC O157:H7 (133). A diferencia de los sistemas AIDA-I y Ag43, cuyas proteínas pasajeras permanecen unidas a la membrana externa por interacciones no covalentes después del proceso de translocación (16, 21), la serín proteasa de EspP se procesa y se libera al medio exterior (26). El proceso de translocación de EspP es uno de los más estudiados (55, 56, 107), y se tiene definido con mucha precisión el tamaño necesario del conector para secretar la proteína pasajera al medio (133). Al igual que Ag43, EspP tiene la capacidad para secretar proteínas que forman puentes disulfuro (122). Con el objetivo de estudiar la secreción de BglC al medio de cultivo utilizando el SSTVa, se utilizó EspP como modelo.

Objetivo General

Secretar a BglC al exterior de la cepa etanologénica *E. coli* MS04 utilizando el sistema EspP para hidrolizar y fermentar celobiosa a etanol.

Objetivos Particulares

1. Construir un plásmido con un sitio de clonación múltiple entre el PS y la UT de EspP43.

2. Construir el sistema de secreción EspP-BglC.
3. Transformar la cepa MS04 etanológica con el sistema EspP-BglC y demostrar la secreción de BglC al medio exterior.
4. Caracterizar cinéticamente la cepa MS04 expresando el sistema EspP-BglC en medio mineral y utilizando celobiosa como única fuente de carbono.

Materiales y Métodos

Biología Molecular

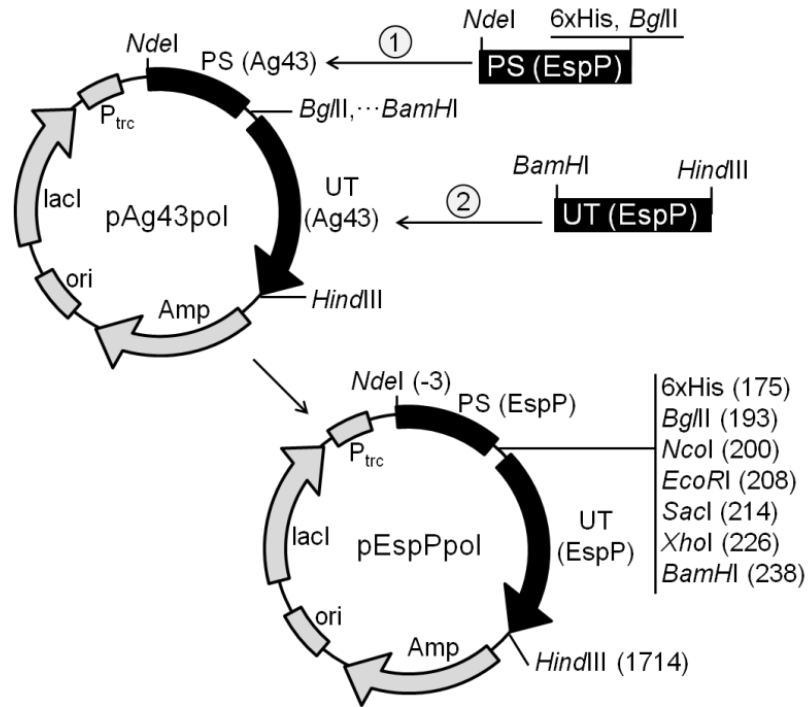
Todas las manipulaciones genéticas se realizaron de la misma forma descrita en el Capítulo 3, con la diferencia de que la amplificación del gen *espP* requirió utilizar la enzima “Long PCR Enzyme Mix” (Fermentas). Los oligonucleótidos utilizados en el presente capítulo se enlistan en las Tablas 4.1. El gen *espP* se amplificó utilizando DNA genómico de la cepa *E. coli* EHEC O157:H7 (donado por el Dr. José Luis Puente del Instituto de Biotecnología, UNAM) utilizando los oligonucleótidos DespPNde y RespPHind. El producto de PCR se clonó en un vector pCR2.1-TOPO utilizando el kit de clonación “TOPO TA Cloning Kit” (Invitrogen) obteniéndose el plásmido pTOPOEspP. La amplificación del PS y la UT del gen *espP* se llevaron a cabo utilizando el plásmido pTOPOEspP como templado. El PS se amplificó utilizando los oligonucleótidos DespPNde y RPSEspP; y la UT se amplificó con los oligonucleótidos DBetaEspP y RespPHind.

Después de la amplificación por PCR, la secuencia de la UT de EspP y el plásmido pAg43pol (Figura 3.1) se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. El plásmido digerido se purificó en gel de agarosa para remover la secuencia de la UT endógena y clonar la UT de EspP. A continuación, el plásmido derivado y la secuencia del PS de EspP se digirieron con NdeI y BglII. El plásmido resultante se purificó en gel de agarosa para remover la secuencia de su PS nativo y la secuencia del PS de EspP se clonó y se obtuvo el plásmido pEspPpol (Figura 4.1). Finalmente, el gen *bglC* se removió del plásmido pAIDABglC (Figura 2.2) con BglII y SacI, y se clonó en pEspPpol obteniéndose el plásmido pEspPBglC (Figura 4.2).

Tabla 4.1 Lista de oligonucleótidos empleados para la construcción del sistema EspP-BglC.

Nombre	Secuencia
DespPNde	5' CCA ATG TTT CCC TTA AAA ATG GAG CTC <u>ATA TGA</u> A 3' <i>NdeI</i>
RPSEspP	5' GTC <u>AGA TCT</u> <i>BglII</i> <u>GTG GTG GTG GTG</u> <i>6xHis</i> <u>ATG</u> CAT CTG TGA CGC AAA AGA ATA TG 3'
DBetaEspP	5' TCC <u>GGA TCC</u> <i>BamHI</i> CTG GTG CCA CGC GGT AGC GAC CTC TCG CAG TTG TCT GAC 3'
RespPHind	5' GCA GGC <u>AAG CTT</u> <i>HindIII</i> GAA TAC GGA GTA TCA GAA CGA 3'

Figura 4.1
Esquema de la construcción del plásmido pEspPpol. PS, péptido señal; UT, unidad de translocación.



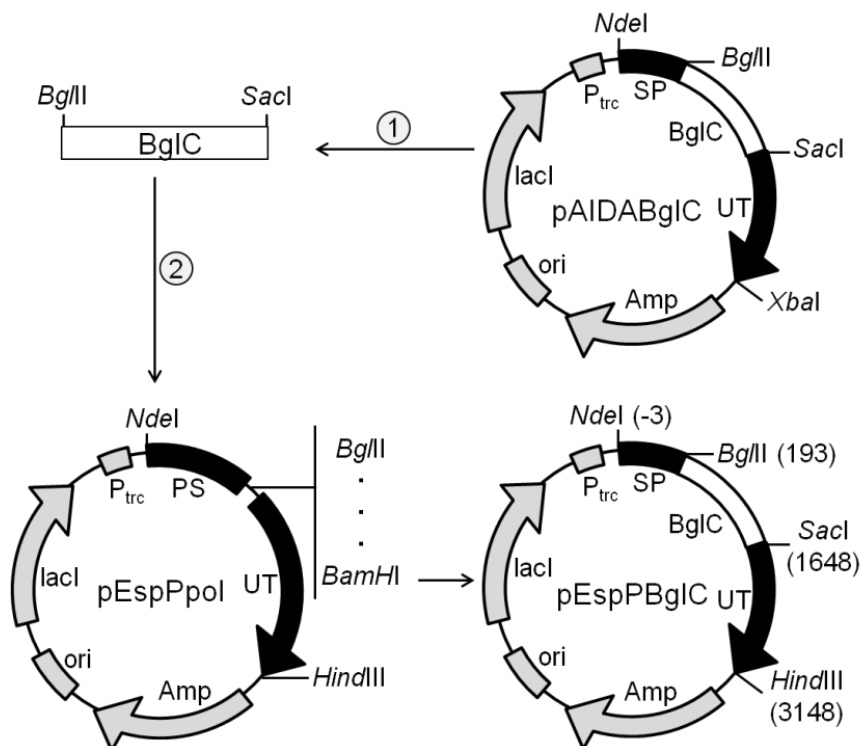


Figura 4.2
Esquema de la construcción del plásmido pEspPBglC. PS, péptido señal; BglC, β -glucosidasa de *T. fusca*; UT, unidad de translocación.

Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron de la misma forma descrita en el Capítulo 3 con algunos cambios que se describen a continuación. Las células se adaptaron al crecimiento en minifermentadores utilizando glucosa como fuente de carbono. Los inóculos de las fermentaciones se desarrollaron con 20 g/L de glucosa. Cuando las células alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 0.5, se inocularon 40 mL del cultivo directamente en 160 mL de medio AM1 con celobiosa como fuente de carbono. Los cultivos se realizaron por duplicado.

Resultados y Discusión

Construcción del sistema de secreción EspP-BglC

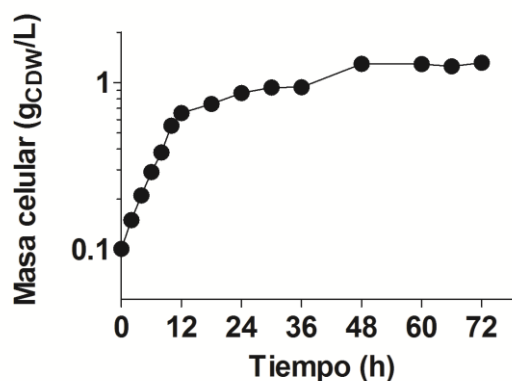
Antes de realizar la construcción del sistema EspP-BglC, se decidió construir un plásmido que tuviera un sitio de clonación múltiple entre el PS y la UT. Utilizando el plásmido pAg43pol como molde, el PS y la UT endógenos se sustituyeron por el PS y la UT de EspP

obteniéndose el plásmido pEspPpol (Figura 4.1). Finalmente, el gen *bglC* de *T. fusca* se clonó en pEspPpol obteniéndose el plásmido pEspPBglC. Durante la amplificación del PS de EspP, el oligonucleótido reverso RPSEspP introdujo una etiqueta de histidinas (Figura 4.1), con la finalidad de detectar la proteína pasajera por "Western-blot". Además, la etiqueta se puede utilizar para purificar la proteína secretada al medio utilizando una columna de níquel.

Cultivo en celobiosa de *E. coli* MS04 que expresa el sistema EspP-BglC

Debido a que el sistema EspP-BglC secreta la enzima al medio de cultivo, la inoculación se realizó adicionando un volumen del inóculo, en lugar de centrifugar para eliminar el sobrenadante, como se realizó con los sistemas AIDA y Ag43 donde BglC está anclada en las células. En la Figura 4.3 se muestra la curva de crecimiento obtenida de dos cultivos en medio mineral con celobiosa como única fuente de carbono. La μ promedio fue de 0.16 h^{-1} , valor semejante al obtenido con el sistema Ag43BglC (0.15 h^{-1} , Tabla 3.3) y 25 % más alto que el obtenido con el sistema AIDA-BglC (0.12 h^{-1} , Tabla 2.2).

Figura 4.3
Cinética de fermentación con celobiosa de *E. coli* MS04 transformada con pEspPBglC. Cultivo realizado por duplicado.



Conclusión

El sistema EspP secreta de forma activa a BglC, permitiendo el crecimiento de *E. coli* MS04 en celobiosa como fuente de carbono.

CAPÍTULO 5

COMENTARIOS GENERALES Y PERSPECTIVAS

La secreción de proteínas heterólogas en *E. coli* ha sido un tema de estudio desde los inicios de la tecnología del ADN recombinante (13, 49, 117). Entre las ventajas de secretar al medio exterior una proteína heteróloga está, evitar que las proteasas presentes en la célula degraden el producto y en reducir las proteínas contaminantes para su purificación (13, 49, 51, 117). Actualmente, este tema está adquiriendo fuerza en el área de los biocombustibles, específicamente en el BPC (98). Aunque la cepa no patogénica *E. coli* K-12 y sus derivadas, empleadas ampliamente en el laboratorio y en la industria (51), no secretan proteínas al medio de cultivo (110), existen muchos mecanismos de secreción presentes en cepas patógenas que pueden trasplantarse a K-12 y derivadas para la secreción de proteínas heterólogas (13, 51, 58, 60, 86, 120). De los siete sistemas de secreción reportados para las bacterias Gram negativas (41, 50), los sistemas de secreción I, II y V se han empleado para la secreción de proteínas heterólogas en *E. coli* (60, 86). Sin embargo, los sistemas I y II tienen la limitante de tener que expresar de forma heteróloga, además de la proteína pasajera, todo el sistema de secreción (86), que puede llegar a contener hasta 15 proteínas diferentes como es el caso del SSTII (68).

La secreción de proteínas heterólogas utilizando el sistema de secreción tipo V, solamente requiere de un gen que tiene incluida la secuencia de la proteína pasajera (60). Esto nos motivó a utilizarlo como modelo de estudio en el presente proyecto, mostrando como AIDA-I, Ag43 y EspP, secretaron de forma funcional a BglC. Además, los sistemas AIDA-BglC y Ag43-BglC mantuvieron la integridad de la membrana externa. Finalmente, BglC secretada presentó la suficiente actividad para permitir la hidrólisis y la fermentación de celobiosa con *E. coli* MS04 a pH 7 y 37°C. Estos puntos son muy importantes si se quiere alcanzar el BPC con *E. coli*, ya que se requieren sistemas de secreción y enzimas que funcionen a las mismas condiciones de crecimiento de *E. coli*.

Aunque el presente proyecto se basó en la secreción de una β -glucosidasa, los sistemas desarrollados pueden ser utilizados para la secreción de otras enzimas (celulasas, xilanasas, inulinasas, pectinasas, etc.) o proteínas (insulina, anticuerpos, epítopes, etc.) de interés biotecnológico. También, los sistemas de secreción desarrollados en el presente proyecto se pueden utilizar en otras cepas de *E. coli* para la producción de otros metabolitos como lactato, succinato, butanol, etc.

Anclar enzimas en la célula tiene la ventaja de que se puede recuperar el biocatalizador para realizar subsecuentes hidrólisis y fermentaciones (43). Sin embargo, algunas enzimas necesitan liberarse al medio exterior para que realicen eficientemente su función (43). Por ejemplo, al tener un sustrato insoluble, las celulasas requieren ser liberadas para llegar a la superficie de la celulosa y adherirse con sus dominios de unión a celulosa antes de iniciar la hidrólisis (43). El sistema EspP desarrollado en el presente proyecto podría utilizarse para secretar este tipo de enzimas.

Perspectivas

1. Disminuir la carga metabólica por plásmido bajando el número de copias o integrar la(s) construcción(es) en cromosoma.
2. Buscar un promotor constitutivo con la fuerza necesaria para expresar los sistemas de secreción sin afectar el crecimiento de MS04, y de esta forma evitar el uso de IPTG.
3. Probar el sistema AIDA-BglC en una cepa MS04 *OmpT*⁻.
4. Determinar los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de la enzima anclada con Ag43 y AIDA-I, y de la enzima soluble secretada con EspP.
5. Determinar la cantidad de moléculas desplegadas por célula, tanto con Ag43 como con AIDA-I.
6. Realizar fermentaciones de Avicel (celulosa cristalina) con MS04 secretando la β -glucosidasa BglC, y suplementando con endo y exo-celulasas.
7. Probar la secreción de otras celulasas. Incluso, secretar otro tipo de enzimas sacarolíticas de importancia en biorefinerías como xilanasas, amilasas e inulinasas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amann E, Ochs B, and Abel KJ. 1988. Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69(2):301–315.
2. Amorim HV, Lopes ML, de Castro Oliveira JV, Buckeridge MS, and Goldman GH. 2011. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(5):1267–1275.
3. Andrić P, Meyer AS, Jensen PA, and Dam-Johansen K. 2010. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnology Advances* 28(3):308–324.
4. Bai FW, Anderson WA, and Moo-Young M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances* 26(1):89–105.
5. Barnard TJ, Dautin N, Lukacik P, Bernstein HD, and Buchanan SK. 2007. Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nature Structural and Molecular Biology* 14(12):1214–1220.
6. Beall DS, Ohta K, and Ingram LO. 1991. Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 38(3):296–303.
7. Benz I and Schmidt MA. 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 57(5):1506–1511.
8. Benz I and Schmidt MA. 1992. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Molecular Microbiology* 6(11):1539–1546.
9. Benz I and Schmidt MA. 2011. Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 301(6):461–468.
10. Berlin A, Maximenko V, Gilkes N, and Saddler J. 2007. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 97(2):287–296.

11. Berlin A, Muñoz C, Gilkes N, Alamouti SM, Chung P, Kang K-Y, Maximenko V, et al. 2007. An evaluation of British Columbian beetle-killed hybrid spruce for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 137-140(1-12):267–280.
12. Berthiaume F, Rutherford N, and Mourez M. 2007. Mutations affecting the biogenesis of the AIDA-I autotransporter. *Research in Microbiology* 158(4):348–354.
13. Blight M a and Holland IB. 1994. Heterologous protein secretion and the versatile *Escherichia coli* haemolysin translocator. *Trends in Biotechnology* 12(11):450–455.
14. van Bloois E, Winter RT, Kolmar H, and Fraaije MW. 2011. Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* 29(2):79–86.
15. Brunder W, Schmidt H, and Karch H. 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Molecular Microbiology* 24(4):767–778.
16. Caffrey P and Owen P. 1989. Purification and N-terminal sequence of the α subunit of antigen 43, a unique protein complex associated with the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 171(7):3634–3640.
17. Calsavara LPV, De Moraes FF, and Zanin GM. 2001. Comparison of catalytic properties of free and immobilized cellobiase Novozym 188. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91-93(1):615–626.
18. Campbell CJ and Laherrère JH. 1998. The end of cheap oil. *Scientific American* 278(3):78–83.
19. Carreón Rodríguez OE, Ramos López AS, Centeno Leija S, Leal Reyes LJ, Martínez Jiménez A, and Fernández Sandoval MT. 2009. Etanol Carburante. *BioTecnología* 13(3):79–102.
20. Chandel AK and Singh O V. 2011. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of “Biofuel”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(5):1289–1303.
21. Charbonneau M-E, Berthiaume F, and Mourez M. 2006. Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). *Journal of Bacteriology* 188(24):8504–8512.
22. Charbonneau M-E, Janvore J, and Mourez M. 2009. Autoprocessing of the *Escherichia coli* AIDA-I autotransporter: a new mechanism involving acidic

- residues in the junction region. *The Journal of Biological Chemistry* 284(25):17340–17351.
23. Chen Y-P, Hwang I-E, Lin C-J, Wang H-J, and Tseng C-P. 2012. Enhancing the stability of xylanase from *Cellulomonas fimi* by cell-surface display on *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* 112(3):455–463.
 24. Clomburg JM and Gonzalez R. 2010. Biofuel production in *Escherichia coli*: the role of metabolic engineering and synthetic biology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(2):419–434.
 25. Daroit DJ, Simonetti A, Hertz PF, and Brandelli A. 2008. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(5):933–941.
 26. Dautin N and Bernstein HD. 2007. Protein secretion in Gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annual Review of Microbiology* 61:89–112.
 27. Davis SC, Dohleman FG, and Long SP. 2011. The global potential for Agave as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy* 3(1):68–78.
 28. Du J, Shao Z, and Zhao H. 2011. Engineering microbial factories for synthesis of value-added products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38(8):873–890.
 29. Edwards MC and Doran-Peterson J. 2012. Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95(3):565–575.
 30. Edwards MC, Henriksen ED, Yomano LP, Gardner BC, Sharma LN, Ingram LO, and Doran Peterson J. 2011. Addition of genes for cellobiase and pectinolytic activity in *Escherichia coli* for fuel ethanol production from pectin-rich lignocellulosic biomass. *Applied and Environmental Microbiology* 77(15):5184–5191.
 31. Egile C, d’Hauteville H, Parsot C, and Sansonetti PJ. 1997. SopA, the outer membrane protease responsible for polar localization of IcsA in *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology* 23(5):1063–1073.
 32. Van Eylen D, Van Dongen F, Kabel M, and De Bont J. 2011. Corn fiber, cobs and stover: enzyme-aided saccharification and co-fermentation after dilute acid pretreatment. *Bioresource Technology* 102(10):5995–6004.
 33. Ferchak JD and Pye EK. 1983. Effect of glucose and other sugars on the β -1,4-glucosidase activity of *Thermomonospora fusca*. *Biotechnology and Bioengineering* 25(12):2855–2864.

