



Universidad de Almería
Facultad de Ciencias Experimentales
Grado en Biotecnología

Trabajo de Fin de Grado realizado por:

Irene Aranda Carrillo

Inmovilización de una β -xilosidasa de *Geobacillus stearothermophilus* como CLEAs

Directora: **Josefa María Clemente Jiménez**

Codirectora: **Lellys Mariela Contreras Moya**

Departamento de Química y Física. Área de Bioquímica y Biología Molecular

Curso 2021/2022



ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUCCIÓN	6
3.1. Enzimas degradadoras de xilano: β -xilosidasas y xilanasas.....	6
3.1.1. β -xilosidasas de la familia GH52; XynB2.....	8
3.1.2. Mutante XynB2 ^{Y509E}	9
3.1.3. Xilanasas	9
3.2. Inmovilización enzimática	10
3.3. Agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs; Cross-Linked Enzyme Aggregates)	12
3.3.1. Elaboración de los CLEAs	13
3.3.2. Parámetros de la inmovilización en CLEAs	14
3.3.3. Propiedades físicas de los CLEAs	15
3.3.4. Aplicaciones de los CLEAs	15
4. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo general	17
4.2. Objetivos específicos.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1. Preparación de células competentes	18
5.2. Transformación de células competentes	18
5.3. Inducción con isopropil- β -d-1-tiogalactopiranosido (IPTG)	19
5.4. Purificación	20
5.4.1. Ruptura celular	20
5.4.2. Purificación mediante cromatografía de afinidad	21
5.5. Concentración y diálisis de la proteína purificada	21
5.6. Cuantificación de proteína	22
5.6.1. Cuantificación de proteína mediante la herramienta ProtParam	22
5.6.2. Cuantificación de proteína según el método de lowry	22
5.7. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	23
5.7.1. Preparación de los geles de electroforesis	23
5.7.2. Preparación de las muestras	24
5.7.3. Carga de las muestras en el gel de electroforesis	24
5.8. Preparación de los agregados de enzima. CLEAs	25
5.9. Microscopía Electrónica de Barrido	26
5.10. Puesta a punto de las condiciones óptimas de actividad para la proteína inmovilizada y la proteína libre	26
5.10.1. Estudio de la temperatura óptima de reacción; CLEAs vs enzima libre.....	26
5.10.2. Estudio del pH óptimo de reacción; CLEAs vs enzima libre	27
5.10.3. Estudio de los parámetros cinéticos (K_m , V_{max} , k_{cat}/K_m); CLEAs vs enzima libre	27

5.10.4. Estudio de la termoestabilidad enzimática; CLEAs vs enzima libre	29
5.10.5. Estudio del número de ciclos reutilizables de la proteína inmovilizada.....	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1. Purificación	31
6.1.1. Inducción con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)	31
6.1.2. Medida cualitativa de la actividad β -xilosidasa	31
6.1.3. Purificación mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados	31
6.2. Cuantificación de proteína	34
6.2.1. Cuantificación de proteína purificada mediante la herramienta ProtParam	34
6.2.2. Cuantificación de proteína purificada según el método de lowry	34
6.3. Preparación de los CLEAs de XynB2WT y XynB2 ^{Y509E}	35
6.4. Caracterización del procedimiento de preparación de los CLEAs	37
6.5. Estudio de la temperatura óptima de reacción; CLEAs vs enzima libre	38
6.5.1. Enzima nativa	38
6.5.2. Enzima mutada	39
6.6. Estudio del pH óptimo de reacción; CLEAs vs enzima libre	40
6.6.1. Enzima nativa	40
6.6.2. Enzima mutada	41
6.7. Estudio de los parámetros cinéticos (K_m , V_{max} , k_{cat}/K_m); CLEAs vs enzima libre	41
6.7.1. Enzima nativa	42
6.7.2. Enzima mutada	44
6.8. Estudio de la termoestabilidad enzimática; CLEAs vs enzima libre	45
6.8.1. Enzima nativa	45
6.8.2. Enzima mutada	46
6.9. Estudio del número de ciclos reutilizables de la proteína inmovilizada	46
6.9.1. Enzima nativa	46
6.9.2. Enzima mutada	47
7. CONCLUSIONES	49
8. BIBLIOGRAFÍA	50

1. RESUMEN

Se purificó una β -xilosidasa de la familia 52 de *Geobacillus stearothermophilus* (XynB2WT) y su mutante Y509E (XynB2^{Y509E}) con actividad dual de β -xilosidasa y xilanasa con el fin de preparar agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs). Se utilizó sulfato de amonio (78%) como agente precipitante y glutaraldehído (25 mM) como agente de reticulación. La reacción de reticulación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación horizontal. En estas condiciones, los CLEAs producidos para XynB2WT y para XynB2^{Y509E} presentaron un 46% y un 34% de actividad recuperada. La caracterización morfológica realizada a los CLEAs por Microscopía Electrónica de Barrido puso en evidencia una mezcla homogénea de agregados de pequeño tamaño. La caracterización bioquímica de enzimas libres e inmovilizadas demostró que el pH y la temperatura óptimos de reacción eran mayores en XynB2WT libre que en su forma inmovilizada (pH 6,5 frente a 5 y temperatura de 75 °C frente a 65 °C). Sin embargo, en XynB2^{Y509E} libre e inmovilizada permanecieron constantes en términos generales (pH 6,5 para el CLEA y 6 para la libre y una temperatura de 55 °C para ambas). El análisis de los parámetros cinéticos muestra un valor de K_m menor para el CLEA de ambas enzimas (2,44 mM para XynB2WT libre frente a 3,86 mM en XynB2WT-CLEA y 2,13 mM para XynB2^{Y509E} libre frente a 3,53 mM para XynB2^{Y509E}-CLEA). La inmovilización mejoró la termoestabilidad en la enzima mutada, presentando una T_m ligeramente mayor en el CLEA de XynB2^{Y509E}. Por último, se comprobó que ambas enzimas mantienen aproximadamente un 50% de actividad al cabo de los 10 ciclos de reacción realizados a pH 6,5 y 60 °C, lo cual sugiere una buena estabilidad operacional de los agregados producidos.

2. ABSTRACT

A β -xylosidase from the family 52 of *Geobacillus stearothermophilus* (XynB2WT) and its mutant Y509E (XynB2^{Y509E}) with dual activity of β -xylosidase and xylanase were purified in order to prepare cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). Ammonium sulfate (78%) was used as precipitating agent and glutaraldehyde (25 mM) as crosslinking agent. The crosslinking reaction was carried out for 30 minutes at room temperature with horizontal stirring. Under these conditions, the CLEAs produced for XynB2WT and for XynB2^{Y509E} showed 46% and 34% recovered activity. The morphological characterization of the CLEAs carried out by scanning electron microscopy revealed a homogeneous mixture of small-sized aggregates. Biochemical characterization of free and immobilized enzymes showed that the optimal reaction pH and temperature were higher in free XynB2WT than in its immobilized form (pH 6.5 vs. 5 and temperature 75 °C vs. 65 °C). However, free and immobilized XynB2^{Y509E} remained broadly constant (pH 6.5 for CLEA and 6 for free and a temperature of 55 °C for both). The analysis of the kinetic parameters shows a lower K_m value for the CLEA of both enzymes (2.44 mM for free XynB2WT versus 3.86 mM in XynB2WT-CLEA and 2.13 mM for free XynB2^{Y509E} versus 3.53 mM for XynB2^{Y509E}-CLEA). The immobilization improved the thermostability in the mutated enzyme, presenting a slightly higher T_m in the CLEA of XynB2^{Y509E}. Finally, it was found that both enzymes maintain approximately 50% activity after the 10 reaction cycles carried out at pH 6.5 and 60 °C, which suggests a good operational stability of the aggregates produced.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Enzimas degradadoras de xilano: β -xilosidasas y xilanasas.

La hemicelulosa es un heteropolímero ramificado cuya composición es variable y dependiente de la fuente vegetal de la que provenga. Se compone de residuos de azúcares; hexosas como la D-manosa, D-glucosa y D-galactosa, de pentosas como la D-xilosa y D-arabinosa y de ácidos urónicos. Dependiendo de su composición, se le asignan diferentes nombres como pueden ser residuos de manano, galactano, arabinano o xilano (Bribiesca, 2013).

Los xilanos son los polisacáridos que componen la mayor parte de las hemicelulosas que forman las paredes celulares de las plantas y son los segundos azúcares más abundantes en la naturaleza. Son polisacáridos difíciles de degradar debido a la composición de su esqueleto formado por residuos de xilopiranosos unidos por enlaces β -1,4 que pueden llevar varios sustituyentes como arabinofuranosa, ácido glucurónico, ácido metilglucurónico y grupos acetilo. La solubilidad de estos compuestos depende de cuán ramificado y sustituido se encuentre. Al ser un compuesto difícil de degradar, es necesaria la actuación de diversas enzimas hidrolíticas. Entre las enzimas hidrolíticas que degradan el xilano encontramos las xilanasas (1,4- β -D-xilano xilano hidrolasa; EC 3.2.1.8), que hidrolizan el enlace β -1,4-xilosídico del esqueleto de xilano; y la β -xilosidasa (1,4- β -D-xilano xilohidrolasa; EC 3.2.1.37), que cataliza la hidrólisis de 1,4- β -D-xilanos, eliminando la D-xilosa de los extremos no reductores (Tabla 1) (Contreras y col., 2008).

Las enzimas degradadoras de xilano (Tabla 1) han sido utilizadas como agentes ecológicos en numerosos procesos industriales tales como el blanqueo de la pulpa de papel, el destintado del papel reciclado, la mejora de la digestibilidad y propiedades nutricionales de la alimentación animal, elaboración de cerveza y vino, clarificación de zumos de frutas, etc. (Rohman y col., 2019).

Enzima	Modo de acción	Clasificación catalítica
Endo-β-(1,4) D-xilanasas (E.C 3.2.1.8)	Hidroliza enlaces β -1,4 internos al en la cadena principal de la molécula, liberando xilooligosacáridos	GH
Exo-β-(1,4) D- xilanasas (E.C 3.2.1.156)	Hidroliza enlaces β -1,4 de xilooligosacáridos y libera xilobiosa.	GH
β-D-xilosidasa (E.C 3.2.1.37)	Elimina residuos de D-xilosa de los extremos no reductores de los xilo-oligosacáridos cortos y xilobiosa, produciendo xilosa.	GH
α-L-arabinofuranosidasa (E.C 3.2.1.55)	Elimina las cadenas laterales de arabinosa al hidrolizar el enlace entre arabinofuranosa en el extremo no reductor en los arabinoxilanos	GH
α-Glucuronidasa (E.C. 3.2.1.139)	Elimina las cadenas laterales de ácido glucurónico al hidrolizar los enlaces α -1,2-glucosídicos con los glucuronoxilanos.	GH
Acetil-xilan estearasa (E.C 3.1.1.72)	Libera grupos o- acetilos al hidrolizar enlaces acetil-ester en acetil-xilanos.	CE
Estearasa de ácido ferúlico (E.C.3.1.1.73) Estearasa de ácido p-cumárico	Elimina el ácido ferúlico y p-cumárico de las arabinosas al hidrolizar enlaces feruloil-ester y p-cumaril-ester con xilanos.	CE
Endo- β-1,4 mananasa	Libera β -1,4 mananooligómeros asociados a xilanos.	GH
Exo- β- 1,4 manosidasa	Hidroliza los β -1,4-mananooligómeros liberando manosa.	GH
Endo-galactasa	Hidroliza β -1,4-galactano	GH
Acetil-manan-estearasa	Libera 2 o 3-O-acteilxilanos.	CE

GH= Glucosilhidrolasas. CE= Carbohidratoestearasas.

Tabla 1. Enzimas degradadoras de xilano (Bribiesca, 2013).

Estas enzimas actúan según la topología del sitio activo y la región de unión al sustrato (Figura 1). En el caso de las endo-xilanasas, que dirigen la rotura de los enlaces internos, el sitio de unión al sustrato se muestra con una hendidura abierta en ambos extremos, mientras que el sitio activo de las enzimas que se dirigen a los extremos de las cadenas principales de polisacáridos, las exo-xilanasas, lo muestran en un extremo de los bucles extendidos (Huang y col., 2014).

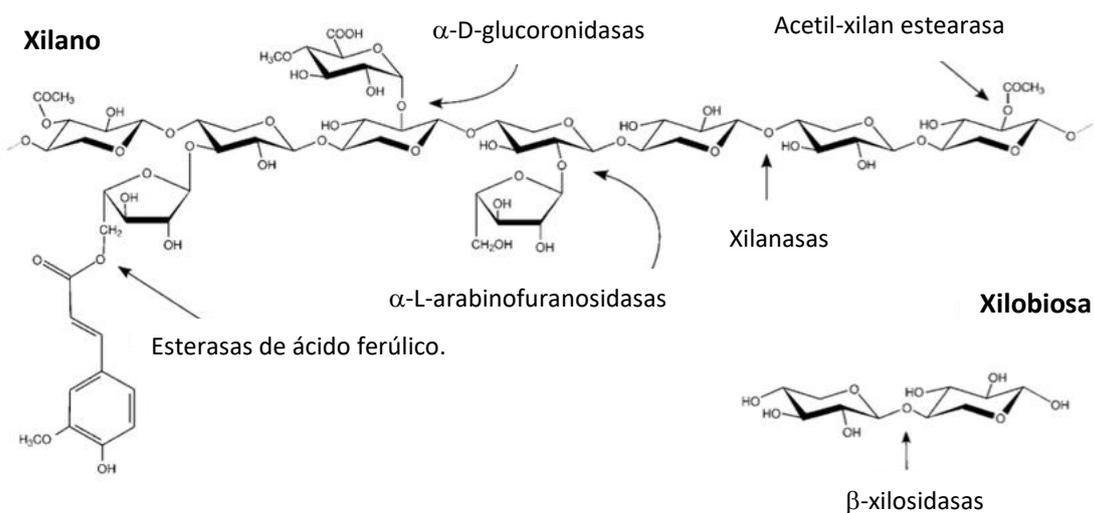


Figura 1. Estructura del xilano y sitio de ataque de las enzimas xilanolíticas (Javier-Pastor, 2013).