34. Fernández-Sandoval MT, Huerta-Beristain G, Trujillo-Martinez B, Bustos P, González V, Bolivar F, Gosset G, and Martinez A. 2012. Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanogenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96(5):1291–1300.
35. Francisco JA, Earhart CF, and Georgiou G. 1992. Transport and anchoring of β -lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(7):2713–2717.
36. Francisco JA, Stathopoulos C, Warren RAJ, Kilburn DG, and Georgiou G. 1993. Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains. *Bio/Technology* 11(4):491–495.
37. Fu C, Mielenz JR, Xiao X, Ge Y, Hamilton CY, Rodriguez M, Chen F, et al. 2011. Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(9):3803–3808.
38. Galbe M, Sassner P, Wingren A, and Zacchi G. 2007. Process engineering economics of bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 108(June):303–327.
39. Geddes CC, Mullinnix MT, Nieves IU, Peterson JJ, Hoffman RW, York SW, Yomano LP, Miller EN, Shanmugam KT, and Ingram LO. 2011. Simplified process for ethanol production from sugarcane bagasse using hydrolysate-resistant *Escherichia coli* strain MM160. *Bioresource Technology* 102(3):2702–2711.
40. Geddes CC, Nieves IU, and Ingram LO. 2011. Advances in ethanol production. *Current Opinion in Biotechnology* 22(3):312–319.
41. Gerlach RG and Hensel M. 2007. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 297(6):401–415.
42. Goldemberg J. 2008. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnology for Biofuels* 1(1):6.
43. Gomez LD, Steele-King CG, and McQueen-Mason SJ. 2008. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *The New Phytologist* 178(3):473–485.
44. Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, and Zacchi G. 2006. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology* 24(12):549–556.

45. Hasman H, Chakraborty T, and Klemm P. 1999. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *Journal of Bacteriology* 181(16):4834–4841.
46. He SY, Lindeberg M, Chatterjee AK, and Collmer A. 1991. Cloned *Erwinia chrysanthemi* *out* genes enable *Escherichia coli* to selectively secrete a diverse family of heterologous proteins to its milieu. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(3):1079–1083.
47. Henderson IR and Owen P. 1999. The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and OxyR. *Journal of Bacteriology* 181(7):2132–2141.
48. Hogsett DA, Ahn H-J, Bernardez TD, South R, and Lynd LR. 1992. Direct microbial conversion. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 34-35(1):527–541.
49. Holland IB, Kenny B, Steipe B, and Plückthun A. 1990. Secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* 182:132–143.
50. Houben ENG, Bestebroer J, Ummels R, Wilson L, Piersma SR, Jiménez CR, Ottenhoff THM, Luirink J, and Bitter W. 2012. Composition of the type VII secretion system membrane complex. *Molecular Microbiology* 86(2):472–484.
51. Huang C-J, Lin H, and Yang X. 2012. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 39(3):383–399.
52. Huerta-Beristain G, Utrilla J, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Gosset G, and Martinez A. 2008. Specific ethanol production rate in ethanologenic *Escherichia coli* strain KO11 is limited by pyruvate decarboxylase. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 15(1):55–64.
53. IEA. 2007. *CO2 Emissions from Fuel Combustion 1971-2005*. Paris. www.iea.org.
54. IEA. 2011. *CO2 Emissions from fuel combustion-Highlights*. Paris. www.iea.org.
55. Ieva R and Bernstein HD. 2009. Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(45):19120–19125.
56. Ieva R, Tian P, Peterson JH, and Bernstein HD. 2011. Sequential and spatially restricted interactions of assembly factors with an autotransporter β domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(31):E383–391.

57. Jarboe LR, Grabar TB, Yomano LP, Shanmugan KT, and Ingram LO. 2007. Development of ethanologenic bacteria. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 108:237–261.
58. Jong WSP, Saurí A, and Luirink J. 2010. Extracellular production of recombinant proteins using bacterial autotransporters. *Current Opinion in Biotechnology* 21(5):646–652.
59. Jose J, Bernhardt R, and Hannemann F. 2001. Functional display of active bovine adrenodoxin on the surface of *E. coli* by chemical incorporation of the [2Fe-2S] cluster. *ChemBioChem* 2(9):695–701.
60. Jose J, Maas RM, and Teese MG. 2012. Autodisplay of enzymes-molecular basis and perspectives. *Journal of Biotechnology* 161(2):92–103.
61. Jose J and Meyer TF. 2007. The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71(4):600–619.
62. Jose J and von Schwichow S. 2004. Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *ChemBioChem* 5(4):491–499.
63. Jung H-C, Park J-H, Park S-H, Lebeault J-M, and Pan J-G. 1998. Expression of carboxymethylcellulase on the surface of *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein. *Enzyme and Microbial Technology* 22(5):348–354.
64. Kaur J, Chadha BS, Kumar BA, Ghatora SK, and Saini HS. 2007. Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Electronic Journal of Biotechnology* 10(2).
65. Kim YS, Jung HC, and Pan JG. 2000. Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants. *Applied and Environmental Microbiology* 66(2):788–793.
66. Klauser T, Krämer J, Otselberger K, Pohlner J, and Meyer TF. 1993. Characterization of the *Neisseria* Iga β -core: the essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. *Journal of Molecular Biology* 234(3):579–593.
67. Klein-Marcuschamer D, Oleskiewicz-Popiel P, Simmons BA, and Blanch HW. 2012. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering* 109(4):1083–1087.

68. Korotkov KV., Sandkvist M, and Hol WGJ. 2012. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature reviews. Microbiology* 10(5):336–351.
69. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685.
70. Lattemann CT, Maurer J, Gerland E, and Meyer TF. 2000. Autodisplay: functional display of active β -lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *Journal of Bacteriology* 182(13):3726–3733.
71. Leyton DL, Rossiter AE, and Henderson IR. 2012. From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nature Reviews. Microbiology* 10(3):213–225.
72. Li C, Zhu Y, Benz I, Schmidt MA, Chen W, Mulchandani A, and Qiao C. 2008. Presentation of functional organophosphorus hydrolase fusions on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter pathway. *Biotechnology and Bioengineering* 99(2):485–490.
73. Li H, Foston MB, Kumar R, Samuel R, Gao X, Hu F, Ragauskas AJ, and Wyman CE. 2012. Chemical composition and characterization of cellulose for Agave as a fast-growing, drought-tolerant biofuels feedstock. *RSC Advances* 2(11):4951–4958.
74. Liu W, Zhang X-Z, Zhang Z, and Zhang Y-HP. 2010. Engineering of *Clostridium phytofermentans* Endoglucanase Cel5A for improved thermostability. *Applied and Environmental Microbiology* 76(14):4914–4917.
75. Lynd LR, van Zyl WH, McBride JE, and Laser M. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology* 16(5):577–583.
76. Lynd LR. 1996. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annual Review of Energy and the Environment* 21(1):403–465.
77. Mansfield SD, Kang K-Y, and Chapple C. 2012. Designed for deconstruction-poplar trees altered in cell wall lignification improve the efficacy of bioethanol production. *The New Phytologist* 194(1):91–101.
78. Martinez A, Rodriguez ME, Wells ML, York SW, Preston JF, and Ingram LO. 2001. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnology Progress* 17(2):287–293.
79. Martinez A, Rodriguez ME, York SW, Preston JF, and Ingram LO. 2000. Effects of Ca(OH)₂ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering* 69(5):526–536.

80. Martinez A, York SW, Yomano LP, Pineda VL, Davis FC, Shelton JC, and Ingram LO. 1999. Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdC*, *adhB*) in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 15(5):891–897.
81. Martinez A, Grabar TB, Shanmugam KT, Yomano LP, York SW, and Ingram LO. 2007. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology Letters* 29(3):397–404.
82. Maurer J, Jose J, and Meyer TF. 1997. Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 179(3):794–804.
83. Maurer J, Jose J, and Meyer TF. 1999. Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *Journal of Bacteriology* 181(22):7014–7020.
84. McBride JE, Zietsman JJ, van Zyl WH, and Lynd LR. 2005. Utilization of cellobiose by recombinant β -glucosidase-expressing strains of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evaluation of the sufficiency of expression. *Enzyme and Microbial Technology* 37(1):93–101.
85. McIntosh S, Vancov T, Palmer J, and Spain M. 2012. Ethanol production from *Eucalyptus* plantation thinnings. *Bioresource Technology* 110:264–272.
86. Mergulhão FJM, Summers DK, and Monteiro GA. 2005. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances* 23(3):177–202.
87. Merino ST and Cherry J. 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 108:95–120.
88. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3):426–428.
89. Moniruzzaman M, Lai X, York SW, and Ingram LO. 1997. Isolation and molecular characterization of high-performance cellobiose-fermenting spontaneous mutants of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 containing the *Klebsiella oxytoca casAB* operon. *Applied and Environmental Microbiology* 63(12):4633–4637.
90. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, and Ladisch M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96(6):673–686.
91. Murphy DJ and Hall CAS. 2011. Energy return on investment, peak oil, and the end of economic growth. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1219:52–72.

92. Murray J and King D. 2012. Climate policy: Oil's tipping point has passed. *Nature* 481(7382):433–435.
93. Muñoz-Gutiérrez I and Martínez A. 2012. Polysaccharide hydrolysis with engineered *Escherichia coli* for the production of bio-commodities. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (In revision).
94. Muñoz-Gutiérrez I, Oropeza R, Gosset G, and Martínez A. 2012. Cell surface display of a β -glucosidase employing the type V secretion system on ethanologenic *Escherichia coli* for the fermentation of cellobiose to ethanol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 39(8):1141–1152.
95. Narita J, Okano K, Tateno T, Tanino T, Sewaki T, Sung M-H, Fukuda H, and Kondo A. 2006. Display of active enzymes on the cell surface of *Escherichia coli* using PgsA anchor protein and their application to bioconversion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70(5):564–572.
96. Nguyen VQ, Caprioli RM, and Cover TL. 2001. Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infection and Immunity* 69(1):543–546.
97. Nhan NT, Gonzalez de Valdivia E, Gustavsson M, Hai TN, and Larsson G. 2011. Surface display of *Salmonella* epitopes in *Escherichia coli* and *Staphylococcus carnosus*. *Microbial Cell Factories* 10(1):22.
98. Ni Y and Chen R. 2009. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 31(11):1661–1670.
99. Oliver DC, Huang G, and Fernandez RC. 2003. Identification of secretion determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter. *Journal of Bacteriology* 185(2):489–495.
100. Oliver DC, Huang G, Nodel E, Pleasance S, and Fernandez RC. 2003. A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Molecular Microbiology* 47(5):1367–1383.
101. Olson DG, McBride JE, Shaw AJ, and Lynd LR. 2012. Recent progress in consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology* 23(3):396–405.
102. Orencio-Trejo M, Utrilla J, Fernández-Sandoval MT, Huerta-Beristain G, Gosset G, and Martínez A. 2010. Engineering the *Escherichia coli* Fermentative Metabolism. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 121:71–107.
103. Orencio-Trejo M, Flores N, Escalante A, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Gosset G, and Martínez A. 2008. Metabolic regulation analysis of an ethanologenic

- Escherichia coli* strain based on RT-PCR and enzymatic activities. *Biotechnology for Biofuels* 1(1):8.
104. Owen NA, Inderwildi OR, and King DA. 2010. The status of conventional world oil reserves—Hype or cause for concern? *Energy Policy* 38(8):4743–4749.
 105. Peralta-Yahya PP, Zhang F, del Cardayre SB, and Keasling JD. 2012. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature* 488(7411):320–328.
 106. Percival Zhang Y-H, Himmel ME, and Mielenz JR. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 24(5):452–481.
 107. Peterson JH, Tian P, Ieva R, Dautin N, and Bernstein HD. 2010. Secretion of a bacterial virulence factor is driven by the folding of a C-terminal segment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(41):17739–17744.
 108. Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, and Meyer TF. 1987. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325(6103):458–462.
 109. Puente JL, Juárez D, Bobadilla M, Arias CF, and Calva E. 1995. The *Salmonella ompC* gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene* 156(1):1–9.
 110. Pugsley AP and Francetic O. 1998. Protein secretion in *Escherichia coli* K-12: dead or alive? *Cellular and Molecular Life Sciences* 54(4):347–352.
 111. Ramesh B, Sendra VG, Cirino PC, and Varadarajan N. 2012. Single-cell characterization of autotransporter-mediated *Escherichia coli* surface display of disulfide bond-containing proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 287(46):38580–38589.
 112. Rubin EM. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454(7206):841–845.
 113. Rutherford N, Charbonneau M-E, Berthiaume F, Betton J-M, and Mourez M. 2006. The periplasmic folding of a cysteineless autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation. *Journal of Bacteriology* 188(11):4111–4116.
 114. Rutherford N and Mourez M. 2006. Surface display of proteins by gram-negative bacterial autotransporters. *Microbial Cell Factories* 5:22.

115. Ryu S and Karim MN. 2011. A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(3):529–542.
116. Sambrook J and Rusell D. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
117. Sandkvist M and Bagdasarian M. 1996. Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 7(5):505–511.
118. Sarath G, Dien B, Saathoff AJ, Vogel KP, Mitchell RB, and Chen H. 2011. Ethanol yields and cell wall properties in divergently bred switchgrass genotypes. *Bioresource Technology* 102(20):9579–9585.
119. Schultheiss E, Paar C, Schwab H, and Jose J. 2002. Functional esterase surface display by the autotransporter pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 18(1-3):89–97.
120. Shokri A, Sandén AM, and Larsson G. 2003. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(6):654–664.
121. Singhanian RR, Patel AK, Sukumaran RK, Larroche C, and Pandey A. 2012. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*:1–8.
122. Skillman KM, Barnard TJ, Peterson JH, Ghirlando R, and Bernstein HD. 2005. Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter. *Molecular Microbiology* 58(4):945–958.
123. Soma Y, Inokuma K, Tanaka T, Ogino C, Kondo A, Okamoto M, and Hanai T. 2012. Direct isopropanol production from cellobiose by engineered *Escherichia coli* using a synthetic pathway and a cell surface display system. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114(1):80–85.
124. Somerville C, Youngs H, Taylor C, Davis SC, and Long SP. 2010. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science* 329(5993):790–792.
125. Soprova Z, Sauri A, Van Ulsen P, Tame JRH, Den Blaauwen T, Jong WSP, and Luirink J. 2010. A conserved aromatic residue in the autochaperone domain of the autotransporter Hbp is critical for initiation of outer membrane translocation. *The Journal of Biological Chemistry* 285(49):38224–38233.
126. Spiridonov NA and Wilson DB. 2001. Cloning and biochemical characterization of BglC, a β -glucosidase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. *Current Microbiology* 42(4):295–301.

127. Swangkeaw J, Vichitphan S, Butzke CE, and Vichitphan K. 2009. The characterisation of a novel *Pichia anomala* β -glucosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine. *Annals of Microbiology* 59(2):335–343.
128. Taherzadeh M and Karimi K. 2007. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *Bioresources* 2(4):707–738.
129. Tanaka T, Kawabata H, Ogino C, and Kondo A. 2011. Creation of a cellooligosaccharide-assimilating *Escherichia coli* strain by displaying active beta-glucosidase on the cell surface via a novel anchor protein. *Applied and Environmental Microbiology* 77(17):6265–6270.
130. Tu M, Zhang X, Kurabi A, Gilkes N, Mabee W, and Saddler J. 2006. Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology Letters* 28(3):151–156.
131. Utrilla J, Gosset G, and Martinez A. 2009. ATP limitation in a pyruvate formate lyase mutant of *Escherichia coli* MG1655 increases glycolytic flux to D-lactate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36(8):1057–1062.
132. Utrilla J, Licona-Cassani C, Marcellin E, Gosset G, Nielsen LK, and Martinez A. 2012. Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for D-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. *Metabolic Engineering* 14(5):469–476.
133. Velarde JJ and Nataro JP. 2004. Hydrophobic residues of the autotransporter EspP linker domain are important for outer membrane translocation of its passenger. *The Journal of Biological Chemistry* 279(30):31495–31504.
134. Veldhuis MK, Christensen LM, and Fulmer EI. 1936. Production of ethanol: by thermophilic fermentation of cellulose. *Industrial and Engineering Chemistry* 28(4):430–433.
135. Vinuselvi P and Lee SK. 2011. Engineering *Escherichia coli* for efficient cellobiose utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92(1):125–132.
136. Wang L, Templer R, and Murphy RJ. 2012. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. *Applied Energy* 99:23–31.
137. Wilhelm S, Tommassen J, and Jaeger KE. 1999. A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 181(22):6977–6986.
138. van der Woude MW and Henderson IR. 2008. Regulation and function of Ag43 (Flu). *Annual Review of Microbiology* 62:153–169.

139. Wu CH, Mulchandani A, and Chen W. 2008. Versatile microbial surface-display for environmental remediation and biofuels production. *Trends in Microbiology* 16(4):181–188.
140. Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY, Mitchinson C, and Saddler JN. 2009. Comparative sugar recovery and fermentation data following pretreatment of poplar wood by leading technologies. *Biotechnology Progress* 25(2):333–339.
141. Yang B and Wyman CE. 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2(1):26–40.
142. Zaldivar J and Ingram LO. 1999. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering* 66(4):203–210.
143. Zaldivar J, Martinez A, and Ingram LO. 1999. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 65(1):24–33.
144. Zhang J and Lynd LR. 2010. Ethanol production from paper sludge by simultaneous saccharification and co-fermentation using recombinant xylose-fermenting microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering* 107(2):235–244.
145. Zhang Y-HP. 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35(5):367–375.
146. Zhou S, Yomano LP, Saleh AZ, Davis FC, Aldrich HC, and Ingram LO. 1999. Enhancement of expression and apparent secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase (encoded by *celZ*) in *Escherichia coli* B. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6):2439–2445.

ANEXO 1

En el presente anexo se muestra el manuscrito publicado con la información obtenida en el Capítulo 2.

Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology (2012) 39:1141-1152

DOI 10.1007/s10295-012-1122-0

Cell surface display of a β -glucosidase employing the type V secretion system on ethanologenic *Escherichia coli* for the fermentation of cellobiose to ethanol

Iván Muñoz-Gutiérrez, Ricardo Oropeza, Guillermo Gosset and Alfredo Martinez

Cell surface display of a β -glucosidase employing the type V secretion system on ethanologenic *Escherichia coli* for the fermentation of cellobiose to ethanol

Iván Muñoz-Gutiérrez · Ricardo Oropeza ·
Guillermo Gosset · Alfredo Martínez

Received: 17 January 2012 / Accepted: 16 March 2012 / Published online: 26 May 2012
© Society for Industrial Microbiology and Biotechnology 2012

Abstract We used the autodisplay system AIDA-I, which belongs to the type V secretion system (TVSS), to display the β -glucosidase BglC from *Thermobifida fusca* on the outer membrane of the ethanologenic *Escherichia coli* strain MS04 (MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xyfFGH$, $\Delta ldhA$, $Ppf1B::pdc_{Zm}$ - $adhB_{Zm}$). MS04 that was transformed with the plasmid pAIDABglCRHis showed cellobiase activity (171 U/g_{CDW}) and fermented 40 g/l cellobiose in mineral medium in 60 h with an ethanol yield of 81 % of the theoretical maximum. Whole-cell protease treatment, SDS-PAGE, and Western-blot analysis demonstrated that BglC was attached to the external surface of the outer membrane of MS04. When attached to the cells, BglC showed 93.3 % relative activity in the presence of 40 g/l ethanol and retained 100 % of its activity following 2 days of incubation at 37 °C with the same ethanol concentration. This study shows the potential of the TVSS (AIDA-I) and BglC as tools for the production of lignocellulosic bio-commodities.

Keywords Cellogiose · Bioethanol · *Escherichia coli* · Type V secretion system AIDA-I · *Thermobifida fusca* β -glucosidase

Introduction

Oil depletion and the pollution that is associated with burning fossil fuels are driving research to explore environmentally friendly renewable fuels. Ethanol can be used as a fuel, and at present, “flexible-fuel vehicles” that can run with any blend of gasoline and ethanol are on the market [2]. Agricultural residues are rich in lignocellulosic material that can be employed as a potential low-cost source of fermentable sugars that does not compete with food crops [10, 11]. Lignocellulose has a complex structure, and to release the fermentable sugars, a pretreatment process is needed to permit the hemicellulose hydrolysis, alter the crystalline structure of cellulose and/or to break the lignin [29]. Subsequently, the cellulose can be depolymerized into glucose through the enzymatic action of cellulases and β -glucosidases [10, 11, 29]. Lignocellulose hydrolysis produces primarily hexoses, such as glucose, mannose and galactose, and pentoses, such as xylose and arabinose [10, 13, 29]. To convert all of these different sugars to ethanol, a microorganism is required that is capable of fermenting pentoses and hexoses [10, 11, 13, 30]. *Escherichia coli* has this ability and has been the target of metabolic engineering to generate homo-ethanologenic strains [6, 9, 12, 31, 39].

The lignocellulose depolymerization process is one of the most expensive steps in lignocellulosic ethanol production [10, 11, 29]. As stated by Somerville [35]: “although the cost of cellulases per gallon of ethanol has been reduced ten times approximately in the last decade, that is still 20 times higher than the enzyme costs for a gallon of corn ethanol”. To reduce costs, it is necessary to construct strains capable of secreting enzymes that can hydrolyze some lignocellulose fractions [10, 18]. Despite the fact that *E. coli* can ferment a wide variety of sugars, it

I. Muñoz-Gutiérrez · G. Gosset · A. Martínez (✉)
Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico
e-mail: alfredo@ibt.unam.mx

R. Oropeza
Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico

is unable to ferment some oligosaccharides, such as cellobiose (a glucose dimer formed during cellulase mediated cellulose hydrolysis). Therefore, introduction of the genes that code for hydrolases is required. The insertion of the cellobiose phosphotransferase genes (*casAB*) from *Klebsiella oxytoca* has been employed for the transport and hydrolysis of cellobiose in *E. coli* [7, 28]. Recently, the introduction of a constitutive promoter in the cryptic *E. coli* operons *asc* and *chb* permitted its growth on cellobiose [38].