Las Glucosilhidrolasas (GHs) se agrupan y clasifican en familias según la similitud de sus cadenas aminoacídicas en una base de datos denominada CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes) (<http://www.cazy.org/Citing-CAZy>) (Drula y col., 2022). Existe una relación directa entre la secuencia aminoacídica y la forma de plegamiento de una enzima por lo tanto esta clasificación también tiene en cuenta las características estructurales y de mecanismo catalítico de las enzimas (Rohman y col., 2019).

3.1.1. β-Xilosidasas de la familia GH52; XynB2.

Las β-D-xilosidasas son un grupo de enzimas estructuralmente diversas y con diferentes especificidades según el organismo del que procedan y el sustrato con el que reaccionen (Rohman y col., 2019) que catalizan la liberación de unidades de xilosa de los extremos no reductores de las cadenas cortas de oligosacáridos (Ben-David y col., 2007). Para ello, hidrolizan el enlace glucosídico a través de dos rutas diferentes; bien mediante la retención o bien mediante la inversión general de la configuración del carbono anomérico (Rohman y col., 2019).

Las β-D-xilosidasas, según la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org/Citing-CAZy>) (Drula y col., 2022), se encuentran presente en 11 familias de las glicosil hidrolasas (GH). De estas enzimas, se determinó que únicamente 8 familias contienen β-xilosidasas activas sobre sustratos naturales (GH3, 5, 30, 39, 43, 51, 52 y 120) (Rohman y col., 2019). Aunque se conoce la estructura tridimensional de β-xilosidasas pertenecientes a varias familias de GH, (Rohman y col., 2019) sólo se han descubierto, purificado y caracterizado bioquímicamente unas pocas enzimas de la GH52 (Espina y col., 2014).

La β-D-xilosidasa de *Geobacillus stearothermophilus* (XynB2) es una glicosidasa que actúa con retención de la configuración anomérica (Bravman y col., 2001, Bravman y col., 2003). El monómero consta de 705 aminoácidos con una masa molecular de 79894 Da (Contreras y col., 2008, Huang y col., 2014, Dann y col., 2014) con homología con la familia de las GH52 (Espina y col., 2014).

Geobacillus stearothermophilus es una bacteria del suelo, termófila Gram-positiva con un extenso sistema hemicelulolítico (Dann y col., 2014). Esta bacteria crece en medios ricos en oligosacáridos como los encontrados en la pared celular de las plantas, incluidos el xilano, el arabinano y el galactano (Dann y col., 2014) por ello, posee un completo sistema de enzimas que degradan el xilano. Para

degradar el xilano, *Geobacillus stearothermophilus* secreta una endo-1,4- β -xilanasas que digiere el xilano en xilooligómeros. Estos productos son captados por transportadores de azúcar específicos y la degradación final ocurre dentro de las células por hemicelulasas como la β -xilosidasa (Contreras y col., 2008).

3.1.2. Mutante XynB2^{Y509E}.

Se han reemplazado diferentes residuos de la enzima XynB2 mediante mutagénesis sitio-dirigida para conocer el nucleófilo catalítico y los residuos ácido-base de la familia glucósido hidrolasas 52 y su actividad glicosintasa (Romero y col., 2021).

Huang y col., en 2014 compararon la secuencia aminoacídica de la β -xilosidasa clonada por ellos (GSxyn) con la secuencia de dos xilanasas de *G. stearothermophilus*. En el alineamiento de secuencia identificaron que el sitio de tirosina 509 (Y509) de XynB2 se superpone con el ácido glutámico 506 (E506) de xylA (GenBank no. BAA05669.1) y el ácido glutámico 298 (E298) de xylB (Gen-Bank no. ABI49951.1). La mutación Y509E en XynB2 resultó en una variante enzimática que hizo que la proteína no solo mostrase actividad de β -xilosidasa sino también actividad de xilanasas. Esto demostró que XynB2 proporciona una importante plataforma para la manipulación de funciones catalíticas en el sitio activo y, por tanto, la generación de enzimas multifuncionales, sin alterar la actividad enzimática original.

Por ello se ha considerado que XynB2 podría ser una enzima valiosa para fines industriales, especialmente en biorrefinerías o la industria alimentaria para la bioconversión de biomasa lignocelulósica en etanol y xilitol (Romero y col., 2021).

Otro ejemplo de mutación enzimática es el mostrado por McKee y col., en 2012 que diseñó una β -xilosidasa GH43 que actúa sobre las cadenas laterales de arabinosa para incluir la actividad endoxilanasas.

3.1.3. Xilanasas.

Las xilanasas son importantes biocatalizadores empleados en diversas aplicaciones industriales. Son producidas por diversos microorganismos como bacterias, micorrizas, levaduras, hongos y actinomicetos, además de protozoos, insectos, crustáceos, caracoles y algunas semillas de plantas durante la fase de germinación en suelo (Bribiesca, 2013).

Las xilanasas producidas pueden ser de naturaleza intracelular o extracelular. La mayoría de las xilanasas son excretadas al entorno extracelular ya que el sustrato al ser de gran tamaño no puede entrar en las células para su hidrólisis. La hidrólisis de xilano a xilooligómeros se produce gracias a xilanasas extracelulares liberadas al medio. Estos xilooligómeros son transportados a la célula para una mayor degradación por las xilanasas intracelulares a la vez que inducen la producción de más xilanasas intracelulares. El mecanismo de acción de las xilanasas es una reacción hidrolítica, que involucra un catalizador ácido-base y un nucleófilo (Verma y col., 2019). Entre todas las hemicelulasas, las xilanasas extracelulares son las principales enzimas responsables de la degradación en los ecosistemas de xilano (Huang y col., 2014).

La mayoría de las enzimas xilanolíticas que han sido completamente caracterizadas y patentadas corresponden a hongos filamentosos. Se han caracterizado solo β -xilosidasas y endo-xilanasas de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*; existen muy pocos artículos científicos de estas enzimas en otros géneros de bacterias (Bribiesca, 2013).

Las xilanasas se encuentran clasificadas en diferentes familias; GH5, 7, 8, 10, 11, 26 y 43, aunque las familias que agrupan un mayor número de enzimas son la GH10 y GH11 (Huang y col., 2014). La clasificación se basa en sus propiedades fisicoquímicas como puede ser el peso molecular (siendo las xilanasas de la familia GH10 las que tienen un mayor tamaño) y punto isoeléctrico (Bribiesca, 2013).

Las xilanasas tienen aplicaciones comerciales en panadería, industria de piensos, industria alimentaria, industria del papel, textiles y bioconversión lignocelulósica (Verma y col., 2019).

3.2. Inmovilización enzimática.

Los procesos industriales en los que se ven involucrados catalizadores enzimáticos son cada vez más numerosos ya que estos presentan una gran actividad catalítica, gran especificidad de sustrato y son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica. A pesar de esto, y debido a la baja estabilidad operativa que presentan la mayoría de las enzimas en las condiciones de trabajo óptimas en la industria química, no se ha extendido su empleo. Por otra parte, al ser solubles en agua, la separación de los productos y sustratos es difícil, por lo que también se complica su recuperación y reutilización (Arroyo, 1998).

La mayoría de estos inconvenientes se han resuelto gracias a la inmovilización de enzimas. Esta inmovilización consiste en una restricción, parcial o completa, de la libertad de movimiento de las enzimas, orgánulos, células, etc., por su unión a un soporte. Las enzimas inmovilizadas presentan grandes ventajas ya que se hacen más estables, se muestran más resistentes a la desnaturalización, aumenta su vida media, son más resistentes a temperaturas elevadas, pH alto, son activas en presencia de disolventes orgánicos, y también presentan resistencia a cizallamiento mecánico y proteólisis. Otras propiedades como la actividad, selectividad o especificidad también se ven mejoradas. La inmovilización hace que la aplicación de enzimas sea fácilmente manejable y rentable en procesos continuos y de lecho fijo, permite una fácil separación del producto; minimizando así la contaminación proteica del producto e incluso hace posible la co-inmovilización con otras enzimas (Verma y col., 2019).

La inmovilización se puede realizar mediante dos tipos de retenciones. En primer lugar, retenciones físicas, estas no provocan cambios estructurales en las enzimas empleadas y se pueden llevar a cabo mediante adsorción o atrapamiento y encapsulación. Por otro lado, hablamos de retenciones químicas, las cuales sí provocan formación de enlaces y por lo tanto generan un cambio estructural que además hacen que la retención sea irreversible. Este tipo de inmovilización puede llevarse a cabo mediante uniones covalentes a un soporte sólido o mediante inmovilización sin soporte (reticulado) (Figura 2).

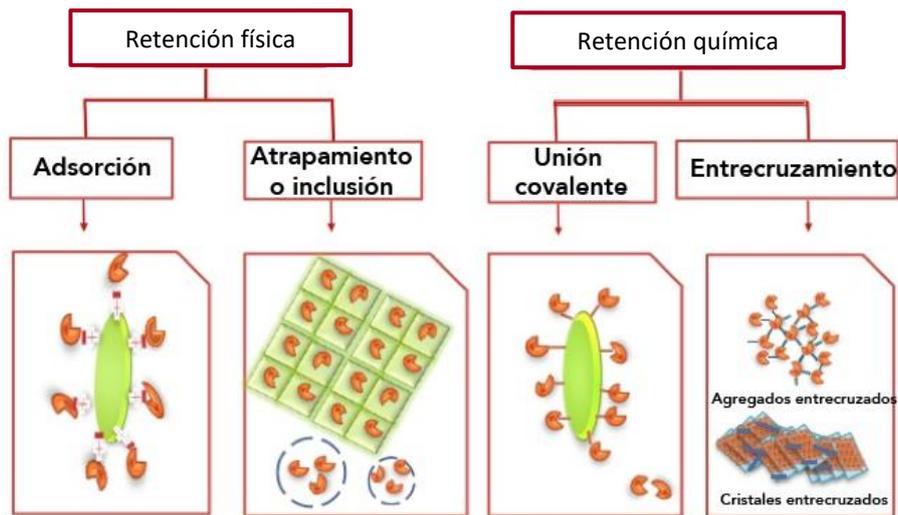


Figura 2. Métodos de inmovilización enzimática (Rodríguez-Alegría y Castillo-Rosales, 2014).

A pesar de las ventajas mencionadas, las técnicas de inmovilización también presentan desventajas. En general, la reacción se ralentiza ya que la enzima y el sustrato están separados y, por lo tanto, el sustrato debe llegar a la superficie de la partícula del soporte, debe difundirse hasta dentro del sólido y al finalizar la reacción, el producto tiene que recorrer el mismo camino inverso.

Es importante destacar que no todos los métodos de inmovilización presentan los mismos inconvenientes. En la inmovilización por adsorción, se utiliza un soporte el cual se impregna en enzima para la adsorción física o bien, la enzima se seca sobre las superficies de los electrodos. Las enzimas adsorbidas están protegidas de la agregación, proteólisis e interacción con interfaces hidrofóbicas (Datta y col., 2013) pero nada evita que pueda darse fuga del soporte (Verma y col., 2019).

La inmovilización por afinidad aprovecha la especificidad de la enzima con su soporte bajo diferentes condiciones fisiológicas. Esta especificidad se logra de dos maneras: o la matriz se acopla previamente a un ligando afín a la enzima diana o la enzima es modificada y etiquetada, es decir, deben ser enzimas modificadas en su cadena aminoacídica (Sardar y col., 2000) lo que hace que este método sea menos adecuado para el uso industrial (Verma y col., 2019).

Para crear interacciones covalentes enzima-soporte, se debe modificar la superficie de este último con objeto de controlar y mejorar las interacciones entre el soporte y la enzima. Para ello se debe diseñar un soporte que tenga grupos reactivos con mejores propiedades, esto es, que mejore la estabilidad operativa y la selectividad de la enzima inmovilizada (Verma y col., 2019). Matheus y col., en 2007 utilizaron hilos de oro de 0,5 mm de diámetro y 25 mm de longitud como electrodos que caracterizaron electroquímicamente y determinaron sus áreas efectivas. La superficie del oro fue modificada químicamente con monocapas autoensambladas de tioles (SAMs) a las que se le unieron covalentemente unos ligandos con grupos quelantes de iones metálicos que mostraban afinidad por unos receptores superficiales que habían sido generados en una enzima mediante técnicas de ingeniería genética. Se obtuvieron buenos resultados, mostrando buena sensibilidad, especificidad y estabilidad con las técnicas utilizadas (Verma y col., 2019)

El soporte necesita de una estructura con suficiente resistencia mecánica y resistencia al ataque químico. Además, en la superficie de los soportes se necesita abundancia de grupos reactivos y cadenas hidrófilas, lo que limita muchas veces su aplicación a nivel industrial. Los obstáculos asociados con las técnicas de inmovilización mencionadas anteriormente pueden verse resueltos utilizando una

alternativa que utiliza agregados enzimáticos entrecruzados (del inglés Cross-Linked Enzyme Aggregates, CLEAs), un método de inmovilización sin soportes (Verma y col., 2019).

3.3. Agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs, Cross-Linked Enzyme Aggregates)

Actualmente, la preparación de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) ha ganado relevancia como estrategia de inmovilización enzimática. La metodología CLEA es una alternativa a los métodos tradicionales de inmovilización sobre soportes sólidos preexistentes que podrían reducir la especificidad y actividad del biocatalizador. Este método también es atractivo porque es simple y robusto, y los CLEA preparados exhiben una estabilidad operativa mejorada y una excelente actividad catalítica (Romero y col., 2021).