Secretion systems have been employed for delivering heterologous hydrolases out of the cell. The type II secretion system (TISS), specifically, the out genes from *Erwinia chrysanthemi*, was used to secrete an endoglucanase (EGZ) or a pectate lyase (PelE) and an oligogalacturonide lyase (Ogl) in *E. coli* [7, 40]. However, the TISS comprises approximately 15 genes, which must be expressed heterologously, and the genes that complete the extracellular secretion are highly species-specific [40]. A different strategy is that of a cell surface display that employs some outer-membrane proteins as anchors, thus “immobilizing” enzymes to the cell surface. Recently, the membrane protein poly- γ -glutamate synthase (PgsA) from *Bacillus subtilis* was used for attaching cellulases from *Clostridium cellulolyticum* [33], and the bacterial lipocalin (Blc) from *E. coli* was used for *Thermobifida fusca* (former *Thermomonospora fusca*) β -glucosidase display [37].

Among Gram-negative bacteria secretion systems, the type V is considered the simplest [5], and the adhesin that is involved in diffuse adherence (AIDA-I) of the diarrheagenic *E. coli* strain has been employed for heterologous protein secretion [14–17, 24]. The complete information for protein secretion is contained within a single gene that produces a multidomain pre-protein consisting of a signal peptide (SP), a passenger protein, and a translocation unit (TU) [5, 14]. The amino-terminal region codes for the SP that sends the pre-protein into the periplasmic space where it is cleaved by a signal peptidase [5, 14]. This action releases the passenger domain that is translocated into the extracellular space by the TU, which is formed by a linker region and a β -barrel (at the C terminus) [5, 14]. The linker region anchors the passenger protein to the cell surface. To display a heterologous protein, the native sequence of the passenger protein can be replaced by a heterologous protein sequence [14]. The TVSS has never been employed for the secretion of enzymes involved in the lignocellulose depolymerization for bio-fuels production.

In the present study, we report the fermentation of cellobiose into ethanol using the ethanologenic *E. coli* MS04 strain (MG1655: $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH$, $\Delta ldhA$, *PpflB::pdc_{Zm}-adhB_{Zm}*; [9, 23]). To achieve this goal we used the AIDA-I system, which is also known as the autodisplay system [14], to attach the *T. fusca*-derived β -glucosidase

(BglC) to the outer membrane. BglC was selected because it has an optimum hydrolysis pH of 7, and even though BglC shows its maximum activity at 50 °C, the activity reported at 25 °C is acceptable [36]. These BglC characteristics are well matched with *E. coli* growth conditions (pH 7 and 37 °C). Furthermore, BglC cellobiase activity is inhibited by glucose only at concentrations above 50 g/l [8].

Materials and methods

Strains and plasmids

Escherichia coli DH5a was used for plasmid propagation during plasmid construction. When required, *E. coli* JM110 (*dam*[−]) was employed for non-methylated plasmid production. Cell surface display analysis and fermentations were performed using the ethanologenic strain *E. coli* MS04 (MG1655: $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH$, $\Delta ldhA$, *PpflB::pdc_{Zm}-adhB_{Zm}* [9, 23]).

Plasmids and primers used for this study are shown in Table 1. Standard procedures were employed for plasmid preparation, restriction-enzyme digestions, transformations, and gel electrophoresis [34]. Each plasmid construction was verified by its restriction pattern in an agarose gel and by sequencing. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using Elongase Enzyme Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). During *bglC* gene amplifications, PCR was supplemented with dimethyl sulfoxide (DMSO, 10 %) because of its high percentage of GC (68 %). DNA manipulations using kits (PCRs, site-directed mutations and ligations) were conducted according to supplier protocols.

The plasmid pTrc99A was used for protein expression [1]. Using site-directed mutagenesis, we modified the *NcoI* site (CCATGG) at position 265 to *NdeI* (CATATG) and deleted the *NdeI* site at position 2699, thus obtaining plasmid pTrc99A2. These changes were performed using the Quik-Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The *NcoI* site was modified using D1Ptr and R1Ptr primers, whereas the *NdeI* site was modified using D2Ptr and R2Ptr primers (see Table 1 for primer sequences).

The SP and the TU of AIDA-I were PCR-amplified using the pJM7 plasmid as a template [24, 25]. Amplification of the *bglC* gene was conducted using the pNS6 plasmid as a template [36]. The SP was amplified using the DPSNde and RPSpol primers, amplification of *bglC* was performed using the DBglCBgl and RBglCSac2 primers, and the TU was amplified using the DAidaSac and RAI-Xba1 primers. Due to the sequences coding for the SP, the TU and *bglC* have the majority of the restriction sites that are present in the pTrc99A2 polylinker, the reverse primer for SP amplification introduced the *BglIII* and the *SacI* sites,

Table 1 Plasmids and primers used in this study

Plasmid	Description	Source
pTrc99A	Designed for IPTG-inducible expression of proteins under hybrid <i>trp/lac</i> promoter. Amp ^r	[1]
pTrc99A2	pTrc99A derivative modified for <i>NdeI</i> cloning instead of <i>NcoI</i>	This study
pJM7	Designed for heterologous secretion of cholera toxin B subunit using the autotransporter AIDA-I	[24]
pNS6	pET-26b(+) derivative employed for BglC heterologous production in <i>E. coli</i>	[36]
pAIDABglC	Designed for heterologous secretion of BglC using the autotransporter AIDA-I	This study
pAIDABglCRHis	pAIDABglC derivative that introduce a His-tag between BglC and AIDA-I linker	This study
Primer	Sequence ^a	
D1Ptr	5' CAC ACA GGA AAC AGC ATA TGG AAT TCG AGC TCG 3'	
R1Ptr	5' CGA GCT CGA ATT CCA TAT GCT GTT TCC TGT GTG 3'	
D2Ptr	5' CGG TAT TTC ACA CCG CAC ATG GTG CAC TCT C 3'	
R2Ptr	5' GAG AGT GCA CCA TGT GCG GTG TGA AAT ACC G 3'	
DPSNde	5' TAA GGA TGA <u>CAT ATG</u> ATT AAA TTA AAA TTT GGT GTT TTT 3'	
RPSpol	5' CAA ATC <u>GAG CTC AGA TCT</u> AGG TGT TCC ATG TGC GTA TGC TG 3'	
DBglCBgl	5' GAG <u>ATA GAT CTA</u> TGA CCT CGC AAT CGA CG 3'	
RBglCSac2	5' CTG GCG GAG <u>AGC TCC</u> TGT CCG AAG ATT CCC C 3'	
DAidaSac	5' CCT GGT <u>GAG CTC</u> AAT CCT ACA AAA GAA AGT GCA G 3'	
RAIXba1	5' GCC GGC <u>TCT AGA</u> TCA GAA GCT GTA TTT TAT CCC 3'	
RBglCHis ^b	5' TGC <u>GAG CTC GTG GTG GTG GTG GTG</u> CTG TCC GAA GAT TCC CCC GTT GC 3'	

^a Restriction sites employed during plasmid construction are underlined

^b His-tag sequence is indicated with *bold*

thus making it easier to clone *bglC* subsequently. Furthermore, because the pJM7 plasmid has an *NdeI* site at position 50, which is inside the SP (5'-GCA TAT GCA CAT GGA-3') and 14 bases prior to the signal peptidase site, the reverse primer introduced a silent mutation that eliminated *NdeI* (5'-GCA TAC GCA CAT GGA-3').

Following PCR amplifications, each domain was cloned sequentially. First, the SP was digested using *NdeI* and *SacI* and cloned into pTrc99A2. Next, employing *BglIII* and *SacI*, *bglC* was cloned into this plasmid. Finally, the TU was cloned into this derivative plasmid using *SacI* and *XbaI* to obtain the pAIDABglC plasmid (Fig. 1). A version of pAIDABglC with a His-tag sequence between *bglC* and the TU was also constructed.

Using pAIDABglC as a template, *bglC* was PCR-amplified using the DBglCBgl and RBglCHis primers. The endogenous *bglC* gene in pAIDABglC was then removed using the endonucleases *BglIII* and *SacI*. Next, the digested plasmid was agarose-gel purified. Finally, the PCR product was digested using the same restriction enzymes and cloned to produce the pAIDABglCRHis plasmid (Fig. 1).

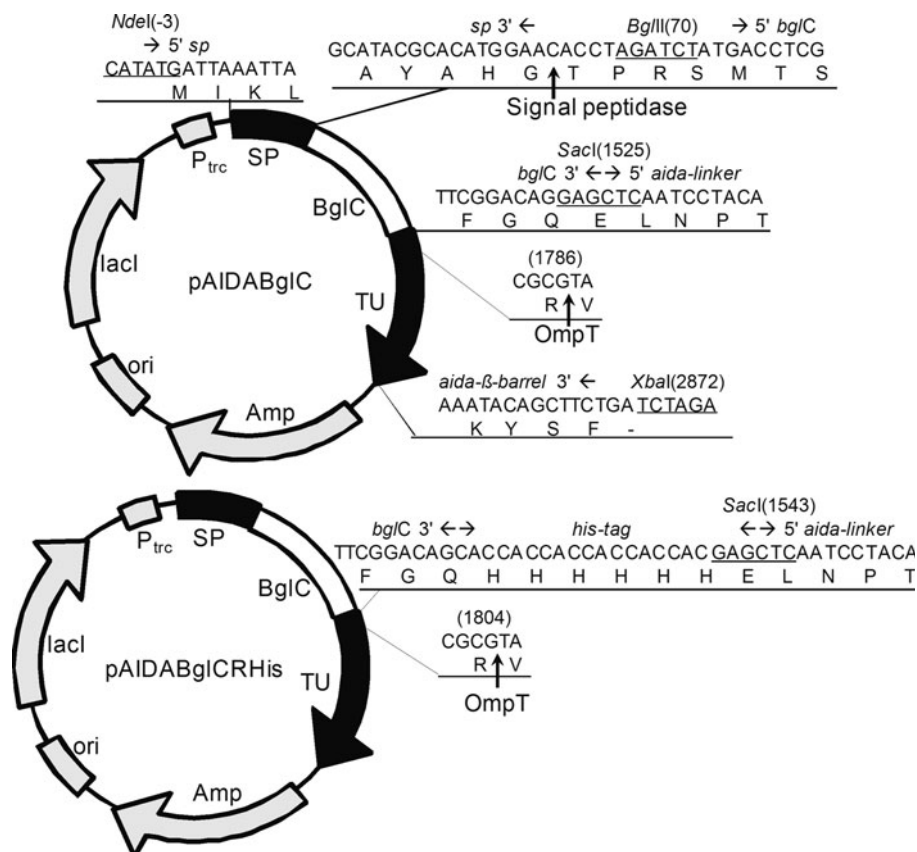
Whole-cell protease treatment and OMP purification

Whole-cell protease treatment was adapted from a protocol originally described by Maurer et al. [24], and outer

membrane proteins (OMP) were prepared as a Triton X-100 insoluble fraction as described by Puente et al. [32]. Cells were grown overnight in 5 ml of Luria broth (LB) at 37 °C and 300 rpm. The overnight culture was used to inoculate 25 ml of LB, bringing to 0.05 OD₆₀₀, and the cells were induced with 10 μM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma, St. Louis, MO, USA) when they reached 0.5 OD₆₀₀. When the cells reached 2.5 OD₆₀₀, 4 ml of the culture was concentrated in a 1.5-ml microcentrifuge tube at room temperature (RT), and the cell pellet was washed twice with 1 ml phosphate-buffered saline (PBS). The cell pellet was then resuspended in 950 μl PBS and 50 μl 50 mg/l trypsin (Sigma) was added. Following 10-min incubation at 37 °C, the reaction was stopped by washing the cells twice with 1 ml PBS.

To proceed to OMP purification, trypsin-treated and non-treated cell pellets were resuspended in 500 μl 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.2, and disrupted using sonication. Cell debris and intact bacteria were removed by centrifuging for 2 min at 13,400×g in a microfuge at room temperature. The membrane fraction was recovered by centrifuging the supernatant at 13,400×g for 30 min in a microfuge at 4 °C and then resuspended in 500 μl 2 % Triton X-100/10 mM Na₂HPO₄, pH 7.2. After incubating at 37 °C for 30 min, the Triton-X-100 insoluble fraction was recovered by centrifuging at 13,400×g for 30 min in a microfuge at

Fig. 1 Structure of the AIDA-BglC system. The borders between each domain are given as sequences, and are indicated by *horizontal arrows*. Restriction sites used for plasmid construction are *underlined*. Protease cleavage site for OmpT (in the linker region) and the one for signal peptidase is indicated with *vertical arrows*. SP, signal peptide; BglC, *T. fusca* β -glucosidase; TU, translocation unit, which is formed by a linker region and a β -barrel. The passenger protein (BglC) is attached to the cell surface by the linker region



4 °C. This insoluble fraction was washed with 500 μ l 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.2, and recovered by centrifuging at 13,400 \times g for 30 min in a microfuge at 4 °C. Finally, the OMPs were resuspended in 50 μ l PBS pH 7.4 for SDS-PAGE analysis.

Western-blot analysis

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using 12 % gels, as described by Laemmli [19]. Samples were mixed with 2 \times loading buffer, heated in boiling water for 5 min, and subjected to electrophoresis. Gels were electroblotted onto a nitrocellulose membrane (Amersham Hybond-ECL, GE Healthcare Waukesha, WI, USA) and probed using a Penta-His horseradish-peroxidase-conjugated antibody (Penta-His HRP Conjugate, Qiagen, Hilden, Germany).

Culture conditions

For stock culture preparation, *E. coli* MS04 was transformed with the plasmid and grown in a plate of LB agar. Later, a single colony was selected and grown overnight in a flask containing LB. Finally, the cells were stored in glycerol (40 % final) at -70 °C. During all cultivation

steps, plasmid-carrying *E. coli* MS04 were grown in 100 mg/l carbenicillin.

Batch fermentations were conducted in mineral AM1 medium [22] employing glucose (J.T. Baker, Avantor Performance Materials, Phillipsburg, NJ, USA) and/or cellobiose (Sigma) as carbon sources and supplemented with 0.1 g/l citrate (J.T. Baker) and 2 g/l sodium acetate (J.T. Baker; [9]). Cellobiose was filter-sterilized to avoid hydrolysis. Culturing was performed in Fleakers mini-fermentors [4] containing 200 ml of mineral AM1 medium, without aeration, at pH 7, 37 °C, and 150 rpm. Automatic additions of 2 N KOH preserved a constant pH.

Prior to fermentations, the cells were adapted to grow in mini-fermentors. First, a sample from a stock culture was grown overnight in a 125-ml flask containing 25 ml LB at 37 °C and 300 rpm. Later, a mini-fermentor with 20 g/l of carbon source was brought to 0.1 OD₆₀₀ with the overnight and the cells were grown until 1 OD₆₀₀. Finally, the culture was aliquoted into cryotubes containing glycerol (40 % final) to a final volume of 1.4 ml and stored at -70 °C.

To develop the inoculum for fermentation, one cryotube containing cells adapted to mini-fermentors was seeded into a mini-fermentor with 20 g/l of carbon source. When the cells reached an OD₆₀₀ of almost 0.5, they were centrifuged for 10 min at 4,000 \times g and inoculated, at an initial OD₆₀₀ of 0.1, into mini-fermentors containing 40 g/l of

carbon source. When cellobiose was employed, the cells were induced from the beginning using 10 μM IPTG. The inoculum for fermentations employing a mix of glucose (20 g/l) and cellobiose (20 g/l) was developed using glucose.

Enzyme assays during fermentation

Cell surface-attached β -glucosidase was assayed using p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG; Sigma) and cellobiose. Cells were cultivated in mini-fermenters with 40 g/l of carbon source using the same conditions as described above, and they were allowed to grow until they reached an OD_{600} of 1. During pNPG assays, 3.75 ml cells was recovered by centrifuging in a microfuge at $9,300\times g$ (2 min, RT). The cell pellet was washed twice (RT) with 50 mM phosphate buffer (pH 7) and resuspended in 3.65 ml of the same buffer. The cell suspension was then allowed to equilibrate to the assay temperature (37 °C) for 5 min. The reaction was initiated with the addition of 100 mM pNPG (100 μl), and the kinetics were followed by taking samples (of 750 μl each) at regular time intervals. The reaction was terminated by adding 2 M Na_2CO_3 (250 μl to each sample). The absorbance, at 400 nm, was measured after cells were centrifuged in a microfuge at $9,300\times g$ (2 min, RT), and enzyme activity was calculated with the extinction coefficient for p-nitrophenol (18.5 mM^{-1} , [36]). One pNPGase unit was defined as the amount of BglC attached to the cells that catalyzes the formation of 1 μmol pNP per minute.

During cellobiose assays, 2 ml of cells was recovered by centrifuging in a microfuge at $9,300\times g$ (2 min, RT). The cell pellet was washed as described previously and resuspended in 920 μl 50 mM phosphate buffer (pH 7). The cell suspension and cellobiose stock were allowed to equilibrate to the assay temperature (37 °C) for 5 min. The reaction was initiated by adding 50 g/l cellobiose (80 μl), and the kinetics were followed by sampling 200 μl at regular time intervals. To stop the reaction, samples were centrifuged in a microfuge at $13,400\times g$ (2 min, RT), and the supernatant was then boiled in a water bath for 5 min. Finally, the glucose concentration in the supernatant was measured to calculate activity. One cellobiase unit was defined as the amount of BglC attached to the cells that catalyzes the formation of 1 μmol of glucose per minute.

Effect of ethanol on the activity and stability of MS04-attached BglC

Escherichia coli MS04 cells carrying the pAIDABglCRHis plasmid were grown overnight in 5 ml LB at 37 °C and 300 rpm. The overnight culture was then used to bring 50 ml of LB to 0.05 OD_{600} , and when the culture reached

0.5 OD_{600} , the cells were induced using 10 μM IPTG. When cells reached an OD_{600} of 2.5, they were harvested by centrifuging at $4,000\times g$ (10 min, RT) and the cell pellet was washed twice with 10 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7). Finally, the cell pellet was concentrated in 5 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7), and the cellobiase and pNPGase activities were measured as described above after appropriate dilution. The cell protein was estimated using a standard curve of protein concentration versus OD_{600} (1.0 OD_{600} corresponds to 0.27 mg of cell protein per milliliter).

The effect of ethanol on BglC activity was measured using cellobiose as a substrate. The reactions were performed as described previously and employed 0.1 U (cellobiase) of the cell concentrate per milliliter (0.37 U/mg of cell protein or 0.27 U/mg of dry cell weight) with different ethanol concentrations in 1 ml of total volume. To measure the stability of BglC in the presence of ethanol, 0.4 U (pNPGase) of the cell concentrate per milliliter (1.48 U per mg of cell protein or 1.08 U per mg of dry cell weight) mixed with different ethanol concentrations in 1.5 ml of total volume was incubated at 37 °C. Samples of 50 μl were taken at regular intervals for measurements of residual activity, employing pNPG as a substrate and using the same conditions as described previously. In both cases, the activities are shown as relative activities, with the control without ethanol set to 100 %.

Analyses

Growth was determined spectrophotometrically as optical density at 600 nm (DU-70, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA) and converted to dry cell weight (DCW) per liter using a calibration curve (1 optical density = 0.37 $\text{g}_{\text{DCW}}/\text{l}$). Samples were centrifuged (RT) and the cell-free culture broth was frozen until analysis. The concentration of glucose was measured with an enzymatic analyzer (Model 2700, YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA), whereas the cellobiose concentration was measured employing the 3,5-dinitrosalicilic acid (DNS) method as described by Miller [27]. When fermentations were carried out with a mix of sugars, their concentrations were measured with an HPLC system consisting of 600E quaternary bomb, 717 automatic injector, and 2410 refractive index (Waters, Millipore Co. Milford, MA, USA) employing an Aminex HPX-87P column (300 \times 7.8 mm; 9 μm) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with H_2O as mobile phase with a flow of 0.6 ml/min at 85 °C. The ethanol was analyzed by gas chromatography using n-butanol (1 %) as internal standard (6850 Series GC System, Agilent, Wilmington, DE, USA). Concentrations of cell biomass, ethanol, and sugars were corrected for fermentation volume changes caused by the addition of base during the cultures.