Los CLEAs pueden ser separados de la mezcla de reacción mediante procesos de centrifugación o filtración. Sin embargo, a veces estos procesos de separación conducen a la compresión de los CLEAs, lo que también crea una obstrucción en el transporte masivo. Los CLEAs magnéticos (M-CLEA) y el agregado de enzimas reticuladas sobre partículas magnéticas (CLEMPA) son excelentes alternativas para superar estos inconvenientes. Estos CLEAs se pueden separar fácilmente mediante decantación magnética, evitando así la compresión y los problemas relacionados con la transferencia de masa. De manera similar, los CLEAs porosos (p-CLEAs) y los reticuladores macromoleculares también se utilizan para superar las limitaciones de transferencia de masa causadas por la estructura compacta de los CLEAs. Además, el método es muy económico a escala comercial debido a su fácil escalado y tampoco requiere la enzima purificada; los CLEAs se pueden preparar directamente a partir de enzimas crudas lo cual elimina los gastos de las técnicas de purificación. Por otro lado, el uso de CLEAs permite alimentar los reactores industriales con una mayor cantidad de enzima ya que el soporte de inmovilización no ocupa ningún espacio (Verma y col., 2019).

A pesar de las ventajas mencionadas anteriormente, también presentan ciertas desventajas, incluida la falta de control sobre su tamaño de partícula y flexibilidad. La modulación de características de los CLEAs como la selectividad, la estabilidad y la actividad puede ser algo complicado. A veces, la conformación estructural de las proteínas se altera después de la preparación de CLEAs, de modo que da como resultado una pérdida de actividad y estabilidad. Para superar esto, aditivos como la albúmina de suero bovino (BSA), polímeros iónicos, tensioactivos y cationes (iones calcio y sodio) se utilizan en la preparación de los CLEAs (Verma y col., 2019).

La razón principal para inmovilizar una enzima es probablemente la mejora significativa de la estabilidad operativa frente al calor y los disolventes orgánicos que generalmente se logra. Este es un resultado directo de la disminución de la flexibilidad que suprime la tendencia de las enzimas a desplegarse y la consiguiente pérdida de la estructura terciaria necesaria para la actividad. De hecho, se ha informado que la inmovilización de enzimas como agregados de enzimas reticuladas puede conducir a aumentos drásticos en la estabilidad operativa a temperaturas elevadas (Sheldon, 2011).

3.3.1. Elaboración de los CLEAs.

Fundamentalmente, la inmovilización de las enzimas como CLEAs implica dos pasos: precipitación de la enzima soluble con agentes precipitantes como acetona, sulfato de amonio o etanol para formar agregados y entrecruzamiento de los agregados formados (Mohamad y col., 2015). Para la reticulación de estos agregados puede utilizarse un reactivo bifuncional, generalmente un dialdehído como glutaraldehído o dextrano polialdehído (Verma y col., 2019). El gutaraldehído es, generalmente, el agente reticulante más utilizado ya que se trata de un reactivo económico y es fácil de adquirir en cantidades comerciales (Sheldon, 2011).

En el primer paso, la enzima soluble purificada o semipurificada se precipita (sin perturbación de la estructura terciaria) mediante la adición de agentes precipitantes como sales o disolventes orgánicos miscibles con agua. Luego, los agregados formados se reticulan químicamente usando un reactivo bifuncional que permite reacciones de grupos amino de residuos de lisina expuestos en la superficie de la enzima con oligómeros o polímeros de, por ejemplo, glutaraldehído que resultan de condensaciones aldólicas inter e intramoleculares. Después de la reticulación química, es importante que el agregado reticulado permanezca insoluble, manteniendo su estructura, así como su actividad catalítica (Figura 3) (Romero y col., 2021).

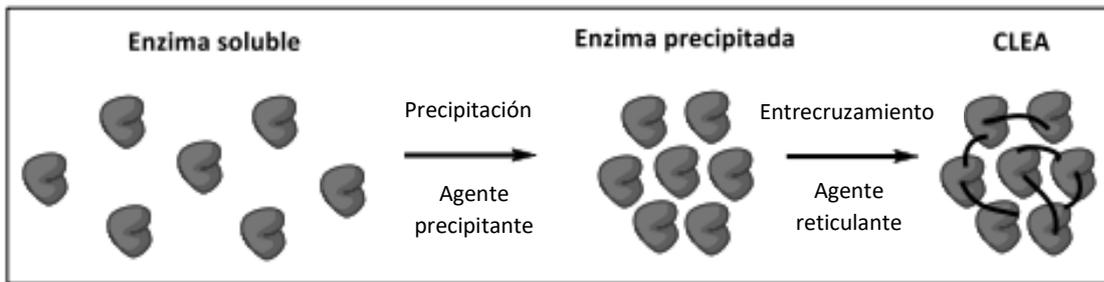


Figura 3. Pasos generales para la elaboración de un CLEA (Ramírez-Tapias, 2018).

Este procedimiento es aplicable a cualquier enzima, aunque bien es cierto que la mayoría de los artículos que tratan de CLEAs descritos hasta el momento, hablan de hidrolasas (proteasas, lipasas, y amidasas en mayor medida) debido a su gran potencial en la industria química y su gran simpleza que las hace unas enzimas muy cómodas con las que trabajar (Sheldon, 2011) (Tabla 2).

Hidrolasas	Oxidoreductasas	Liasas	Transferasas
Lipasas (18*)	Ceto reductasa	Hidroxinitrilo liasas (6*)	Transaminasas
Esterasas (3*)	Formato deshidrogenasa	Piruvato descarboxilasa	
Proteasas (7*)	Glucosa oxidasa	Desoxirribosa aldolasa	
Nitrilasas (2*)	Galactosidasas	Nitrilo hidratasa	
Amidasas (4*)	Aminoacido oxidasa		
Fitasas	Lacasa		
Galactosidasa	Catalasa		
Anhidrasa carbónica	Cloroperoxidasa		
Amilasa			

*Número de enzimas de la clase correspondiente que han sido inmovilizadas con éxito.

Tabla 2. Ejemplos de enzimas que han sido inmovilizadas con éxito (Sheldon, 2011).

La principal razón para inmovilizar una enzima, generalmente, es la mejora significativa de la estabilidad operativa que se logra cuando se expone a temperaturas altas o disolventes orgánicos. Esto es gracias a una pérdida de flexibilidad de la enzima que hace que, a condiciones diferentes de las óptimas, sea más difícil desplegarse y perder la estructura terciaria que necesita para tener actividad. (Sheldon, 2011).

3.3.2. Parámetros de la inmovilización en CLEAs.

Para una correcta inmovilización, se deben poner a punto parámetros como la temperatura, pH, concentración de proteína, velocidad de agitación, precipitante y tiempo de precipitado, proporción de proteína a precipitante, aditivos, concentración de reticulante y tiempo expuesto a dicho reticulante (Sirisha y col., 2016). Esto es porque, a menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas; se producen cambios en su estabilidad y la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del micro entorno ya que la enzima inmovilizada se considera un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, activadores, etc.) se encuentran en interfase: en el medio de reacción y en la fase constituida por el soporte con la enzima (Arroyo, 1998).

La actividad, estabilidad y el tamaño de partícula del CLEA resultante vienen directamente relacionadas con la concentración del reticulante respecto a la enzima, es decir, es un factor clave ya que, si la

relación molar de reticulante/enzima resulta ser demasiado baja, no se dará una reticulación suficiente y afectará al CLEA haciendo que este sea demasiado flexible e inestable en los sucesivos lavados para su reutilización. Por otro lado, demasiada reticulación podría provocar la ausencia completa de flexibilidad en la enzima, lo que se traduce como pérdida de actividad enzimática. Se debe determinar la cantidad óptima de reticulante para cada enzima, ya que cada una tiene una estructura de superficie única, conteniendo un número variable de residuos de lisina (Sheldon, 2011).

Si las enzimas no presentan o presentan en poca proporción residuos de lisina accesibles, se podría dar una insuficiente reticulación lo que conduce a CLEAs inestables en medio acuosos. Para superar este problema, López-Gallego y col., en 2005 estudiaron el uso de poliaminas como polietilenimina que luego se co-inmovilizan con la enzima. Se puede encontrar problemas también en la formación de CLEAs cuando la concentración de proteína en la preparación enzimática es baja. En estos casos, la formación de CLEAs se puede promover añadiendo una segunda proteína, como, por ejemplo, la albúmina de suero bovino (Shah y col., 2006).

3.3.3. Propiedades físicas de los CLEAs.

El tamaño de partícula es una propiedad importante de cualquier catalizador heterogéneo en el contexto de aplicaciones industriales, ya que afecta directamente la transferencia de masa y la filtrabilidad en condiciones operativas. Un tamaño de partícula típico de los CLEAs es de 5 a 50 μm , y su filtrabilidad suele ser suficiente para el funcionamiento por lotes. Como ocurre con todos los catalizadores sólidos, cabría esperar una pérdida de actividad debido a las limitaciones de difusión en una enzima inmovilizada. Sin embargo, los CLEAs son materiales altamente porosos y, en general, no se ha observado ninguna limitación de difusión al usarlos en transformaciones biocatalíticas comúnmente utilizadas en síntesis orgánica (Sirisha y col., 2016).

La velocidad de difusión está influenciada por el tamaño de partícula, y éste está determinado, entre otras cosas, por la relación reticulante/enzima. Las partículas más pequeñas presentan velocidades óptimas, pero, el hecho de que sean más difíciles de filtrar hace que sea mejor el uso de partículas más grandes. Esto requiere un compromiso entre una buena actividad y una buena filtrabilidad. El tamaño de partícula de un CLEA también puede aumentar con el envejecimiento (Pchelintsev y col., 2009), lo que sugiere que el proceso de reticulación no se completó cuando se detuvo la reacción. Sin embargo, el funcionamiento continuo sobre un lecho empacado de biocatalizador requerirá partículas relativamente grandes para evitar una gran caída de presión sobre la columna. Un enfoque para preparar CLEAs con tamaño de partícula aumentado y estabilidad mecánica mejorada según Wilson y col., (2004) es encapsularlos en una matriz de alcohol polivinílico (los llamados Lentikats).

3.3.4. Aplicaciones de los CLEAs.

Las enzimas inmovilizadas ayudan en su reutilización económica y también en el procesamiento de diversos productos. Las enzimas inmovilizadas tienen diversas aplicaciones biotecnológicas, biomédicas e industriales. El avance en estas áreas radica en el hecho de que son económicas, ecológicas y fáciles de usar en comparación con otras tecnologías paralelas.

Los primeros ejemplos de CLEAs se derivaron de la penicilina G amidasa una enzima de importancia industrial que se utiliza en la síntesis de antibióticos de penicilina y cefalosporina semisintéticos. La enzima libre presenta una estabilidad térmica limitada y una baja tolerancia a los disolventes orgánicos, lo que lo convierte en un ideal candidato a la estabilización por inmovilización (Sheldon y van Pelt, 2013).

Además, la tecnología CLEA se ha definido como un candidato atractivo para la bioconversión de biomasa lignocelulósica. Por ejemplo, los CLEAs de β -mananasa preparadas utilizando reticuladores macromoleculares lineales dieron como resultado una estructura porosa con un impedimento estérico bajo y una mayor actividad (Sheldon, 2011).

Bhattacharya y Pletschke en 2014 informaron del uso de magnetita-CLEA en el campo de la bioconversión de lignocelulosa. En comparación con los CLEAs convencionales, los CLEAs de magnetita mostraron una mayor actividad xilanas. Además, se preparó un combi-CLEA que contenía xilanasas y mananasas producidas por cepas bacterianas nativas. La estabilidad térmica de todas las enzimas en CLEAs aumentó en comparación con las enzimas libres (Bhattacharya y Pletschke 2015). El término Combi-CLEA se utiliza para referirse a la co-inmovilización deliberada de dos o más enzimas en un solo CLEA con el propósito de realizar dos o más biotransformaciones en cascada (Sheldon, 2011).

Por último, Dalal y col., (2007) caracterizaron diferentes sistemas CLEA adicionando *n*-propanol, acetona o dimetoxietano como agentes precipitantes y estabilizando los agregados variando las concentraciones de glutaraldehído hasta 40 mM, obteniendo actividad pectinolítica elevada.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

- Inmovilización y caracterización de las proteínas XynB2WT y XynB2^{Y509E} como agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs).

4.2. Objetivos específicos:

1. Purificación de las proteínas XynB2WT y su mutante XynB2^{Y509E}.
2. Inmovilización de ambas proteínas como CLEAs.
3. Caracterización de los CLEAs por Microscopía Electrónica de Barrido (FESEM).
4. Caracterización Bioquímica de las enzimas en su forma libre y como biocatalizador inmovilizado.
5. Estudio de la reutilización de los dos biocatalizadores inmovilizados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Preparación de células competentes.

Se comenzó con la preparación de células de *E. coli* competentes para posteriormente transformarlas con un plásmido que contenía el gen de la proteína de interés.

La preparación de células competentes se realizó tomando una colonia crecida de una placa de LB y se inoculó en 25 mL de LB (10 g/L de Triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, pH 7,02) con 250 μ L de solución 1 (MgCl₂ 1 M, MgSO₄ 1M). Se creció en agitación toda la noche a 250 r.p.m. en un agitador GFL 3005 (Burgwedel, Alemania) a 37 °C en el incubador EC 240/PP/C (Ing CLIMAS, Barcelona, España). De este precultivo se tomó un inóculo de 1 mL y se agregó a 50 mL de LB (10 g/L de Triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, pH 7,02) con 500 μ L de Solución 1 (MgCl₂ 1 M, MgSO₄ 1M) y se agitó durante 2 horas a 250 r.p.m. en un agitador GFL 3005 (Burgwedel, Alemania) y 37 °C en un incubador EC 240/PP/C (Ing CLIMAS, Barcelona, España) hasta alcanzar una densidad óptica de 0,3-0,4 u.a. medida a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro Helios γ (Thermo Electron Corporation, Inglaterra).

La suspensión celular se transfirió a tubos de centrifuga de 25 mL previamente enfriados y estériles y se centrifugó 10 minutos, 7000 r.p.m. en una centrifuga Beckman J2-21 con rotor JA-20 (California, EE. UU.). Una vez centrifugado, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 4 mL de solución de CaCl₂ (CaCl₂ 60 mM, Glicerol 15%, PIPES o MOPS pH 7 10 mM) enfriada.