Specific growth rates (μ) were calculated as the slope of linear regressions of the cell mass natural log versus time during the exponential growth phase. The ethanol yield (g ethanol/g carbon source) was estimated as a percentage of the theoretical maximum, taking into account that the theoretical yields with glucose and cellobiose are 0.51 and 0.54, respectively. All cultures and enzyme assays were carried out at least in triplicate (average and standard deviations are shown in plots and tables). Graphpad Prism software (Graphpad, San Diego, CA, USA) was used to perform an ANOVA (analysis of variance) and a Student's *t* test for comparison of data presented in Tables 2 and 3, respectively. Means were judged significant different when *p* values were ≤ 0.05 .

Results

Construction of the AIDA-BglC secretion system

To modulate the secretion of BglC using AIDA-I, the pTrc99A plasmid that contains the IPTG-inducible *trc* promoter was chosen as the expression vector; this vector is a medium copy number plasmid with about 30 copies per chromosome [1]. The polylinker has the *NcoI* (CCATGG) site for cloning at its 5' end. However, the G nucleotide, after the ATG, modifies the codon for the second amino acid of the SP (5' ATG ATT AAA...). Because the amino acid sequences of SPs are very important targets during protein transport to the periplasmic space, it is necessary to retain their intact sequences. For this reason, *NcoI* was substituted with *NdeI* (CATATG) using site-directed mutagenesis. Consequently, the *NdeI* site, localized at position 2699 in pTrc99A, had to be eliminated using a site-directed mutation, thus obtaining the derivative plasmid pTrc99A2. Figure 1 depicts the chimeric proteins and the important restriction sites employed during the construction of the pAIDABglC and pAIDABglCRHis plasmids. The figure also shows the sequences at the borders

between each domain, the position of the His-tag in pAIDABglCRHis, and the OmpT protease-cleavage site. The calculated molecular weight of the chimeric protein, without the SP, is 103 kDa, and it was named P103.

Whole-cell protease treatment analysis

Trypsin cleaves proteins on the C-terminal side of lysine and arginine amino acid residues. By taking advantage of this characteristic, proteins attached and exposed externally on the cell surface can be removed using trypsin. The linker region of the AIDA-I system and BglC have many sites that are susceptible to trypsin hydrolysis. To demonstrate that BglC is displayed on the cell surface, whole cells of pAIDABglCRHis plasmid-transformed *E. coli* MS04 were treated with trypsin. Cells carrying pTrc99A2 were used as a negative control. After growing, the cells were harvested, "shaved" with trypsin and subjected to OMPs purification.

Figure 2a shows a polyacrylamide gel with the OMPs purified from trypsin-treated or untreated cells. In contrast to the negative control, the cells expressing the autodisplay system without the proteolytic treatment showed a band at the level of the 100-kDa protein marker. When the cells were treated with trypsin, this P103 protein band disappeared. The OMPs were transferred to a nitrocellulose membrane and probed with an anti-His antibody and a signal that corresponded to protein P103 was revealed (Fig. 2b). The bands observed in Fig. 2a at approximately 35 kDa correspond to the OmpF and OmpA. OmpC, which migrates together with OmpF, is not found in the figure because during the xylose growth adaptation, the parental *E. coli* strain JU15 [23] lost a 25,335-bp region of the genome that contains the *ompC* gene (unpublished data).

Cellobiose fermentation and BglC activity

To test whether the BglC attached to the surface was functional and that the introduction of the His-tag to

Table 2 Growth and kinetic parameters of *E. coli* MS04 and derivatives

Plasmid	Carbon source	μ (h ⁻¹)	Ethanol yield (% of the maximum theoretical)	Cell mass ^a (g CDW/l)
Without plasmid	Glucose	0.306 (0.003)	93 (1.6)	1.87 (0.17)
pTrc99A2	Glucose	0.265 (0.006)	84 (1.9)	1.47 (0.21)
pAIDABglCRHis	Glucose	0.159 (0.012)	82 (1.4)	0.93 (0.41)
pAIDABglCRHis	Glucose and cellobiose	0.167 (0.004)	80 (0.8)	1.28 (0.11)
pAIDABglCRHis	Cellobiose	0.121 (0.004)	81 (1.2)	1.14 (0.02)
pAIDABglC	Cellobiose	0.127 (0.011)	84 (1.8)	1.02 (0.16)

Values in parenthesis indicate SD

^a Cell mass was obtained at the onset of the stationary phase

Table 3 BglC activity with whole cells during their growth in fermentation conditions

Plasmid	MS04 grown in	pNPGase activity (U/g _{CDW})	Cellobiase activity (U/g _{CDW})
pAIDABglCRHis	Glucose	4.6 (0.4)	ND
pAIDABglCRHis	Cellobiose	42.4 (3.3)	171 (17)
pAIDABglC	Cellobiose	47.9 (2.2)	173 (6.3)

Values in parenthesis indicate SD
 ND not determined

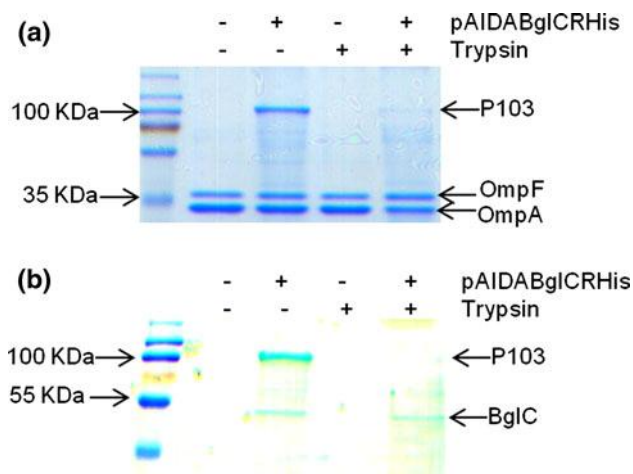


Fig. 2 Protease treatment analysis of *E. coli* MS04 transformed with pAIDABglCRHis. **a** SDS-PAGE and **b** Western blot showing protease accessibility of BglC attached to the surface of the outer membrane. PM is the protein marker; P103 is the protein product of pAIDABglCRHis without the SP, and represents the sum of AIDA-I TU and BglC. The plasmid pTrc99A2 was employed as a negative control. The symbol minus in the line of pAIDABglCRHis means proteins from cultures carried out with MS04/pTrc99A2

pAIDBglCRHis did not affect BglC properties, we fermented 40 g/l cellobiose as the sole carbon source. Figure 3a shows cell growth, cellobiose consumption, and ethanol production during the fermentation of *E. coli* MS04 cells carrying pAIDABglC or pAIDABglCRHis. The specific growth rate (μ), ethanol yield and maximum cell biomass reached are shown in Table 2. During these fermentations, we observed that MS04 transformed with either of the plasmids displayed almost identical kinetics (Fig. 3a), with a μ of 0.121–0.127 h⁻¹ (Table 2). Similarly, both cultures reached a similar maximum cell mass, depleted the cellobiose at almost the same time, and produced similar titers of ethanol (Fig. 3a; Table 2). These results prove that the TVSS, specifically the AIDA-I system, permits the display of BglC in an active form and that *E. coli* MS04/pAIDABglC or pAIDABglCRHis can ferment cellobiose into ethanol.

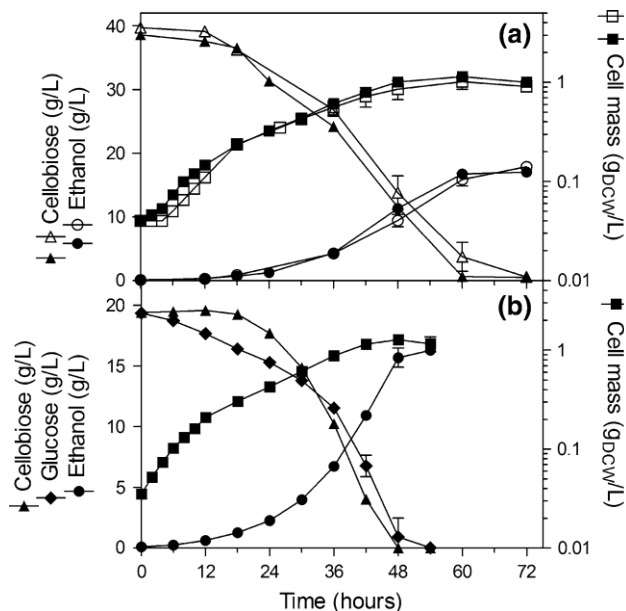


Fig. 3 **a** Cellobiose fermentation kinetics by MS04/pAIDABglC (empty symbols) and MS04/pAIDABglCRHis (filled symbols). **b** Fermentation kinetic of a mix of cellobiose and glucose by MS04/pAIDABglCRHis

Taking advantage of the fact that BglC cellobiase activity is not inhibited in the presence of 20 g/l glucose [8], we cultured cells using a mix of cellobiose (20 g/l) and glucose (20 g/l). The cell growth, cellobiose and glucose consumption, and ethanol production during the fermentation are shown in Fig. 3b. During the first 18 h of fermentation, glucose was consumed in preference to cellobiose; subsequently, the rate of cellobiose consumption increased dramatically and cellobiose was depleted, prior to glucose, within 48 h of fermentation. The μ , ethanol yield, and maximum cell biomass reached are shown in Table 2.

To determine whether the expression level of the AIDA-BglC system hampered cell growth, cultures in 40 g/l glucose of cells carrying either pAIDABglCRHis, the empty vector (pTrc99A2), or no plasmid were performed. Using data from the cultures of *E. coli* MS04/pAIDABglCRHis in cellobiose for comparison, Fig. 4 shows the cell growth, carbon source consumption, and ethanol production during the fermentations. Table 2 shows the μ , ethanol yield and maximum cell biomass reached during these cultures. The cells without plasmid displayed the highest rate of exponential growth, followed by *E. coli* MS04/pTrc99A2. The cells with plasmid pAIDABglCRHis, in glucose, displayed a significant higher rate of exponential growth than the cells grown in cellobiose, but a significant lower rate than MS04 cells transformed with pTrc99A2.

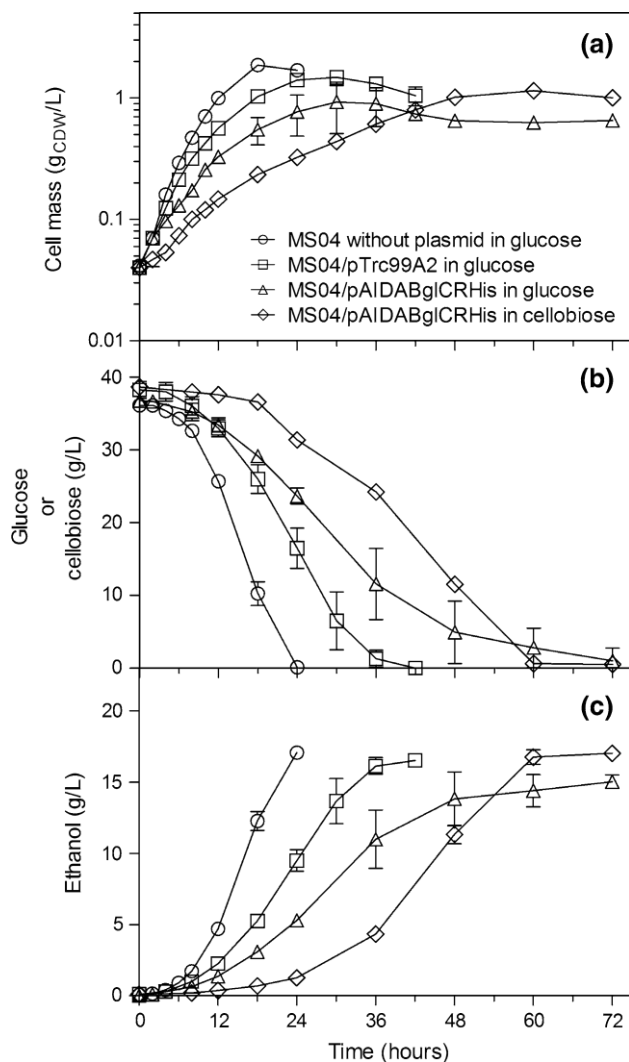


Fig. 4 Glucose fermentation by MS04-carrying plasmid pTrc99A2, pAIDABglCRHis, or without plasmid. The data from the cultures with *E. coli* MS04/pAIDABglCRHis in cellobiose are included for comparison

As expected, *E. coli* MS04 without plasmid had the highest carbon source consumption rate, consuming all glucose within 24 h (Fig. 4b). The cells carrying pTrc99A2 required 18 further hours to consume the glucose, and cells carrying pAIDABglCRHis in glucose or cellobiose required two further days to consume the carbon sources. Importantly, even though the cells carrying pAIDABglCRHis and grown in glucose showed a higher μ than the cells grown in cellobiose, both required the same time to consume the carbon source. MS04 without plasmid reached a titer of 17.1 g/l ethanol with a yield of 93 % of the theoretical maximum (Table 2). The cells carrying plasmids reached titers of 15–17 g/l (Fig. 4c), but their ethanol yields were 81–84 % of the theoretical maximum (Table 2).

To determine the extent of BglC activity in the cells during fermentation, the cells carrying pAIDABglC or pAIDABglCRHis were harvested when they reached 0.37 g_{CDW}/l (1 DO₆₀₀) and their activities measured using pNPG and cellobiose as substrates. During cellobiose fermentation, the cells were induced from the beginning with IPTG to consume the carbon source. The BglC kinetic parameters obtained with whole cells are shown in Table 3. The cells grown in cellobiose and carrying any of the plasmids had no significant differences in BglC activity, and in both cases, a three-fold higher cellobiase activity was observed than pNPGase activity. Although the cells grown in glucose were not induced, they displayed pNPGase activity because the AIDA-BglC system is controlled by the strong promoter *trc*, which has a high basal level of transcription [1]. However, the cellobiase activity of MS04/pAIDABglCRHis grown in glucose was not determined because it was too low, and the glucose released from the cellobiose during the assay did not accumulate because the cells consumed it.

Effect of ethanol on the activity and stability of MS04-attached BglC

To determine the inhibition and stability of BglC in the presence of ethanol, MS04/pAIDABglCRHis cells were grown in a flask containing LB, and the cells were induced using IPTG for BglC production. The cellobiase activity of BglC was measured in the presence of different concentrations of ethanol. As shown in Fig. 5a, the relative activity decreased slightly, in a linear trend, with increasing ethanol concentration. To measure BglC stability, the cells were incubated at 37 °C with different concentrations of ethanol, and the residual activity was measured using pNPG. As shown in Fig. 5b, BglC was very stable in the presence of 40 g/l of ethanol after 2 days of incubation and even 120 g/l ethanol had little effect on BglC stability.

Discussion

Cellobiose plays an important role during cellulose hydrolysis because it inhibits directly the action of endo- and exocellulases [3]. Although the inhibition can be alleviated by adding β -glucosidases [3], it would be more advantageous to develop an ethanologenic *E. coli* strain with the capacity to consume cellobiose. This would be one step in the consolidated bioprocessing (CBP) where the fermentation and depolymerization process could be conducted in a single reactor without adding β -glucosidases and cellulases.

The characteristics of the enzymes that would be employed in CBP have to be well matched with the

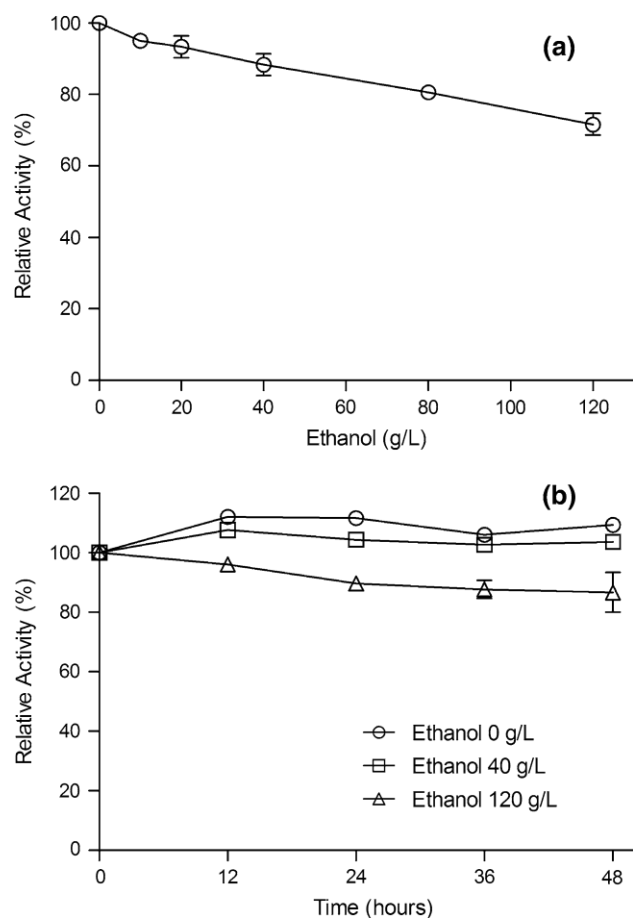


Fig. 5 Effect of ethanol at different concentrations on the **a** activity and **b** stability of BglC attached to the outer membrane of MS04/pAIDABglCRHis

microorganism growth conditions. For that reason, in this study, the ethanologenic *E. coli* strain MS04 was provided with the ability to consume cellobiose by secreting BglC from *T. fusca*. During cellobiose fermentation experiments, the cells carrying the AIDA-BglC system were induced with 10 μ M IPTG; previously, in flask cultures with glucose as the carbon source, it was found that induction with higher IPTG concentration the cell growth was hindered.

After constructing the AIDA-BglC system, the OMPs of MS04 cells transformed with pAIDABglCRHis were analyzed using SDS-PAGE revealing the protein P103. This protein disappeared following protease treatment and MS04 cells that carried this plasmid fermented cellobiose to ethanol efficiently. Together, these data demonstrate that an active form of BglC was attached to the external surface of the outer membrane. To confirm that the P103 band corresponded to the chimeric protein formed from the TU and BglC, we performed a Western blot. A signal was observed in the lane corresponding to the cells that expressed the AIDA-BglC system that were not treated with trypsin (Fig. 2b). Additionally, a weak protein band is

observed below the 55-kDa marker, which corresponded to BglC (53.4 kDa) that detached from the outer membrane [36]. OmpA has a trypsin-susceptible periplasmic moiety; hence, OmpA from cells with a disrupted outer membrane becomes sensitive to trypsin and can be used to evaluate outer membrane integrity [20, 24]. A comparison of the OMPs following trypsin treatment does not reveal any change in OmpA, proving that the anchored BglC did not affect the integrity of the cell envelope.

The first attempt to produce ethanol from cellobiose using an ethanologenic *E. coli* was performed by Moniruzzaman et al. [28] and by expressing the *Klebsiella oxytoca casAB* operon in plasmid, *E. coli* K011 fermented 90 g/l cellobiose and produced 45.4 g/l of ethanol with a theoretical yield of greater than 94 %. Notably, in this study, we obtained a yield of 84 %, but we used a mineral medium supplemented with 40 g/l cellobiose instead of a rich medium (LB) as was used by Moniruzzaman et al. [28]. Moreover, a major disadvantage of employing rich medium is the increase in process cost. Recently, Vinuselvi and Lee [38] introduced a constitutive promoter on the cryptic *chb* and *asc* operons of *E. coli* MG1655 and adapted this strain for cellobiose consumption. The new strain, CP12CHBASC30, was capable of growth under aerobic conditions and used 4 g/l cellobiose in mineral medium, consuming 3 g/l and reaching 1.7 DO_{600} in 24 h, whereas in this study, *E. coli* MS04 fermented approximately 7 g/l cellobiose directly to ethanol within 24 h. Furthermore, in our opinion, the attachment of a β -glucosidase to the cell surface, such as BglC, which has the capacity to hydrolyze a wide range of cellooligosaccharides [36, 37], is more efficient than a simple capacity to metabolize one disaccharide (cellobiose) only.

The potential of *T. fusca*-derived BglC for metabolizing cellobiose by *E. coli* has been demonstrated recently by Tanaka et al. [37]. BglC was attached to the cell surface of *E. coli* JCM20137, and subsequently, the cells were grown in mineral medium containing 2 g/l cellobiose under aerobic conditions and reached 1 DO_{600} in 20 h. In our study, using the AIDA-I system to induce BglC surface display, the fermentation of 40 g/l cellobiose into ethanol was performed in a mineral medium by an *E. coli* strain that was previously metabolically engineered to produce ethanol as the sole fermentation product [9, 23]. Within 24 h, the strain MS04/pAIDABglCRHis reached approximately 0.9 DO_{600} (0.33 g_{CDW}/l), and within 60 h, the maximum cell biomass was 2.8 DO_{600} (1 g_{CDW}/l , Fig. 3). The cells required 72 h to consume 40 g/l of cellobiose (Fig. 3) and produced 17.0–17.9 g/l of ethanol (Fig. 3) with a yield that was 81–84 % of the theoretical maximum (Table 2). To our knowledge, this is the first report that shows the fermentation of cellobiose into ethanol by an ethanologenic *E. coli* strain using a mineral medium. Furthermore, these

results demonstrate that BglC is compatible with *E. coli* growth conditions, as reported by Tanaka et al. [37], and demonstrate the great potential of the TVSS (AIDA-I) as a tool for depolymerase secretion in the area of lignocellulosic bio-commodities production.