Se incubó en hielo durante 1 hora y se volvió a centrifugar de la misma forma durante 10 minutos, 7000 r.p.m y a 4 °C en la misma centrifuga. Se descartó el sobrenadante y se volvió a resuspender las células en 4 mL de solución CaCl₂ (CaCl₂ 60 mM, Glicerol 15%, PIPES o MOPS pH 7 10 mM) enfriada. Se incubó en hielo durante 10 minutos. Por último, el preparado con las células se conservó a -80 °C en tubos de 1,5 mL, en alícuotas de 200 μ L.

5.2. Transformación de células competentes.

Las células competentes se transformaron con el plásmido pJAVI91 que contenía el gen codificante para la proteína nativa β -xilosidasa de *Geobacillus stearothermophilus* CECT43 (XynB2WT) y el plásmido pJAVI100 con el de la proteína mutada XynB2^{Y509E}. Ambos plásmidos contenían además un gen de resistencia a ampicilina.

Se utilizaron dos cepas diferentes de *E. coli* para la transformación celular; la cepa C43 y la cepa JM109. Ambas se transformaron con los dos plásmidos mencionados, obteniéndose de esta forma colonias de la cepa de *E. coli* C43 con el plásmido que contiene el gen de forma nativa de XynB2 (C43 pJAVI91) y, por otro lado, con el plásmido que contiene el gen de la proteína mutada XynB2^{Y509E} (C43 pJAVI100) y colonias de la cepa JM109 (JM109 pJAVI91 y JM109 pJAVI100).

El proceso de transformación comenzó descongelando en hielo durante 20 minutos, tubos que contenían las células competentes procedentes de un congelador de -80 °C. Una vez descongeladas se hicieron alícuotas del 100 μ L en tubos preenfriados en hielo.

De cada plásmido se tomó un volumen de 1 μ L y se añadió a 100 μ L del cultivo de células competentes. Simultáneamente se llevó una transformación de control utilizando 1 μ L de agua en lugar de plásmido. Este volumen de agua se mezcló con 100 μ L de cultivo de células competentes.

Las células competentes tienen en sus membranas poros por los que se introduce el plásmido recombinante. Las cargas negativas presentes en estos poros son neutralizadas por el Ca²⁺ que

proviene del CaCl₂ añadido en el proceso de elaboración de células competentes. Para ayudar en este proceso, también se añadió 1.7 µL de β-2-mercaptoetanol preparado a una dilución 1:10.

Tras añadir el plásmido y el agua a los tubos con las células competentes según correspondía, se dejó incubar durante 30 minutos a 4 °C. Seguidamente se realizó el choque térmico en un Termobloque Thermomixer Comfort (Eppendorf Af, Hamburgo, Alemania) durante 45 segundos a 42 °C. Este cambio de temperatura propició la expansión de la membrana celular permitiendo la entrada del plásmido en la célula. Se volvió a incubar en hielo durante 10 minutos para rigidizar la membrana.

Una vez transcurridos los 10 minutos en frío, se añadieron 900 µL de medio LB (10 g/L de Triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, pH 7,02) y se dejaron crecer durante 1 h en agitación constante en un agitador Roller (CMV, Alemania) a una velocidad correspondiente a la posición 4 y a 37 °C en un incubador EC 240/PP/C (Ing CLIMAS, Barcelona, España). Tras este tiempo, se sembró en placas de LB con ampicilina (10 µg/µL) (10 g/L de Triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 15 g/L de Agar pH 7,02) con cada uno de los diferentes tipos celulares. Se rotularon las placas según la cepa transformada y según el plásmido utilizado. Las células que no contenían plásmido se rotularon como 'Blanco' y sirvieron como controles negativo y positivo. Se sembraron en dos tipos diferentes de placas, una con 50 µL de células transformadas y otra a las que se le añadió 25 µL de células. Se dejaron crecer 18 horas a 37 °C en incubador EC 240/PP/C (Ing CLIMAS, Barcelona, España). Al día siguiente se analizaron y se guardaron a 4 °C hasta su uso.

5.3. Inducción con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Para la inducción de cada una de las bacterias, se inoculó una colonia transformada con su plásmido en un matraz Erlenmeyer conteniendo 20 mL de medio LB (10 g/L de Triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl pH 7,02) suplementado con ampicilina 100 µg/mL y se creció durante 18 horas a 37 °C en un incubador EC 240/PP/C (Ing CLIMAS, Barcelona, España) y en agitación constante a 200 r.p.m. en un agitador GFL 3005 (Burgwedel, Alemania). Transcurrido ese tiempo se tomaron 4 mL de pre-cultivo y se inocularon en 250 mL de medio LB (10 g/L de Triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl pH 7,02) suplementado con ampicilina 100 µg/mL, dejando crecer a 200 r.p.m. en un agitador GFL 3005 (Burgwedel, Alemania) a 37 °C en un incubador EC 240/PP/C (Ing CLIMAS, Barcelona, España) hasta observar turbidez y obtener una absorbancia entre 0,3 y 0,5 u.a. medida a λ₆₀₀ nm en un espectrofotómetro Heλios γ (Thermo Electron Corporation, Inglaterra). Las absorbancias de los diferentes cultivos se midieron en un espectrofotómetro Heλios γ (Thermo Electro Corporation, Inglaterra) a λ₆₀₀ nm y cuando alcanzó la adecuada absorbancia, se añadió el inductor isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (PanReac AppliChen) a una concentración de 1 mM para la enzima nativa y 0,1 mM para la enzima mutada. Se dejó en agitación a 200 r.p.m en un agitador GFL 3005 (Burgwedel, Alemania) durante 18 horas, a 37 °C en un incubador EC 240/PP/C (Ing CLIMAS, Barcelona, España).

Para las medidas de absorbancia a 600 nm se utilizó como blanco LB (10 g/L de Triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, pH 7,02).

Antes de la inducción se tomó 1 mL de cultivo que se utilizó para la posterior electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes. Se centrifugó en una centrifuga Spin Plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 5 minutos, 13.000 r.p.m. El sobrenadante se desechó y al precipitado obtenido se le añadió 250 µL de tampón fosfato pH 6,5 100 mM y se guardó a -20 °C etiquetado como 'no inducido' (NI).

El resto de volumen de células inducidas se repartieron en tubos de 25 mL, se equilibró el peso de los tubos y se centrifugó a 4 °C durante 15 minutos a 5000 r.p.m. en una centrífuga J2-21 (Beckman, California, EE. UU.) con el rotor JA-20. Se desechó el sobrenadante y las células sedimentadas se guardaron a -20 °C, marcando el tubo con el nombre de la cepa y la fecha en la que se indujo.

5.4. Purificación.

5.4.1. Ruptura celular.

Se descongeló cada tipo de precipitado y cada uno se resuspendió en 30 mL de tampón TALON (50 mM Tris pH 7, 300 mM NaCl), 150 μ L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en etanol al 99,6% a una concentración final de 0,5 mM y 2- β -mercaptoetanol a una concentración final de 1 mM. Este último evitará la agregación de las proteínas mientras que el PMSF inhibirá la acción de las proteasas.