It is well known that commercial β -glucosidases, including the widely employed β -glucosidases from *Aspergillus niger*, are inhibited profoundly by glucose [3]. However, Ferchak and Pye [8] reported that BglC was not inhibited during cellobiose hydrolysis until 50 g/l of glucose was present in the reaction. This characteristic can be employed, for example, in a pre-saccharification and subsequent simultaneous saccharification and fermentation process (SSFP): i.e., the glucose released during the pre-saccharification step will not inhibit BglC attached to MS04, permitting the hydrolysis of the cellobiose released by the cellulases during the SSFP and eliminating the endo and exo-cellulases inhibition by cellobiose. To study the performance of BglC attached on the cells using a mix of glucose and cellobiose, fermentations with 20 g/l of each sugar were performed. As shown in Fig. 3b, BglC hydrolyzed the cellobiose and allowed the co-fermentation of both sugars within 48 h resulting in a yield of 80 % (Table 2). MS04/pAIDABglCRHis cells grown in the mixture of sugars consumed both carbon sources 12 h before the cells that were grown in cellobiose (Fig. 3a) and showed almost 40 % higher μ (Table 2) due to the presence of glucose in the mix. These results show the potential of BglC for use in pre-saccharification and subsequent SSFP, because BglC eliminated the cellobiose-induced inhibition of the endo- and exocellulases more efficiently than commercial β -glucosidases.

Plasmid synthesis and maintenance impose a metabolic burden to cells. For example, Martinez et al. [21] reported that the addition of pUC19 to the ethanologenic *E. coli* LY01 reduced the growth rate dramatically and reduced the ethanol yield by approximately 50 % compared to the unmodified LY01. To verify whether the introduction of plasmids for BglC secretion hampered MS04 growth, fermentations in glucose with pAIDABglCRHis or pTrc99A2 were performed. As expected, the transformation with the empty plasmid pTrc99A2 significantly reduced the μ and ethanol yield by 13 and 10 %, respectively, compared to MS04 without plasmid (Table 2). For this reason, the decrease in the ethanol yield observed with the cells carrying the AIDA-BglC system grown in cellobiose compared with MS04 without plasmid in glucose cannot be ascribed to expression and activity of BglC only. Indeed, the growth of MS04 with pAIDABglCRHis (a larger plasmid than pTrc99A2) in glucose significantly reduced the μ by 40 % compared with MS04 carrying pTrc99A2. Additionally, a comparison of the cell biomass (Table 2), shows that cells with the AIDA-BglC system grown in

either glucose, cellobiose or the mix of sugars reached between 30 and 50 % significant less cell biomass than MS04 without plasmid.

During the BglC activity assays, the cells carrying pAIDABglC or pAIDABglCRHis showed almost identical cellobiase and pNPGase activities, indicating that insertion of the His tag does not reduce BglC activity. Although we did not find more examples of β -glucosidase attachment in *E. coli* in the literature, this approach has been employed widely in *Saccharomyces cerevisiae*. McBride et al. [26] displayed the *Saccharomycopsis fibuligera*-derived β -glucosidase BGL1 on *S. cerevisiae*, thus obtaining the strain Y294[ysFI], which had an pNPGase activity of 112 U/g_{CDW} during exponential cell growth (0.155 h⁻¹) on cellobiose in anaerobic conditions. Interestingly, in our study, MS04 carrying pAIDABglC or pAIDABglCHis and grown in cellobiose showed a μ of 0.121 and 0.127 h⁻¹, respectively, which are similar to those of Y294[ysFI] [26]. In the case of the pNPGase activities shown by MS04 carrying the AIDA-BglC system (Table 3), we observed 60 % lower activities than *S. cerevisiae* Y294[ysFI]. It is important to mention that the pNPGase activity of *S. cerevisiae* Y294[ysFI] was obtained during the exponential cell growth phase, whereas pNPGase activities shown in our study were obtained after exponential cell growth when the cells reached 0.37 g_{CDW}/l (1 DO₆₀₀; Fig. 3). Another important note is that *E. coli* MS04 possesses the outer membrane protease OmpT, which is reported to cleave surface-exposed passenger proteins [24]. In our case, the presence of OmpT did not interfere with the cell-surface display of BglC because the BglC provided sufficient activity to allow *E. coli* MS04 to grow on cellobiose.

Cellulases and β -glucosidases employed in CBP or SSFP must tolerate the presence of ethanol and other inhibitors to function. For this reason, and as a first approach, the study of BglC in the presence of ethanol was performed. Although MS04 produced less than 20 g/l of ethanol in our study, the inhibition and stability of cell-attached BglC by ethanol was evaluated at up to 120 g/l. The activity of BglC in the presence of 10 and 20 g/l of ethanol was decreased to 95 and 93 %, respectively (Fig. 5a), and the enzyme was stable when it was incubated at 37 °C for 48 h in medium containing 40 g/l ethanol (Fig. 5b), which is consistent with the results obtained during cellobiose fermentations because BglC activity and stability must be retained to hydrolyze cellobiose during culturing. At the maximum concentration of ethanol evaluated (120 g/l), BglC retained a relative activity of 72 % (Fig. 5a) and was quite stable (Fig. 5b). Notably, during the stability experiments, the cells treated with or without ethanol lysed during the incubation. This finding could underlie the slight increase in relative activity in control- or 40 g/l ethanol-treated cells (Fig. 5b). It is possible that the cells retained sufficient intracellular BglC,

which provided the increase in activity when it was released into the medium following cell lysis. Although cells were lysed, the control BglC activity did not decrease during the experiment, indicating that the enzyme was stable even in the presence of proteases. Thus, the decrease in relative activity during the incubation with 120 g/l ethanol can be ascribed to the ethanol and not to proteolysis.

In conclusion, the TVSS (AIDA-I) allowed the secretion of *T. fusca*-derived BglC in *E. coli* MS04, thus permitting the fermentation of cellobiose into ethanol without adding external β -glucosidases and allowing the use of simple mineral media. Furthermore, the AIDA-I system attached BglC without affecting the outer membrane integrity. This approach is one important step in developing CBP. An important part of CBP is the use of cellulases that possess a pH and hydrolysis temperature that is compatible with the growth conditions of the ethanologenic microorganism. In addition, cellulases must retain activity and be stable in the presence of ethanol during fermentation. Because *E. coli* has an optimum pH and temperature for growth of 7 and 37 °C, respectively, suitable cellulases for *E. coli*-mediated CBP, such as BglC, are required. Finally, ethanologenic *E. coli* strain MS04 displaying BglC permits to carry out fermentations with a mixture of glucose and cellobiose, showing its potential for pre-saccharification and subsequent SSFP.

Acknowledgments We thank Dr. Thomas F. Meyer from Max Planck Institute (Infection Biology) for providing pJM7 plasmid, Dr. David B. Wilson (Department of Molecular Biology and Genetics, Cornell University) for providing pNS6 plasmid, and Luz María Martínez, Mercedes Enzaldo, Georgina Hernández, Omar Arriaga and Shirley Ainsworth for technical support. This work was supported by the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) technological innovation grants: PETRAMIN 2010-13879, 2011-154298, and 2012-184417; and from the Universidad Nacional Autónoma de México: grant DGAPA/PAPIIT/UNAM IT200312-2.

References

- Amann E, Ochs B, Abel KJ (1988) Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69(2):301–315
- Amorim HV, Lopes ML, de Castro Oliveira JV, Buckeridge MS, Goldman GH (2011) Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol* 91(5):1267–1275
- Andrić P, Meyer AS, Jensen PA, Dam-Johansen K (2010) Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnol Adv* 28(3):308–324
- Beall DS, Ohta K, Ingram LO (1991) Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 38(3):296–303
- Dautin N, Bernstein HD (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* 61:89–112
- Dien BS, Nichols NN, O'Bryan PJ, Bothast RJ (2000) Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Appl Biochem Biotechnol* 84–86(1–9):181–196
- Edwards MC, Henriksen ED, Yomano LP, Gardner BC, Sharma LN, Ingram LO, Peterson JD (2011) Addition of genes for cellobiase and pectinolytic activity in *Escherichia coli* for fuel ethanol production from pectin-rich lignocellulosic biomass. *Appl Environ Microbiol* 77(15):5184–5191
- Ferchak JD, Pye EK (1983) Effect of glucose and other sugars on the β -1,4-glucosidase activity of *Thermomonospora fusca*. *Biotechnol Bioeng* 25(12):2855–2864
- Fernandez-Sandoval MT, Gosset G, Martinez A (2010) Ethanol production by ethanologenic *Escherichia coli* using xylose-glucose-acetate mixtures in batch and continuous cultures. 32nd symposium on biotechnology for fuels and chemicals. Society for Industrial Microbiology. Clearwater Beach, Florida, USA
- Geddes CC, Nieves IU, Ingram LO (2011) Advances in ethanol production. *Curr Opin Biotechnol* 22(3):312–319
- Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G (2006) Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol* 24(12):549–556
- Huerta-Beristain G, Utrilla J, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Gosset G, Martínez A (2008) Specific ethanol production rate in ethanologenic *Escherichia coli* strain KO11 is limited by pyruvate decarboxylase. *J Mol Microbiol Biotechnol* 15(1):55–64
- Ingram LO, Aldrich HC, Borges ACC, Causey TB, Martínez A, Morales F, Saleh A, Underwood SA, Yomano LP, York SW, Zaldívar J, Zhou S (1999) Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnol Prog* 15(5):855–866
- Jose J, Meyer TF (2007) The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(4):600–619
- Jose J, Park M, Pyun JC (2010) *Escherichia coli* outer membrane with autodisplayed Z-domain as a molecular recognition layer of SPR biosensor. *Biosens Bioelectron* 25(5):1225–1228
- Jose J, Zangen D (2005) Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 333(4):1218–1226
- Kaessler A, Olgen S, Jose J (2011) Autodisplay of catalytically active human hyaluronidase hPH-20 and testing of enzyme inhibitors. *Eur J Pharm Sc* 42(1–2):138–147
- la Grange DC, den Haan R, van Zyl WH (2010) Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms. *App Microbiol Biotechnol* 87(4):1195–1208
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685
- Lattemann CT, Maurer J, Gerland E, Meyer TF (2000) Auto-display: functional display of active β -lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J Bacteriol* 182(13):3726–3733
- Martinez A, York SW, Yomano LP, Pineda LP, Davis FC, Shelton JC, Ingram LO (1999) Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdc*, *adhB*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 15(5):891–897
- Martinez A, Grabar TB, Shanmugam KT, Yomano LP, York SW, Ingram LO (2007) Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnol Lett* 29(3):397–404
- Martínez Jiménez A, Gosset Lagarda G, Hernández Chávez G, Huerta Beristain G, Trujillo Martínez B, Utrilla Carreri J (2010) Strains of *Escherichia coli* modified by metabolic engineering to produce chemical compounds from hydrolyzed lignocellulose,

- pentoses, hexoses and other carbon sources. WO Patent WO2011/016706A2
24. Maurer J, Jose J, Meyer TF (1997) Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179(3): 794–804
 25. Maurer J, Jose J, Meyer TF (1999) Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J Bacteriol* 181(22): 7014–7020
 26. McBride JE, Zietsman JJ, Van Zyl WH, Lynd LR (2005) Utilization of cellobiose by recombinant β -glucosidase-expressing strains of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evaluation of the sufficiency of expression. *Enzyme Microb Technol* 37(1):93–101
 27. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31(3):426–428
 28. Moniruzzaman M, Lai X, York SW, Ingram LO (1997) Isolation and molecular characterization of high-performance cellobiose-fermenting spontaneous mutants of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 containing the *Klebsiella oxytoca casAB* operon. *Appl Environ Microbiol* 63(12):4633–4637
 29. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 96(6): 673–686
 30. Orenco-Trejo M, Utrilla J, Fernández-Sandoval MT, Huerta-Beristain G, Gosset G, Martinez A (2010) Engineering the *Escherichia coli* fermentative metabolism. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 121:71–107
 31. Orenco-Trejo M, Flores N, Escalante A, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Gosset G, Martinez A (2008) Metabolic regulation analysis of an ethanologenic *Escherichia coli* strain based on RT-PCR and enzymatic activities. *Biotechnol Biofuels* 1(1):8
 32. Puente JL, Juárez D, Bobadilla M, Arias CF, Calva E (1995) The *Salmonella ompC* gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene* 156(1):1–9
 33. Ryu S, Karim MN (2011) A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates. *Appl Microbiol Biotechnol* 91(3):529–542
 34. Sambrook J, Russell D (2001) Molecular cloning a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
 35. Somerville C (2007) Biofuels. *Curr Biol* 17(4):R115–R119
 36. Spiridonov NA, Wilson DB (2001) Cloning and biochemical characterization of BglC, a β -glucosidase from the cellulolytic actinomycete *Thermofibida fusca*. *Curr Microbiol* 42(4):295–301
 37. Tanaka T, Kawabata H, Ogino C, Kondo A (2011) Creation of a cellooligosaccharide-assimilating *Escherichia coli* strain by displaying active beta-glucosidase on the cell surface via a novel anchor protein. *Appl Environ Microbiol* 77(17):6265–6270
 38. Vinuselvi P, Lee SK (2011) Engineering *Escherichia coli* for efficient cellobiose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol* 92(1):125–132
 39. Yomano LP, York SW, Zhou S, Shanmugam KT, Ingram LO (2008) Re-engineering *Escherichia coli* for ethanol production. *Biotechnol Lett* 30(12):2097–2103
 40. Zhou S, Yomano LP, Saleh AZ, Davis FC, Aldrich HC, Ingram LO (1999) Enhancement of expression and apparent secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase (encoded by *celZ*) in *Escherichia coli* B. *Appl Environ Microbiol* 65(6):2439–2445

ANEXO 2

En el presente anexo se muestra el manuscrito de revisión sometido para su publicación en la revista "Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology" con fecha 10 de noviembre del 2012.

Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology
Polysaccharide Hydrolysis with Engineered Escherichia coli for the Production of Biocommodities
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Polysaccharide Hydrolysis with Engineered Escherichia coli for the Production of Biocommodities
Article Type:	Review
Corresponding Author:	Alfredo Martinez, Ph.D. Universiada Nacional Autonoma de Mexico Cuernavaca, Morelos MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universiada Nacional Autonoma de Mexico
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Iván Muñoz-Gutiérrez, Ph.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Iván Muñoz-Gutiérrez, Ph.D. Alfredo Martinez, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Escherichia coli can ferment a broad range of sugars, including pentoses, hexoses, uronic acids and polyols. These features make E. coli a suitable microorganism for the development of biocatalysts to be used in the production of biocommodities and biofuels by metabolic engineering. E. coli cannot directly ferment polysaccharides because it does not produce and secrete the necessary saccharolytic enzymes; however, there are many genetic tools that can be used to confer this ability on this prokaryote. The construction of saccharolytic E. coli strains will reduce costs and simplify the production process because the saccharification and fermentation can be conducted in a single reactor with a reduced concentration or absence of additional external saccharolytic enzymes. Recent advances in metabolic engineering, surface display and excretion of hydrolytic enzymes provide a framework for developing E. coli strains for the so-called consolidated bioprocessing. This review presents the different strategies toward the development of E. coli strains that have the ability to display and secrete saccharolytic enzymes to hydrolyze different sugar-polymeric substrates and reduce the loading of saccharolytic enzymes.
Suggested Reviewers:	Joy Doran-Peterson, Ph.D. University of Georgia jpeterso@uga.edu Expert in the production of biocommodities with E. coli Mercedes Ballesteros, Ph.D. Biofuels Unit - CIEMAT, Madrid Spain m.ballesteros@ciemat.es Expert in cellulose hydrolysis Shengde Zhou, Ph.D. Northern Illinois University, DeKalb, IL szhou@niu.edu Expert in E. coli molecular biology
Opposed Reviewers:	

Polysaccharide Hydrolysis with Engineered *Escherichia coli* for the Production of Biocommodities

Iván Muñoz-Gutiérrez, Alfredo Martínez

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. A. P. 510-3. 62250 Cuernavaca, Mor., México

Corresponding author:

Dr. Alfredo Martínez,
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 510-3. 62250 Cuernavaca,
Mor., México.

E. mail: alfredo@ibt.unam.mx

Tel: +52+777+329 1601

Fax: +52+777+317 2388

Abstract

Escherichia coli can ferment a broad range of sugars, including pentoses, hexoses, uronic acids and polyols. These features make *E. coli* a suitable microorganism for the development of biocatalysts to be used in the production of biocommodities and biofuels by metabolic engineering. *E. coli* cannot directly ferment polysaccharides because it does not produce and secrete the necessary saccharolytic enzymes; however, there are many genetic tools that can be used to confer this ability on this prokaryote. The construction of saccharolytic *E. coli* strains will reduce costs and simplify the production process because the saccharification and fermentation can be conducted in a single reactor with a reduced concentration or absence of additional external saccharolytic enzymes. Recent advances in metabolic engineering, surface display and excretion of hydrolytic enzymes provide a framework for developing *E. coli* strains for the so-called consolidated bioprocessing. This review presents the different strategies toward the development of *E. coli* strains that have

the ability to display and secrete saccharolytic enzymes to hydrolyze different sugar-polymeric substrates and reduce the loading of saccharolytic enzymes.

Keywords

Escherichia coli; Metabolic engineering; Biocommodities; Polysaccharides; Saccharolytic enzymes secretion

Introduction

Currently, the world is facing the end of the availability of abundant and cheap oil [8, 60, 61, 70]. Several countries are hungry for energy and the global oil production has reached its peak [8, 60, 61, 70]. Additionally, the pollution produced by burning fossil fuels has caused a massive accumulation of greenhouse gases in the atmosphere [37]. For these reasons, it is imperative to produce chemicals from renewable and environmentally friendly resources. One such option is the transformation of sugars by fermentation processes into metabolites that can replace petrochemicals [18].

Lignocellulose, the most abundant biopolymer on earth, is a material rich in fermentable sugars [88]. The transformation and use of this biopolymer does not compete with the chain production of foods. Among others, lignocellulose can be obtained from agricultural and forest residues, waste paper and dedicated lignocellulosic crops [25, 30, 53]. The lignocellulose structure is principally composed of three fractions: cellulose, hemicellulose and lignin [50, 75]. However, some lignocellulosic materials, such as sugar beet pulp, citrus peel and apple pomace, can also contain an important fraction of pectin [19]. Another good source of fermentable sugars is seaweed, which has the advantage that its production does not require arable land and fresh water; furthermore, lignin is present only in small amounts or is absent in this material [35, 39]. Although some seaweeds are farmed extensively in China, Japan and Korea for human consumption, there are many species that are not used for feed or food production and can potentially be used for the production of biocommodities [45, 84]. The carbohydrates that are found in seaweed are alginate, agar, ulvan, laminarin, mannitol, starch and cellulose [51, 72].

To release the fermentable sugars in lignocellulose, the biomass is first subjected to a pretreatment process with the aim of making the carbohydrate polymers more accessible to the enzymes during the saccharification process, which is performed in some cases to hydrolyze a portion of the sugar polymers [14, 58, 59]. The pretreatment can be physical, chemical or a combination of both and will determine the optimal enzyme mixture required in the next step [14, 58, 59]. After pretreatment, the solids from the biomass are squeezed, washed and conditioned for the saccharification process, whereupon the polymers are hydrolyzed by the synergistic action of cellulases and β -glucosidases [9, 50]. If necessary, the enzymatic cocktail can be enriched with accessory enzymes, such as xylanases, β -xylosidases, esterases, arabinosidases, pectinases, etc. [1, 6, 14, 26]. Additionally, the accessibility of cellulose to cellulases can be enhanced by the addition of non-hydrolyzing proteins that promote amorphogenesis [2] such as swollenins [12, 43]. In the case of seaweeds, the low content or absence of lignin allows for the release of some sugars with water after milling or crushing the biomass [35, 85]. The polymeric sugars can then be hydrolyzed with alginate lyases, laminarases, amylases, cellulases, etc. [65, 85]. The hydrolysis of lignocellulose and seaweed produces a wide variety of fermentable sugars including hexoses, such as glucose, mannose and galactose and pentoses, such as xylose and arabinose [50, 51, 72]. The hydrolysis of pectin-rich biomass and seaweeds also produces rhamnose, mannitol, and uronic acids, such as galacturonic, mannuronic and guluronic acids [19, 51, 72].

Escherichia coli is a Gram-negative bacterium that has the ability to ferment a broad range of substrates, including pentoses, hexoses, uronic acids and polyols [15, 38, 67]. Non-pathogenic, industrial and laboratory *E. coli* strains can grow in mineral salt media without complex supplements [21, 56, 68, 82]. Although it is known that many of the toxic compounds that are formed during lignocellulose pretreatment can inhibit the fermentation performance of *E. coli* [29, 57], at present, there are reports of some engineered strains that are able to directly ferment the sugars obtained from the pretreated biomass even in the presence of toxic compounds such as hydroxymethylfurfural, furfural and acetate [21, 28, 29]. From the microbiological, physiological and genetic points of view, *E. coli* is a well-known microorganism. A wide array of genetic tools are available to facilitate its genetic

modification and this microorganism is widely used on an industrial scale to produce several biotechnological products [15]. For these reasons, *E. coli* has been the target of metabolic engineering for the production of commodity fuels and chemicals that can replace petrochemicals such as ethanol [21, 36, 68], butanol [7, 17, 27], lactate [81, 82], succinate [89], fatty alcohols [17, 79], fatty acids [17], fatty esters (biodiesel) [7, 79], pinene [7], methyl ketones [71], etc. To reduce costs and simplify the production process, a microorganism with the capacity to secrete saccharolytic enzymes and to ferment whole sugars into wanted biocommodities is required [66]. This idea was first presented in 1936 by Veldhuis et al. [83]. It was first designated as Direct Microbial Conversion (DMC) [34] and later renamed Consolidated Bioprocessing (CBP) by Lynd [55]. By taking advantage of the aforementioned characteristics of *E. coli*, this microorganism is a good candidate for CBP.

Although *E. coli* can ferment a broad range of sugars, it cannot hydrolyze polymeric sugars or oligosaccharides, such as cellodextrins or xylodextrins. This limitation has motivated the development of strategies for the secretion of saccharolytic enzymes to produce biocommodities directly from structural and storage sugars (*i.e.*, without the addition of an exogenous saccharifying catalyst). The secretion of heterologous and homologous hydrolytic enzymes has many advantages. These enzymes have free access to insoluble substrates because cellulose and soluble oligosaccharides can be hydrolyzed without the need to cross the cell envelope. If the enzymes are attached to the cell surface, the biocatalyst becomes more stable. It can then be recovered with the cells for subsequent fermentations or saccharification processes. In the present review, we discuss the strategies that various research groups are developing for conducting CBP with *E. coli*. Specifically, we describe the state-of-the-art strategies for the secretion of saccharolytic enzymes.

Cell surface display of saccharolytic enzymes

The cell surface display of heterologous proteins has many biotechnological applications. These applications include the development of live vaccines [11, 52, 64], bioadsorbents for the removal of harmful chemicals and heavy metals [5, 86], high throughput screening of enzyme libraries [46, 54] and whole-cell biocatalysts [62, 76, 78, 80], among other

applications. Currently, the attaching of saccharolytic enzymes to *E. coli* for the hydrolysis of non-natural substrates is becoming more relevant for the production of biocommodities, especially for the secretion of enzymes involved in the depolymerization of low-cost polysaccharides [62, 76, 78, 80]. The cell surface is associated with the use of outer membrane proteins (OMP) as carriers. The passenger protein (secreted enzyme) is fused by its N- or C- terminus to the OMP, and when the chimeric protein arrives in the periplasmic space, the passenger protein is translocated across the outer membrane and anchored with the OMP (Figs. 1 and 2). Table 1 summarizes the reports and applications of the cell surface display of saccharolytic enzymes.

Surface display using Outer Membrane Proteins (OMPs) from *E. coli*

An important characteristic of OMPs is their β -barrel structure, which is formed by anti-parallel transmembrane β -strands joined by loops [48]. In addition to their function as structural components, virulence factors and porins, OMPs are receptors of many phages [48]. Early studies with phage OMP-resistant mutants showed that mutations occurred in very specific areas, which suggests that these zones are cell surface-exposed loops that can be targets for the cell surface display of peptides or proteins [11, 24]. With this in mind, Freudl et al. [24] and Charbit et al. [10] fused a peptide by its N- and C-termini to an external loop of the OMPs OmpA and LamB, respectively. This sandwich conformation resulted in the presentation of the peptide at the cell surface (Fig. 1A). The use of surface-exposed loops is restricted to small peptides because the insertion of large peptides or proteins can affect the assembly of the carrier protein into the outer membrane [91]. However, this strategy opened the door for the development of live vaccines by displaying epitopes [11, 52, 64]. These pioneering works served as the starting point of bacterial surface display.

To display a complete protein, Francisco et al. [22] developed a secretion system consisting of the signal peptide and the first nine amino acids of the lipoprotein Lpp that was linked to five of the eight membrane-spanning loops of OmpA (Fig. 1B). In this case, the passenger protein was fused by its N-terminus to the C-terminus of Lpp-OmpA. This construction allowed for the display of the first saccharolytic enzyme in *E. coli*, the *Cellulomonas fimi*

exoglucanase Cex [23]. Recently, the OMP Blc was used to display the *Thermobifida fusca* β -glucosidase BglC [78, 80]. This enzyme was fused by its N- or C-terminus and secreted in an active form [80]. An engineered *E. coli* strain, which expressed the same system, hydrolyzed and fermented cellobiose into isopropanol [78].

Surface display using OMPs from other microorganisms

One of the most popular carriers for cell surface display in *E. coli* is the ice-nucleation protein (INP) from *Pseudomonas syringae*. This OMP is produced from ice-nucleation-active bacteria such as *P. syringae*, *Xanthomonas campestris* and *Erwinia herbicola*. It catalyzes the formation of ice on supercooled water [42, 44]. The first studies performed with INP expressed in *E. coli* demonstrated that the protein retains its function [69], which introduces the possibility of using INP as a carrier for the cell surface display of heterologous proteins. The structure of INP consists of three domains: the N-terminal hydrophobic domain, which interacts with the OM to attach the INP to the cell surface; the central hydrophilic repeated domain, which catalyzes the ice nucleation; and the C-terminal hydrophilic domain [42, 44]. To display a heterologous protein using this system, the N-terminal domain of the protein is fused with the C-terminal domain of the INP (Fig 1C). Additionally, the internal repeated domain can be modulated in length, allowing the passenger protein to move further from or closer to the outer membrane (Fig. 1C) [42]. *P. syringae* INP has been used for the secretion of *Bacillus subtilis* carboxymethylcellulase [42, 46] and *Clostridium phytofermentans* endoglucanase [54]. However, its principal application is for the high throughput screening of glucanase libraries [46, 54].

PgsA is a protein that has been implicated in the synthesis of poly- γ -glutamate (PGA), a polymer produced from *B. subtilis* [4]. When PgsA was heterologously expressed in *E. coli*, the protein was detected in a cell membrane preparation [3]. With the use of PgsA as a carrier for cell surface display, Narita et al. [63] developed a secretion system that allows for the N-terminus fusion of the *Streptococcus bovis* α -amylase. The attachment of *C. fimi* xylanase Cex to PgsA results in increased enzyme stability [13]. The cell surface display of Cex increased the thermal stability of this enzyme and its activity over a broader pH range relative to the soluble enzyme [13]. Finally, PgsA was used for attaching a *Clostridium*

cellulolyticum endocellulase, exocellulase and β -glucosidase to the cell surface of an ethanologenic *E. coli* strain, which allowed for the direct fermentation of pretreated corn stover cellulose into ethanol [76].

Surface display via the Type V (autotransporter) system

The autotransporter system that belongs to the type V secretion system is considered to be the simplest secretion system among Gram-negative bacteria [16, 33]. The complete information for protein secretion is contained within a single gene that produces a multidomain pre-protein that consists of an N-terminal signal peptide (SP), a passenger protein and a C-terminal translocation unit (TU) (Fig. 2A) [16, 41]. The SP directs the pre-protein into the periplasmic space where it is cleaved by a signal peptidase. Subsequently, the passenger protein is translocated across the outer membrane by the TU, which is formed by a linker region and a β -barrel (at the C-terminus). The linker region anchors the passenger protein to the cell surface; in some cases, autotransporters process the passenger protein after it has been translocated, thereby releasing the protein into the milieu (Fig. 2B) [16]. To display a heterologous protein, the native sequence of the passenger protein is replaced with the heterologous protein sequence. The first autotransporter described was the immunoglobulin A1 (IgA1) protease of *Neisseria gonorrhoeae* [73] and this transporter was also the first autotransporter used for the cell surface display of a heterologous protein in *E. coli* [47]. However, the most commonly used autotransporter for displaying heterologous proteins is the adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I) of *diarrheagenic E. coli* [40, 41]. Recently, Muñoz et al. [62] used AIDA-I to attach the *T. fusca* β -glucosidase BglC in an ethanologenic *E. coli* strain for the hydrolysis and fermentation of cellobiose to ethanol.

Secretion of saccharolytic enzymes into the milieu

Non-complexed saccharolytic enzymes are secreted by their native organism to permit the hydrolysis of insoluble substrates. Additionally, cellulases and xylanases have carbohydrate-binding domains (CBDs) that allow these enzymes to be adsorbed onto insoluble substrates, thus bringing the catalytic domain into close proximity with the

substrate. These characteristics might allow similar secretion systems in *E. coli* to be developed to improve the hydrolysis process of polymeric sugars for the production of biocommodities.

Secretion using the Type II and Type V (autotransporter) system

Ag43 is an *E. coli* autotransporter encoded by the *flu* gene that confers the autoaggregation phenotype, and it is produced by many strains, including non-pathogenic species [92]. Although the passenger protein of Ag43 is cleaved after it has been translocated across the outer membrane (OM), this protein remains bound to the TU via noncovalent interactions [32, 92]. An aspartyl protease active site within the passenger protein has been postulated to be the site responsible for the autocleavage of the passenger protein (Fig. 2B) [32, 85]. To secrete *Pseudoalteromonas sp.* SM0524 alginate lyase (Aly) into the milieu, Wargacki et al. [85] replaced the TU with the *aly* gene while maintaining the aspartyl protease active site sequence (Fig. 2B and 2C). This construction was used for the fermentation of alginate from brown macroalgae into ethanol with an engineered *E. coli* strain [85].

Unlike the autotransporter system, the type II secretion system (T2SS) is a complex structure that contains 12-15 different proteins and spans both the inner and outer membranes [49] (Fig. 3). The passenger proteins have an N-terminal signal peptide that directs the protein to the periplasmic space where the protein is folded and subsequently translocated across the outer membrane via the T2SS apparatus [49] (Fig. 3). *Erwinia chrysanthemi* is a plant pathogen and Gram-negative bacteria that secretes a battery of cell wall-degrading enzymes using the Out system, which belongs to the T2SS [31]. When the *E. chrysanthemi* out genes are cloned in *E. coli*, it is possible to drive the secretion of four pectate lyase isozymes [31], an exo-poly- α -D-galacturonosidase [31], a pectin methylesterase [31] and an endoglucanase [90] into the milieu, all of which are from the same microorganism. Edwards et al. [20] engineered an ethanologenic *E. coli* strain with the *E. chrysanthemi* out genes for the secretion of a pectate lyase and an oligogalacturonide lyase from the same bacterium. This allowed for the fermentation of sugar beet pulp into ethanol [20]. A limitation of the T2SS is the high specificity of its target proteins, even for

closely related bacteria. The *E. chrysanthemi* T2SS cannot secrete proteins from the *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* T2SS [31].

Secretion using extracellular proteins as carriers

As OMPs can be used as carriers for cell surface display, extracellular proteins can be used as carriers for secreting enzymes into the milieu. YebF is an *E. coli* protein of unknown function that is secreted into the medium [87]. To study the secretion of YebF, Zhang et al. [87] fused the *B. subtilis* X-23 α -amylase to the C-terminus of YebF and discovered that most of the activity observed was detected in the medium. However, a more popular carrier is the osmotically inducible protein Y (OsmY), which was identified in an extracellular proteome analysis of *E. coli* by Qian et al. [74]. The potential of this carrier was demonstrated using the secretion of an *E. coli* alkaline phosphatase, a *B. subtilis* α -amylase and a human leptin; all of these proteins were fused by their N-termini to OsmY [74]. Subsequently, the application of OsmY in the production of biocommodities was demonstrated by the secretion of the *Clostridium stercoarium* endoxylanase catalytic domain and the *Bacteroides ovatus* xylanase for the hydrolysis of xylan and the production of fatty acid ethyl esters [79]. The hydrolysis of switchgrass for the production of butanol, pinene and fatty-acid ethyl esters was achieved via the secretion of the OsmY from *Bacillus* sp. D04 endocellulase and the *C. stercoarium* endoxylanase catalytic domain in a metabolically engineered *E. coli* strain that also expressed the *Cellvibrio japonicus* β -glucosidase and xylobiosidase [7]. Furthermore, Zheng et al. [89] studied the hydrolysis of xylan for succinate production by combining endoxylanases and xylosidases from many bacteria (table II); the best combination was the *Fibrobacter succinogenes* endoxylanase with the *Fusarium graminearum* xylosidase. To improve xylan hydrolysis, the *B. subtilis* α -arabinofuranosidase was also secreted using OsmY as the protein carrier in several constructions.

Secretion by increasing Outer Membrane permeability

Outer membrane leakage has been employed as a strategy of protein secretion instead of using secretion pathways or protein carriers [77]. An *E. coli* mutant that does not produce

the lipoprotein Lpp was used for the secretion of *Bacillus halodurans* C-125 xylanase and *Clostridium thermocellum* cellulase [77]. The enzymes were directed to the periplasmic space where they were subsequently secreted into the milieu as a result of the increased outer membrane leakage caused by the absence of Lpp [77]. However, the main disadvantage of this strategy is the damage to the cell envelope, which makes the cells more susceptible to any toxic compound present in the medium and/or to the produced biocommodity.

Conclusions

The secretion of heterologous proteins by *E. coli* has been a challenge since the beginning of biotechnology. However, this topic has reappeared for the development of CBP with *E. coli*. Many of the renewable sources of sugars are in polymeric forms and cannot cross the cell envelope. Therefore, these sugars must be enzymatically depolymerized into fermentable sugars. Although nonpathogenic laboratory strains of *E. coli* are not good protein secretors, many strategies have been developed to overcome this issue. Moreover, the secretion of saccharolytic enzymes and the production of biocommodities directly from polymeric sugars using *E. coli* has been already demonstrated. In the near future, some of these technologies will reach commercial scale.

Acknowledgements

This work was supported by the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) technological innovation grants: PETRAMIN 2010-13879, 2011-154298, and 2012-184417; and from the Universidad Nacional Autónoma de México: grant DGAPA/PAPIIT/UNAM IT200312. The authors wish to thank Drs. Guillermo Gosset and Ricardo Oropeza from the Instituto de Biotecnología and Jaime Ortega from CINVESTAV-IPN for many helpful discussions regarding the topic of this review.

References

1. Alvira P, Negro MJ, Ballesteros M (2011) Effect of endoxylanase and α -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded

- wheat straw. *Bioresour Technol* 102:4552–4558. doi: 10.1016/j.biortech.2010.12.112
2. Arantes V, Saddler JN (2010) Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels* 3:4. doi: 10.1186/1754-6834-3-4
 3. Ashiuchi M, Nawa C, Kamei T, Song JJ, Hong SP, Sung MH, Soda K, Misono H (2001) Physiological and biochemical characteristics of poly γ -glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* 268:5321–5328. doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02475.x
 4. Ashiuchi M, Soda K, Misono H (1999) A poly- γ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: gene cloning and biochemical analysis of poly- γ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. *Biochem Biophys Res Commun* 263:6–12. doi: 10.1006/bbrc.1999.1298
 5. Bae W, Mulchandani A, Chen W (2002) Cell surface display of synthetic phytochelatins using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation. *J Inorg Biochem* 88:223–227. doi: 10.1016/S0162-0134(01)00392-0
 6. Berlin A, Maximenko V, Gilkes N, Saddler J (2007) Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol Bioeng* 97:287–296. doi: 10.1002/bit.21238
 7. Bokinsky G, Peralta-Yahya PP, George A, Holmes BM, Steen EJ, Dietrich J, Soon Lee T, Tullman-Ercek D, Voigt CA, Simmons BA, Keasling JD (2011) Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pretreated switchgrass using engineered *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:19949–19954. doi: 10.1073/pnas.1106958108
 8. Campbell CJ, Laherrère JH (1998) The end of cheap oil. *Sci Am* 278:78–83
 9. Chandel AK, Chandrasekhar G, Silva MB, Silvério da Silva S (2012) The realm of cellulases in biorefinery development. *Crit Rev Biotechnol* 32:187–202. doi: 10.3109/07388551.2011.595385
 10. Charbit A, Boulain JC, Ryter A, Hofnung M (1986) Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface. *EMBO J* 5:3029–3037
 11. Charbit A, Sobczak E, Michel ML, Molla A, Tiollais P, Hofnung M (1987) Presentation of two epitopes of the preS2 region of hepatitis B virus on live recombinant bacteria. *J Immunol* 139:1658–1664

12. Chen X, Ishida N, Todaka N, Nakamura R, Maruyama J, Takahashi H, Kitamoto K (2010) Promotion of efficient saccharification of crystalline cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swol. *Appl Environ Microbiol* 76:2556–2561. doi: 10.1128/AEM.02499-09
13. Chen Y-P, Hwang I-E, Lin C-J, Wang H-J, Tseng C-P (2012) Enhancing the stability of xylanase from *Cellulomonas fimi* by cell-surface display on *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 112:455–463. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05232.x
14. Chen Y, Stevens MA, Zhu Y, Holmes J, Moxley G, Xu H (2012) Reducing acid in dilute acid pretreatment and the impact on enzymatic saccharification. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:691–700. doi: 10.1007/s10295-011-1068-7
15. Clomburg JM, Gonzalez R (2010) Biofuel production in *Escherichia coli*: the role of metabolic engineering and synthetic biology. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:419–434. doi: 10.1007/s00253-010-2446-1
16. Dautin N, Bernstein HD (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* 61:89–112. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093233
17. Dellomonaco C, Clomburg JM, Miller EN, Gonzalez R (2011) Engineered reversal of the β -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals. *Nature* 476:355–359. doi: 10.1038/nature10333
18. Du J, Shao Z, Zhao H (2011) Engineering microbial factories for synthesis of value-added products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:873–890. doi: 10.1007/s10295-011-0970-3
19. Edwards MC, Doran-Peterson J (2012) Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. *Appl Microbiol Biotechnol* 95:565–575. doi: 10.1007/s00253-012-4173-2
20. Edwards MC, Henriksen ED, Yomano LP, Gardner BC, Sharma LN, Ingram LO, Peterson JD (2011) Addition of genes for cellobiase and pectinolytic activity in *Escherichia coli* for fuel ethanol production from pectin-rich lignocellulosic biomass. *Appl Environ Microbiol* 77:5184–5191. doi: 10.1128/AEM.05700-11
21. Fernández-Sandoval MT, Huerta-Beristain G, Trujillo-Martinez B, Bustos P, González V, Bolivar F, Gosset G, Martinez A (2012) Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanologenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. *Appl Microbiol Biotechnol*. doi: 10.1007/s00253-012-4177-y

22. Francisco JA, Earhart CF, Georgiou G (1992) Transport and anchoring of β -lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 89:2713-2717
23. Francisco J, Stathopoulos C, Warren R, Kilburn D, Georgiou G (1993) Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains. Bio/Technology 11:491-495. doi: 10.1038/nbt0493-491
24. Freudl R, MacIntyre S, Degen M, Henning U (1986) Cell surface exposure of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. J Mol Biol 188:491-494
25. Fu C, Mielenz JR, Xiao X, Ge Y, Hamilton CY, Rodriguez M, Chen F, Foston M, Ragauskas A, Bouton J, Dixon RA, Wang Z-Y (2011) Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. Proc Natl Acad Sci U S A 108:3803-3808. doi: 10.1073/pnas.1100310108
26. Gao D, Uppugundla N, Chundawat SP, Yu X, Hermanson S, Gowda K, Brumm P, Mead D, Balan V, Dale BE (2011) Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. Biotechnol Biofuels 4:5. doi: 10.1186/1754-6834-4-5
27. Garza E, Zhao J, Wang Y, Wang J, Iverson A, Manow R, Finan C, Zhou S (2012) Engineering a homobutanol fermentation pathway in *Escherichia coli* EG03. J Ind Microbiol Biotechnol 39:1101-1107. doi: 10.1007/s10295-012-1151-8
28. Geddes CC, Mullinnix MT, Nieves IU, Peterson JJ, Hoffman RW, York SW, Yomano LP, Miller EN, Shanmugam KT, Ingram LO (2011) Simplified process for ethanol production from sugarcane bagasse using hydrolysate-resistant *Escherichia coli* strain MM160. Bioresour Technol 102:2702-2711. doi: 10.1016/j.biortech.2010.10.143
29. Geddes CC, Nieves IU, Ingram LO (2011) Advances in ethanol production. Curr Opin Biotechnol 22:312-319. doi: 10.1016/j.copbio.2011.04.012
30. Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G (2006) Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends Biotechnol 24:549-556. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.10.004
31. He SY, Lindeberg M, Chatterjee AK, Collmer A (1991) Cloned *Erwinia chrysanthemi* out genes enable *Escherichia coli* to selectively secrete a diverse family of heterologous proteins to its milieu. Proc Natl Acad Sci U S A 88:1079-1083
32. Henderson IR, Owen P (1999) The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of

- exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and oxyR. *J Bacteriol* 181:2132–2141
33. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:692–744. doi: 10.1128/MMBR.68.4.692-744.2004
 34. Hogsett D, Ahn H, Bernardez T, South C, Lynd L (1992) Direct microbial conversion. *Appl Biochem Biotechnol* 34/35:527–541. doi: 10.1007/BF02920576
 35. Horn SJ, Aasen IM, Ostgaard K (2000) Ethanol production from seaweed extract. *J Ind Microbiol Biotechnol* 25:249–254. doi: 10.1038/sj.jim.7000065
 36. Huerta-Beristain G, Utrilla J, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Gosset G, Martínez A (2008) Specific ethanol production rate in ethanologenic *Escherichia coli* strain KO11 is limited by pyruvate decarboxylase. *J Mol Microbiol Biotechnol* 15:55–64. doi: 10.1159/000111993
 37. IEA (2007) CO₂ Emissions from Fuel Combustion 1971-2005. Paris
 38. Jarboe LR, Grabar TB, Yomano LP, Shanmugan KT, Ingram LO (2007) Development of ethanologenic bacteria. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 108:237–261. doi: 10.1007/10_2007_068
 39. John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A (2011) Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresour Technol* 102:186–193. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.139
 40. Jose J, Maas RM, Teese MG (2012) Autodisplay of enzymes-Molecular basis and perspectives. *J Biotechnol* 161:92-103. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.04.001
 41. Jose J, Meyer TF (2007) The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:600–619. doi: 10.1128/MMBR.00011-07
 42. Jung HC, Park JH, Park SH, Lebeault JM, Pan JG (1998) Expression of carboxymethylcellulase on the surface of *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein. *Enzyme Microb Technol* 22:348–354. doi: 10.1016/S0141-0229(97)00224-X
 43. Jäger G, Girfoglio M, Dollo F, Rinaldi R, Bongard H, Commandeur U, Fischer R, Spiess AC, Büchs J (2011) How recombinant swollenin from *Kluyveromyces lactis* affects cellulosic substrates and accelerates their hydrolysis. *Biotechnol Biofuels* 4:33. doi: 10.1186/1754-6834-4-33

44. Kawahara H (2002) The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteria. *J Biosci Bioeng* 94:492–496. doi: 10.1016/S1389-1723(02)80185-2
45. Kim NJ, Li H, Jung K, Chang HN, Lee PC (2011) Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. *Bioresour Technol* 102:7466–7469. doi: 10.1016/j.biortech.2011.04.071
46. Kim YS, Jung HC, Pan JG (2000) Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants. *Appl Environ Microbiol* 66:788–793
47. Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1992) Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga beta-mediated outer membrane transport. *EMBO J* 11:2327–2335.
48. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 37:239–253. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x
49. Korotkov KV, Sandkvist M, Hol WGJ (2012) The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* 10:336–351. doi: 10.1038/nrmicro2762
50. Kumar R, Singh S, Singh OV (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:377–391. doi: 10.1007/s10295-008-0327-8
51. Lahaye M, Robic A (2007) Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* 8:1765–1774. doi: 10.1021/bm061185q
52. Lee JS, Shin KS, Pan JG, Kim CJ (2000) Surface-displayed viral antigens on *Salmonella* carrier vaccine. *Nat Biotechnol* 18:645–648. doi: 10.1038/76494
53. Li H, Foston MB, Kumar R, Samuel R, Gao X, Hu F, Ragauskas AJ, Wyman CE (2012) Chemical composition and characterization of cellulose for Agave as a fast-growing, drought-tolerant biofuels feedstock. *RSC Adv* 2:4951–4958. doi: 10.1039/c2ra20557b
54. Liu W, Zhang X-Z, Zhang Z, Zhang Y-HP (2010) Engineering of *Clostridium phytofermentans* Endoglucanase Cel5A for improved thermostability. *Appl Environ Microbiol* 76:4914–4917. doi: 10.1128/AEM.00958-10
55. Lynd LR (1996) Overview an evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy. *Annu Rev Energy Environ* 21:403–465. doi: 10.1146/annurev.energy.21.1.403

56. Martinez A, Grabar TB, Shanmugam KT, Yomano LP, York SW, Ingram LO (2007) Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnol Lett* 29:397–404. doi: 10.1007/s10529-006-9252-y
57. Mills TY, Sandoval NR, Gill RT (2009) Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnol Biofuels* 2:26. doi: 10.1186/1754-6834-2-26
58. Mittal A, Katahira R, Himmel ME, Johnson DK (2011) Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose: changes in crystalline structure and effects on enzymatic digestibility. *Biotechnol Biofuels* 4:41. doi: 10.1186/1754-6834-4-41
59. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 96:673–686. doi: 10.1016/j.biortech.2004.06.025
60. Murphy DJ, Hall CAS (2011) Energy return on investment, peak oil, and the end of economic growth. *Ann N Y Acad Sci* 1219:52–72. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05940.x
61. Murray J, King D (2012) Climate policy: Oil’s tipping point has passed. *Nature* 481:433–435. doi: 10.1038/481433a
62. Muñoz-Gutiérrez I, Oropeza R, Gosset G, Martinez A (2012) Cell surface display of a β -glucosidase employing the type V secretion system on ethanologenic *Escherichia coli* for the fermentation of cellobiose to ethanol. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:1141–1152. doi: 10.1007/s10295-012-1122-0
63. Narita J, Okano K, Tateno T, Tanino T, Sewaki T, Sung M-H, Fukuda H, Kondo A (2006) Display of active enzymes on the cell surface of *Escherichia coli* using PgsA anchor protein and their application to bioconversion. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:564–572. doi: 10.1007/s00253-005-0111-x
64. Nhan NT, Gonzalez de Valdivia E, Gustavsson M, Hai TN, Larsson G (2011) Surface display of *Salmonella* epitopes in *Escherichia coli* and *Staphylococcus carnosus*. *Microb Cell Fact* 10:22. doi: 10.1186/1475-2859-10-22
65. Nobe R, Sakakibara Y, Fukuda N, Yoshida N, Ogawa K, Suiko M (2003) Purification and characterization of laminaran hydrolases from *Trichoderma viride*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:1349–1357. doi: 10.1271/bbb.67.1349
66. Olson DG, McBride JE, Shaw AJ, Lynd LR (2012) Recent progress in consolidated bioprocessing. *Curr Opin Biotechnol* 23:396–405. doi: 10.1016/j.copbio.2011.11.026

67. Orenco-Trejo M, Utrilla J, Fernández-Sandoval MT, Huerta-Beristain G, Gosset G, Martinez A (2010) Engineering the *Escherichia coli* fermentative metabolism. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 121:71–107. doi: 10.1007/10_2009_61
68. Orenco-Trejo M, Flores N, Escalante A, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Gosset G, Martinez A (2008) Metabolic regulation analysis of an ethanologenic *Escherichia coli* strain based on RT-PCR and enzymatic activities. *Biotechnol Biofuels* 1:8. doi: 10.1186/1754-6834-1-8
69. Orser C, Staskawicz BJ, Panopoulos NJ, Dahlbeck D, Lindow SE (1985) Cloning and expression of bacterial ice nucleation genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 164:359–366
70. Owen NA, Inderwildi OR, King DA (2010) The status of conventional world oil reserves—Hype or cause for concern? *Energy Policy* 38:4743–4749. doi: 10.1016/j.enpol.2010.02.026
71. Park J, Rodríguez-Moyá M, Li M, Pichersky E, San K-Y, Gonzalez R (2012) Synthesis of methyl ketones by metabolically engineered *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:1703–1712. doi: 10.1007/s10295-012-1178-x
72. Percival E (1979) The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. *Br Phycol J* 14:103–117. doi: 10.1080/00071617900650121
73. Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325:458–462. doi: 10.1038/325458a0
74. Qian Z-G, Xia X-X, Choi JH, Lee SY (2008) Proteome-based identification of fusion partner for high-level extracellular production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 101:587–601. doi: 10.1002/bit.21898
75. Rubin EM (2008) Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454:841–845. doi: 10.1038/nature07190
76. Ryu S, Karim MN (2011) A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:529–542. doi: 10.1007/s00253-011-3261-z
77. Shin H-D, Chen RR (2008) Extracellular recombinant protein production from an *Escherichia coli* lpp deletion mutant. *Biotechnol Bioeng* 101:1288–1296. doi: 10.1002/bit.22013
78. Soma Y, Inokuma K, Tanaka T, Ogino C, Kondo A, Okamoto M, Hanai T (2012) Direct isopropanol production from cellobiose by engineered *Escherichia coli* using

- a synthetic pathway and a cell surface display system. *J Biosci Bioeng* 114:80–85. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.02.019
79. Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, Hu Z, Schirmer A, McClure A, del Cardayre SB, Keasling JD (2010) Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature* 463:559–562. doi: 10.1038/nature08721
80. Tanaka T, Kawabata H, Ogino C, Kondo A (2011) Creation of a cellooligosaccharide-assimilating *Escherichia coli* strain by displaying active beta-glucosidase on the cell surface via a novel anchor protein. *Appl Environ Microbiol* 77:6265–6270. doi: 10.1128/AEM.00459-11
81. Utrilla J, Gosset G, Martinez A (2009) ATP limitation in a pyruvate formate lyase mutant of *Escherichia coli* MG1655 increases glycolytic flux to D-lactate. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:1057–1062. doi: 10.1007/s10295-009-0589-9
82. Utrilla J, Licon-Cassani C, Marcellin E, Gosset G, Nielsen LK, Martinez A (2012) Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for d-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. *Metab Eng* 14:469–476. doi: 10.1016/j.ymben.2012.07.007
83. Veldhuis MK, Christensen LM, Fulmer EI (1936) Production of ethanol: By thermophilic fermentation of cellulose. *Ind Eng Chem* 28:430–433. doi: 10.1021/ie50316a015
84. Wang X, Liu X, Wang G (2011) Two-stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation. *J Integr Plant Biol* 53:246–252. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.01024.x
85. Wargacki AJ, Leonard E, Win MN, Regitsky DD, Santos CNS, Kim PB, Cooper SR, Raisner RM, Herman A, Sivitz AB, Lakshmanaswamy A, Kashiwama Y, Baker D, Yoshikuni Y (2012) An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science* 335:308–313. doi: 10.1126/science.1214547
86. Yang C, Freudl R, Qiao C, Mulchandani A (2010) Cotranslocation of methyl parathion hydrolase to the periplasm and of organophosphorus hydrolase to the cell surface of *Escherichia coli* by the Tat pathway and ice nucleation protein display system. *Appl Environ Microbiol* 76:434–440. doi: 10.1128/AEM.02162-09
87. Zhang G, Brokx S, Weiner JH (2006) Extracellular accumulation of recombinant proteins fused to the carrier protein YebF in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 24:100–104. doi: 10.1038/nbt1174
88. Zhang Y-HP (2008) Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:367–375. doi: 10.1007/s10295-007-0293-6

89. Zheng Z, Chen T, Zhao M, Wang Z, Zhao X (2012) Engineering *Escherichia coli* for succinate production from hemicellulose via consolidated bioprocessing. *Microb Cell Fact* 11:37. doi: 10.1186/1475-2859-11-37
90. Zhou S, Yomano LP, Saleh AZ, Davis FC, Aldrich HC, Ingram LO (1999) Enhancement of expression and apparent secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase (encoded by celZ) in *Escherichia coli* B. *Appl Environ Microbiol* 65:2439–2445
91. van Bloois E, Winter RT, Kolmar H, Fraaije MW (2011) Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 29:79–86. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.11.003
92. van der Woude MW, Henderson IR (2008) Regulation and function of Ag43 (Flu). *Annu Rev Microbiol* 62:153–169. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162938

Tables

Table 1 Cell surface display of saccharolytic enzymes in *E. coli* and its applications

Anchor	Passenger protein(s)	Application	Source
<i>E. coli</i> Lpp-OmpA	<i>C. fimi</i> exoglucanase	Hydrolysis of cellulose	[23]
<i>E. coli</i> Blc	<i>T. fusca</i> β -glucosidase	Hydrolysis of cellobiose	[80]
<i>E. coli</i> Blc	<i>T. fusca</i> β -glucosidase	Isopropanol production from cellobiose	[78]
<i>E. coli</i> AIDA-I	<i>T. fusca</i> β -glucosidase	Ethanol production from cellobiose	[62]
<i>P. syringae</i> INP	<i>B. subtilis</i> carboxymethylcellulase	Hydrolysis of carboxymethylcellulose	[42]
<i>P. syringae</i> INP	<i>B. subtilis</i> carboxymethylcellulase	High throughput screening of enzyme libraries	[46]
<i>P. syringae</i> INP	<i>Clostridium phytofermentans</i> endoglucanase	High throughput screening of enzyme libraries	[54]
<i>B. subtilis</i> PgsA	<i>Streptococcus bovis</i> α -amylase	Cornstarch hydrolysis	[63]
<i>B. subtilis</i> PgsA	<i>Clostridium cellulolyticum</i> endocellulase, exocellulase and β - glucosidase	Ethanol production from corn stover cellulose	[76]
<i>B. subtilis</i> PgsA	<i>C. fimi</i> xylanase	Enhancing the stability of the enzyme	[13]

Table 2 Secretion of saccharolytic enzymes in *E. coli* and its applications

Secretion system	Passenger protein(s)	Application	Source
<i>E. coli</i> Ag43	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SM0524 alginate lyase	Ethanol production from brawn macroalgae	[85]
<i>E. chrysanthemi</i> out genes	<i>Erwinia chrysanthemi</i> pectate lyases isozymes, exo-poly- α -D-galacturonosidase and pectin methylesterase	Pectin hydrolysis	[31]
<i>E. chrysanthemi</i> out genes	<i>E. chrysanthemi</i> endoglucanase	Cellulose hydrolysis	[90]
<i>E. chrysanthemi</i> out genes	<i>E. chrysanthemi</i> pectate lyase PelE and oligogalacturonide lyase Ogl	Ethanol production from sugar beet pulp	[20]
<i>E. coli</i> OsmY	<i>B. subtilis</i> α -amylase	Starch hydrolysis	[74]
<i>E. coli</i> OsmY	<i>Clostridium stercoarium</i> endoxylanase catalytic domain and <i>Bacteroides ovatus</i> xylanase	Fatty-acid production from hemicellulose	[79]
<i>E. coli</i> OsmY	<i>Bacillus</i> sp. D04 endocellulase, <i>C. stercoarium</i> endoxylanase catalytic domain	Fatty-acid ethyl esters, butanol and pinene production from swithgrass	[7]
<i>E. coli</i> OsmY	<i>Fusarium graminearum</i> endoxylanase, <i>Clostridium stercoarium</i> endoxylanase, <i>Fibrobacter succinogenes</i> endoxylanase; <i>Bacteroides ovatus</i> xylosidase, <i>Bacillus pumilus</i> IPO xylosidase, <i>Selenomonas ruminantium</i> xylosidase, <i>F. graminearum</i> xylosidase and <i>B. subtilis</i> α -arabinofuranosidase	Succinate production from xylan	[89]
<i>E. coli</i> YebF	<i>B. subtilis</i> X-23 α -amylase	Starch hydrolysis	[87]

Figures

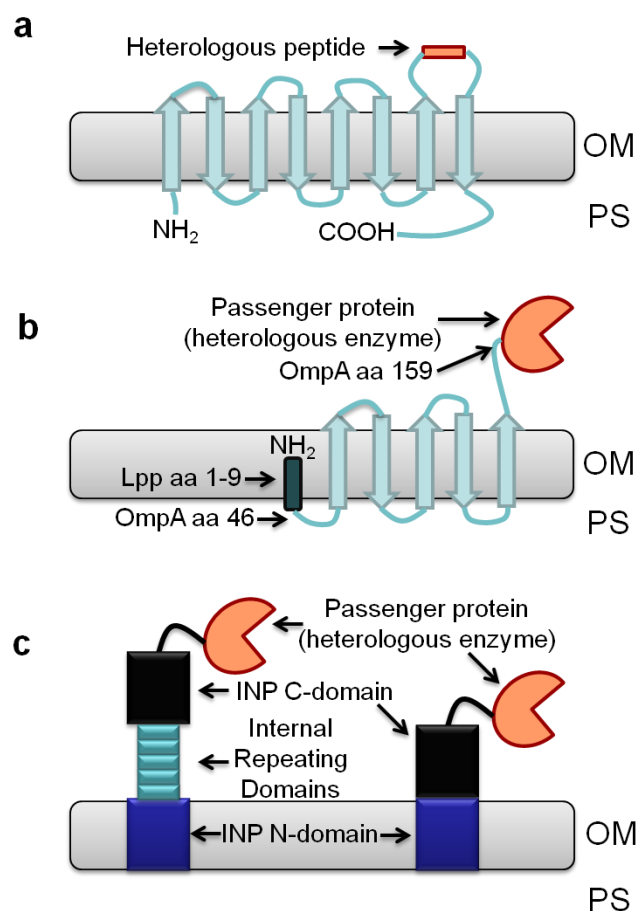


Fig. 1 Examples of cell surface displays. **a** Insertion of a heterologous peptide within a loop of OmpA [24]. The peptide is attached by its N- and C-termini in a sandwich conformation. **b** Attachment of a heterologous enzyme by its N-terminus to the hybrid protein Lpp-OmpA [22]. **c** Attachment of a heterologous enzyme by its N-terminus to the INP [42]. The internal repeating domains can be modulated in length or removed. OM, outer membrane; PS, periplasmic space; aa, amino acid; OmpA, outer-membrane protein A; Lpp, lipoprotein; INP, ice nucleation protein.

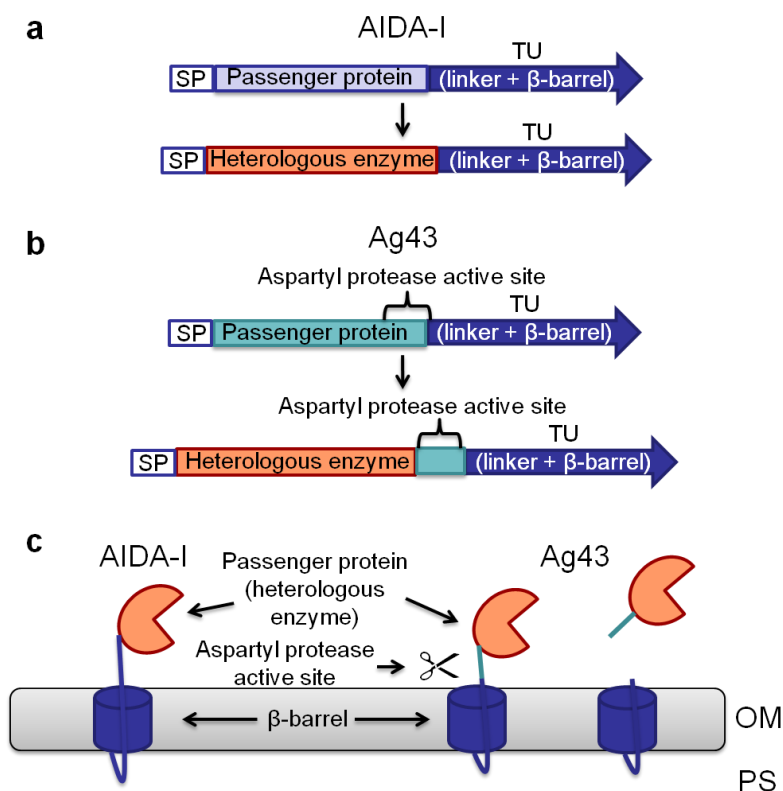


Fig. 2 Secretion of heterologous enzymes using the autotransporter pathway. **a** The structure of the AIDA-I pre-protein autotransporter multidomain. The complete native passenger protein is substituted by the heterologous enzyme [62]. **b** The structure of the multidomain Ag43 pre-protein autotransporter. The aspartyl protease active site remains after replacing the passenger protein with the heterologous enzyme to allow for the secretion of the enzyme into the milieu [85]. **c** When the protein arrives in the periplasmic space, the SP is cleaved and the β -barrel is embedded in the OM. Subsequently, the passenger protein is translocated across the OM and attached to the cell surface by its C-terminus via a linker (AIDA-I). Some autotransporters, such as Ag43, process the linker after the passenger protein is translocated, which releases the passenger protein into the milieu [85]. SP, signal peptide; TU, translocation unit; OM, outer membrane; PS, periplasmic space.

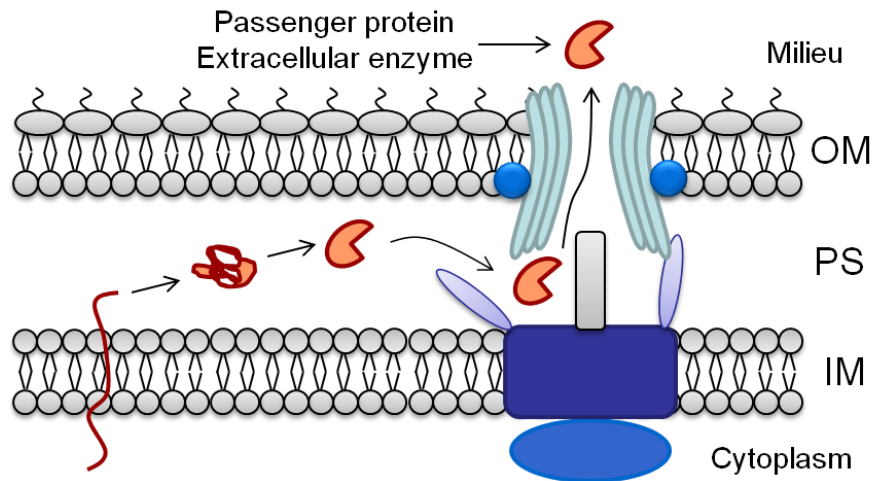


Fig. 3 Schematic representation of a type II secretion system. The passenger protein is folded in the PS and is subsequently secreted through the T2SS (type II secretion system) apparatus that consists of approximately 15 different proteins [49]. OM, outer membrane; PS, periplasmic space; IM, inner membrane.

ANEXO 3

En el presente anexo se muestra un manuscrito de divulgación que fue publicado en el Diario la Unión de Morelos por medio de la Academia de Ciencias de Morelos el 26 de diciembre del 2011.

EL ALCOHOL COMO BIOCOMBUSTIBLE. EL EJEMPLO BRASILEÑO.

Me en C Iván Muñoz Gutiérrez, Estudiante de Doctorado Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Dr. Alfredo Martínez Jiménez, Miembro de la Academia de Ciencias de Morelos, Investigador Titular del Instituto de Biotecnología de la UNAM Campus Morelos.

México es un país que depende altamente del petróleo como fuente de energía. El sector transporte es el mayor consumidor con una participación alrededor del 50% [ver referencia 1]. Sin embargo, el presente y futuro de este recurso es triste en el país. En 2004 PEMEX registró su máxima producción cercana a los 3.4 millones de barriles diarios y en los siguientes años inicio una disminución en este rubro [1]. Para el lapso de enero a septiembre de 2009, PEMEX produjo 2.6 millones barriles diarios, lo que representa una disminución en la producción del 23 % [1]. El decremento ha sido principalmente atribuido a la declinación de producción obtenida en la zona de Cantarell. Además, aunque México es productor de petróleo es un importador neto de petroquímicos. En el caso particular del sector transporte, en el 2001 se importó aproximadamente el 14% de las gasolinas consumidas en ese año, diez años después, en el 2011, este valor será cercano al 50%. Este sistema, de exportador de crudo e importador de gasolinas, constituye una ecuación incomprensible; además, por los precios del carburante en el territorio nacional, en el presente año esto representará un subsidio de alrededor de 170,000 millones de pesos. Aunado a esto, existen problemas serios de contaminación asociado a la explotación, refinación y uso del petróleo. Al liberar a la atmósfera el carbono que fue almacenado hace millones en lo profundo de la tierra, se ha creado un efecto invernadero, que está asociado al cambio climático mundial, el cual constituye un impacto global por el uso de

combustibles fósiles. A partir de la revolución industrial, las emisiones anuales del bióxido de carbono (CO_2) a la atmósfera se han incrementado de forma exponencial, siendo el sector transporte el segundo contribuyente mundial de este tipo de emisiones [2].

Una alternativa para solucionar estos problemas es la utilización de etanol carburante, uno de los alcoholes más simple que puede emplearse como combustible renovable en las máquinas de combustión interna actuales. De hecho, existen en el mercado mundial automóviles diseñados para funcionar con gasolina, etanol, gas o sus mezclas; este tipo de automóviles han sido denominados de combustible flexible (conocidos mundialmente como "Flex Fuel Cars"), y algunos de estos modelos son fabricados en el país. Uno de los países líderes en la producción de etanol carburante y uso de automóviles de combustible flexible es Brasil; donde en 2010 se produjeron en promedio 74 millones de litros diarios de etanol carburante y la comercialización de automóviles de combustible flexible representa actualmente más del 95 % de las ventas [3].

El proceso para producir etanol como combustible es básicamente el mismo que se emplea en la industria de bebidas alcohólicas. Los sacáridos (o azúcares) provenientes de biomasa vegetal son fermentados a etanol con microorganismos como las levaduras o bacterias etanológicas. En el caso de las bebidas alcohólicas, el etanol es parcialmente purificado y acondicionado para generar productos como la cerveza, ron, tequila, etc., con concentraciones de etanol que varían del 5 al 40% en volumen. Cuando el etanol es destinado para usarlo como combustible, este es destilado en varias etapas hasta alcanzar una concentración del 96%, para posteriormente eliminar la mayor cantidad de agua por un proceso de "secado" hasta lograr una concentración de etanol mayor al 99.5%.

La razón por la cual el etanol se considera un combustible renovable y amigable con el medio ambiente, es porque la materia prima para su producción es biomasa que se genera en los vegetales durante la fotosíntesis, al fijar energía solar y CO_2 atmosférico (ver Figura 1). Considerando únicamente el proceso de conversión de biomasa a etanol carburante, el CO_2 formado durante la combustión del etanol en los autos, vuelve a ser consumido por los vegetales, creando un ciclo artificial con una emisión neta de CO_2 a la atmósfera de cero. Sin embargo, es necesario considerar todas las etapas que constituyen la producción de la biomasa y el etanol para realizar un balance justo de reducción de emisiones netas de dióxido de carbono, lo cual constituye un análisis del ciclo de vida, para realizar un balance

justo de reducción de emisiones netas de CO₂, ya que durante la producción de la biomasa también se utilizan insumos que generan este gas. En comparación con el uso de gasolina, los resultados de análisis de ciclo de vida han demostrado que la producción y uso de etanol carburante a partir de maíz en los EUA y remolacha azucarera en Francia, existe una reducción neta de emisiones de gases efecto invernadero del 14 y 25% respectivamente. De manera sobresaliente, este valor es ligeramente mayor al 90% cuando se utiliza caña de azúcar con las tecnologías desarrolladas por Brasil. La clave en esta importante diferencia se debe en gran parte a la utilización de bio-fertilizantes, en lugar de fertilizantes químicos, durante el cultivo de la caña, y al empleo del bagazo de caña, biomasa que se obtiene después de exprimir la caña de azúcar, como combustible en calderas de alta eficiencia, diseñadas especialmente para quemar residuos orgánicos con alto contenido de humedad. La combustión eficiente del bagazo de caña permite obtener toda la energía de proceso, en forma de vapor, para los ingenios y destilerías, y además permite generar el 3% de toda la energía eléctrica que se produce en Brasil. En otras palabras, se utiliza energía renovable (vapor generado a partir del bagazo de caña) para generar etanol carburante renovable. Estas estrategias son clave cuando se comparan con el combustóleo o carbón mineral (combustibles fósiles) que se utilizan en las plantas de producción de etanol carburante en los EUA y Francia, respectivamente, y el uso de fertilizantes químicos para la producción de maíz y remolacha azucarera.

Aunque muchas personas piensan que la producción de biocombustibles es algo nuevo, debemos mencionar que Brasil tiene más de 35 años de experiencia produciendo bioetanol a partir de caña de azúcar; y este fue usado hace más de un siglo en Brasil y los EUA como biocombustible para alimentar autos de combustión interna de esa época (ver Figura 2). Después de la crisis petrolera de 1973 se generó un punto de referencia clave para los biocombustibles, el gobierno brasileño implementó el programa nacional del alcohol (PróAlcool), cuyo objetivo era aumentar la producción de etanol para emplearlo como combustible en automóviles y de esa forma reducir su dependencia petrolera del extranjero. Mediante subsidios a los productores de etanol e inversión para el desarrollo de ciencia y tecnologías en la industria del alcohol, los brasileños han hecho muy eficiente su industria alcoholera y han obtenido variedades de caña de azúcar muy productivas. Actualmente, sin más subsidios, llenar el tanque del automóvil con alcohol en Sao Paulo o

Rio de Janeiro, sale más barato que llenarlo con gasolina (ver Figura 3). Para el caso de los EUA, primer productor mundial de etanol, su industria posee altos subsidios y sus cultivos requieren de una gran cantidad de fertilizantes y pesticidas que provienen del petróleo.

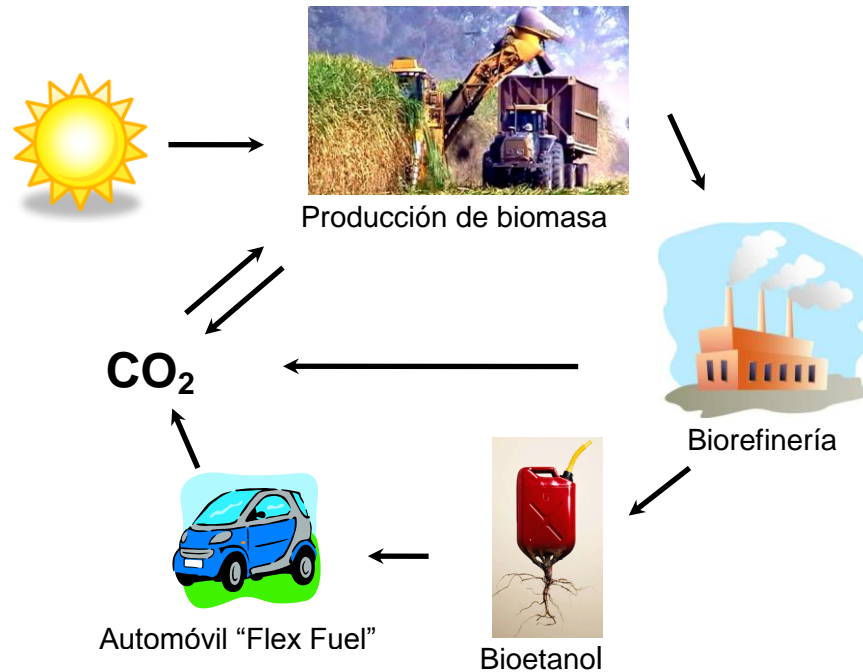


Figura 1. Ciclo del CO₂ en biocombustibles.



Figura 2. Automóvil antiguo de Brasil usando como combustible etanol y estación de combustible de etanol de inicios del siglo XX en los EUA.



Figura 3. Expendio de combustible en Sao Paulo, Brasil, con los precios de combustibles en 2010, incluyendo el de etanol carburante (Álcool en Portugués).

Las tecnologías para la producción de biocombustibles de primera generación (es decir, los que son producidos a partir de alimentos) están prácticamente en su madurez. Y a pesar de que no se pueden considerar 100% renovables, si son más amigables con el ambiente que los combustibles fósiles. Además, son la plataforma para el desarrollo de nuevas generaciones de biocombustibles.

Brasil ha demostrado que con programas a largo plazo y estrategias gubernamentales bien planteadas y planeadas, se pueden hacer las cosas bien, tanto en los ámbitos agrícolas, biotecnológicos, ambientales y energéticos, como en los de políticas públicas, sociales, empresariales, lo que permite la reducción de la emisión de gases efectos invernadero. No debemos esperar a que nuestros recursos petroleros se agoten para cambiar hacia biocombustibles. ¿Por qué no producir etanol a partir de maíz o azúcar de caña en México? Porque el maíz blanco es base de la alimentación de la mayor parte de la población mexicana y cada año se importan más de ocho millones de toneladas de maíz amarillo, que aunque no se usan directamente para alimentación de la población, si es empleado para la crianza de animales. En este contexto es imperante resolver primero la situación de seguridad alimentaria y después pensar en otras aplicaciones para este tipo de

granos. Por otro lado, los costos de producción de la caña de azúcar en México, desafortunadamente, son los más altos a nivel mundial (más de 50 dólares EUA por tonelada, contra 12 en Brasil, para el 2010). Además, los precios del maíz subieron drásticamente a inicios del 2007 como consecuencia de que los EUA están destinando cerca del 15% de su producción de maíz a la manufactura de etanol y a inicios de 2011 subieron más a causa de fuertes heladas en la zona de Sinaloa, el principal estado productor de maíz blanco en México. En consecuencia la producción de etanol carburante a partir de estas materias primas, actualmente para México, no es viable ni sustentable desde el punto de vista económico y de seguridad alimentaria. En consecuencia, para producir etanol en nuestro país se deben buscar otras alternativas de materias primas que no originen una competencia con su uso como alimento y sean viables desde el punto de vista económico, de desarrollo rural y de generación de empleos, entre otros. Nuestro país necesita desarrollar su propia tecnología que se adapte a sus necesidades para tener una transición planeada y sustentable hacia estos combustibles. En una siguiente aportación, a esta columna, se describirán alternativas de fuentes de materia prima y tecnologías para producir etanol carburante en México.

Bibliografía

1. Sistema de Información Energética. Secretaría de Energía México. Página web: <http://sie.energia.gob.mx/sie/bdiController>. Última consulta 17 de Noviembre de 2011.
2. Nobuo Tanaka (2007). CO2 Emission From Fuel Combustion 1971-2005. Agencia Internacional de Energía (IEA). Páginas XVII-XXIII.
3. Cledorvino Belini (2010). Anuario de la Industria Automovilística Brasileña. ANFAVEA, San Pablo, Brasil.

ANEXO 4

En el presente anexo se presenta el resumen de la participación en el "34th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals" realizado en "New Orleans, LA, USA" del 30 de abril al 3 de mayo del 2012. El trabajo se presentó de forma oral el 1 de mayo.

***Thermobifida fusca* β -glucosidase attachment to ethanologenic *Escherichia coli* outer membrane employing the type V secretion system**

Iván Muñoz-Gutiérrez, Guillermo Gosset, and Alfredo Martinez

The attachment of the β -glucosidase BglC from *Thermobifida fusca* to the outer membrane of the ethanologenic *Escherichia coli* strain MS04 (MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH$, $\Delta ldhA$, $PpflB::pdc_{Zm}-adhB_{Zm}$; evolved in the presence of xylose and acetate) was performed using the AIDA-I system, with the purpose to produce ethanol from cellobiose and to reduce the addition of cellulases from pre-treated agricultural residues. Whole cell protease treatment, SDS-PAGE and western blot analysis demonstrated that BglC was attached to the external surface of the outer membrane. *E. coli* MS04 transformed with plasmid pAIDABglCRHis fermented 40 g/L cellobiose in mineral medium in 60 hours with an ethanol yield of 81% of the theoretical maximum. This study shows the potential of BglC and the type V secretion system (AIDA-I) as tools in the lignocellulosic bio-commodities production.

ANEXO 5

En el presente anexo se presenta el resumen de la participación en el XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, realizado en Juriquilla, Querétaro, México, del 19 a 24 de junio del 2011. El trabajo se presentó de forma oral el 22 de junio.

Anclaje de la beta-glucosidasa de *Thermobifida fusca* en la membrana de *Escherichia coli* etanológica para metabolizar celobiosa a etanol

Iván Muñoz Gutiérrez, Luz María Martínez Mejía, Guillermo Gosset Lagarda y Alfredo Martínez Jiménez

Introducción

La Adhesina Involucrada en la Adherencia Difusa (AIDA-I) de *Escherichia coli* enteropatogénica, es una de las proteína autotransportadoras más estudiadas para la secreción de proteínas heterólogas (1). Al reemplazar la región del gen que codifica para la Adhesina por la secuencia de una proteína de interés, se obtiene un sistema que permite anclar en la membrana externa de *E. coli* la proteína heteróloga (1). Emplear este sistema para la secreción de β -glucosidasas en cepas de *E. coli* etanológicas permitiría producir etanol directamente de celobiosa. El objetivo del presente trabajo fue anclar la beta-glucosidasa (BglC) de *Thermobifida fusca* (activa a pH 7 y 37 °C; 2), utilizando el sistema AIDA-I, en una cepa etanológica de *E. coli* (3), para conferirle la capacidad de fermentar celobiosa a etanol.

Metodología

A partir de plásmidos disponibles (1, 2) se amplificaron el péptido señal (PS) el autotransportador AIDA-I, y el gen *bglC* de *Thermobifida fusca*. Los fragmentos se clonaron en pTrc99A (inducible por IPTG), generándose el plásmido pAIDABglCRHis. Para probar la funcionalidad del sistema, la cepa de *E. coli* etanológica (3) fue transformada con dicho plásmido y se cultivó en medio mineral con glucosa (2 g/L) y celobiosa (8 g/L). Para evaluar la producción de etanol, se utilizó medio mineral solo con

celobiosa (10 g/L) en mini-fermentadores sin aireación (pH 7, 37°C, 150 rpm) Los experimentos se realizaron por duplicado.

Resultados

Como se observa en la Figura 1, el control negativo (cepa etanológica sin el plásmido pAIDABglCRHis) dejó de crecer cuando se agotó la glucosa a las 10 horas, sin consumir celobiosa; mientras que las células con pAIDABglCRHis, presentaron un crecimiento diáxico, generando más del doble de células, y consumieron ambas fuentes de carbono. La Figura 2 muestra el crecimiento, consumo de celobiosa y producción de etanol. Las células crecieron a una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.067 h^{-1} , con una velocidad específica de consumo de celobiosa (q_s) de $1.28 \text{ g}_{\text{CELOBIOSA}} \text{ g}_{\text{CELULAS}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Estos valores reflejan de forma indirecta la actividad específica presente en el biocatalizador construido. Adicionalmente, una mayor expresión posiblemente genere una mayor velocidad de hidrólisis de celobiosa y por ende las células crecerían a una μ mayor. Los datos muestran que con una cantidad pequeña de células (0.02 a 0.5 g/L), se tiene un biocatalizador que permite hidrolizar y convertir 10 g/L de celobiosa en etanol con una eficiencia del 80% respecto al máximo teórico en 36 horas.

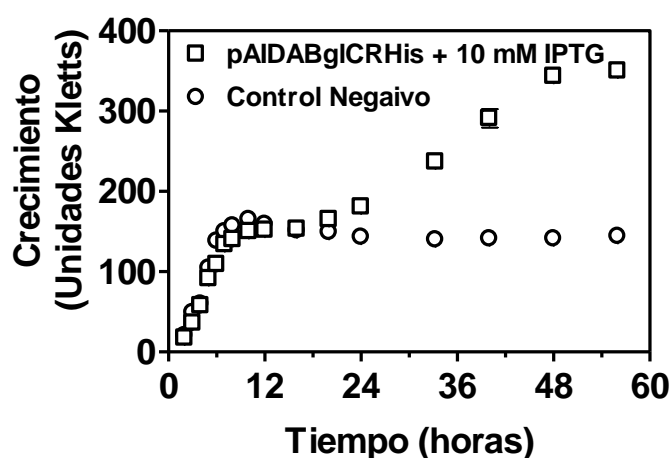


Figura 1. Cinética de crecimiento de *E. coli* etanológica transformada con el plásmido que le confiere la capacidad de anclar BglC en la membrana externa. Control negativo: *E. coli* etanológica transformada con pTrc99A.

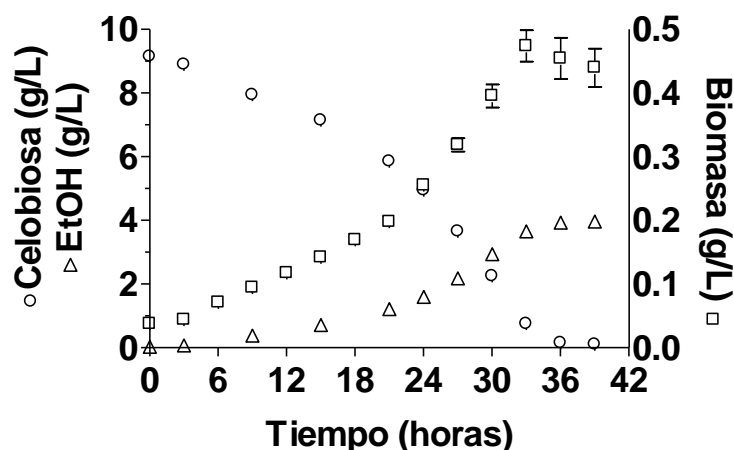


Figura 2. Cinética de crecimiento, consumo de celobiosas y producción de etanol con *E. coli* etanologénica transformada con pAIDABglCRHis.

Conclusiones

La proteína autotransportadora AIDA permitió anclar la BglC de *T. fusca* en la membrana externa de *E. coli* etanologénica. El correcto anclaje de BglC se comprobó fermentando celobiosas a etanol, lográndose una eficiencia del 80% del máximo teórico de conversión de celobiosas en etanol.

Agradecimiento

Al CONACyT proyecto 154298 y beca de doctorado a IMG: 226751.

Bibliografía

1. Jose J., Meyer T.F. (2007). *Microbiol Mol Biol Rev.* 71:600-619.
2. Spiridonov N.A. and Wilson D.B. (2001). *Curr Microbiol.* 42:295-301.
3. Fernandez-Sandoval M.T., Díaz-López D., Gosset-Lagarda G., Martínez-Jiménez A. (2009). *Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.* Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco, Gro. 21-26 de Junio, 2009, OIX-01.