Una vez se resuspendió el precipitado, se mantuvo en todo momento del proceso las células en hielo.

Para la ruptura celular se utilizó un sonicador Up200S (Dr. Hielscher, Alemania) con un valor de ciclo de 0,5 y una amplitud del 60% y se llevaron a cabo 10 ciclos de sonicado con una duración total de 1 minuto cada ciclo. Se sonicó durante 45 segundos y se descansó 15 segundos entre ciclos. En todo momento la suspensión celular a romper se mantuvo en frío. Se tuvo especial cuidado para no recalentar la muestra, sumergiendo el sonotrodo hasta la mitad del líquido para evitar la formación de burbujas.

Una vez terminados los ciclos, se tomaron 500 μ L de la suspensión de células rotas para el posterior estudio en gel de electroforesis. Se centrifugó en una centrifuga Spin Plus (Hamburgo, Alemania) 5 minutos a 13000 r.p.m. Las células sedimentadas se resuspendieron en 100 μ L de tampón TALON y se guardaron a -20 °C rotulando el tubo como 'precipitado inducido' (PI). El sobrenadante también se guardó a -20 °C con el nombre de 'sobrenadante inducido' (SI). Se analizó por separado el precipitado y sobrenadante para determinar si la expresión de la proteína fue correcta o si por el contrario se habían generado cuerpos de inclusión.

A su vez, se tomaron otros 500 μ L para medir la actividad enzimática de forma cualitativa. Para ello, se centrifugaron como se ha indicado en el párrafo anterior y se descartó el precipitado. Se mezclaron 20 μ L del sobrenadante y 160 μ L de tampón fosfato pH 6,5 100 mM en un tubo de 1,5 mL y se dejó incubar en un Thermomixer Eppendorf Comfort AF (Hamburgo, Alemania), durante 1 minuto a 65 °C. Tras este minuto, se comenzó la reacción enzimática a tiempo final en el mismo termomixer en agitación constante de 500 r.p.m, y 65 °C, añadiendo 20 μ L del reactivo *para*-nitrofenol- β -D-xilopiranosido (*p*-NPX) 20 mM durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 200 μ L de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 1 M con fin de parar la reacción. Este experimento resulta clave para poder continuar con la purificación y se llevó a cabo para comprobar la existencia de proteína activa en la muestra de sobrenadante sonicado.

Una vez comprobada la actividad, las muestras sonicadas se centrifugaron. Para ello, se pesaron los tubos obtenidos añadiendo tampón TALON (50 mM Tris pH 7, 300 mM NaCl) en caso de ser necesario. Los tubos de centrifuga se pesaron en una balanza PB302 (Mettler, Suiza) incluyendo adaptadores y tapones. Se centrifugó 25 minutos a 12000 r.p.m en una centrifuga Beckman J2-21 (California, EE. UU.) rotor JA-20 Cuando finalizó el tiempo de centrifugación se filtró el sobrenadante con ayuda de un papel de filtro, un embudo y se recogió en un matraz Erlenmeyer. Se intentó hacerlo lo más rápido posible para así evitar que las células rotas se resuspendieran. En todo momento el filtrado se mantuvo en frío para evitar la acción de las proteasas y aumentar la estabilidad de la proteína sobreexpresada.

5.4.2. Purificación mediante cromatografía de afinidad.

Se llevó a cabo una purificación en cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). Se utilizaron dos columnas de vidrio (SIGMA, Chemical Company) diferentes, una para la proteína nativa y la otra para la mutante. Ambas se cargaron con la matriz de Cobalto TALON® Metal Affinity Resin (Takara, Japón) almacenada en etanol 20%. Depositada la matriz en la columna, se dejó sedimentar y se eliminó el etanol por decantación tras abrir el tapón inferior de la columna.

Se lavó la matriz pasando 5 volúmenes (25 mL) de agua destilada filtrada y a continuación se equilibró pasando 8 volúmenes (40 mL) de tampón TALON (50 mM Tris pH 7, 300 mM NaCl). Tras esto, se hizo pasar el sobrenadante filtrado por la columna a una velocidad lenta para conseguir una mayor efectividad en la unión entre la proteína y la matriz. Se recogió una muestra de 1 mL del extracto eluido por la columna y se guardó a -20 °C con el nombre de 'no unido' (NU).

Cuando todo el volumen de sobrenadante pasó por la matriz, ésta se lavó con 8 volúmenes (40 mL) tampón TALON (50 mM Tris pH 7, 300 mM NaCl), siguiendo el mismo protocolo usado anteriormente. Una vez eluido, se tomó 1 mL de muestra, se etiquetó como 'lavado' (LV) y se guardó a -20 °C.

Una vez se pasó completamente el tampón TALON (50 mM Tris pH 7, 300 mM NaCl), se tapó la salida de la columna y se comenzó a eluir la proteína con tampón de Elución (Tris 2 mM, NaCl 100 mM, imidazol 150 mM pH 8) añadiendo 2 mL de este tampón y dejándolo incubar durante 5 minutos. Tras estos 5 minutos se abrió la salida de la columna y se comenzó a eluir por gravedad dejando caer todo el volumen de tampón en un tubo. Este volumen se guardó a 4 °C etiquetándolo como 'fracción 1' (F1). Se repitió el mismo proceso hasta verificar que se había eluido toda la proteína recombinante.

Para saber el número de muestras que se debían recoger, se fue midiendo en un espectrofotómetro Helios y (Thermo Electron Corporation, Inglaterra) la absorbancia a λ_{280} de las muestras eluidas con una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Haciendo uso de la Ley de Lambert-Beer y la absorbancia medida, se calculó la concentración teórica de proteína en cada una de las eluciones. De esta forma, se midieron las diferentes eluciones hasta que aproximadamente, la absorbancia bajó de 0,1 u.a. El blanco se realizó con tampón de Elución a la misma longitud de onda que se midieron las muestras.

Finalmente, la matriz se limpió haciendo pasar 20 mL de tampón MES (20 mM MES pH 5 (ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato), 160 mM NaCl), 20 mL de agua destilada y por último 20 mL de etanol 20%. Antes de pasar totalmente este último, se tapó la salida de la columna, por lo que finalmente se almacenó la matriz con el etanol en la columna a 4 °C.

5.5. Concentración y diálisis de la proteína purificada.

Las proteínas eluidas se encontraban en el tampón de Elución (Tris 2 mM, NaCl 100 mM, imidazol 150 mM pH 8), pero era necesaria la eliminación del imidazol. El cambio de tampón y concentración de proteínas se llevó a cabo en una columna de ultrafiltración Vivaspin 20 con una membrana de corte de 10.000 Da (Sartorius, Inglaterra). Se lavó la membrana de la columna con tampón fosfato pH 6,5 100 mM para eliminar los preservantes.

Se unieron todos los volúmenes eluidos cuyas absorbancias fueron más altas (en la mayoría de los casos de la fracción 2 a la fracción 5) y se comenzó con la serie de centrifugaciones en una centrífuga KS-5200C (KUBOTA, Gotinga, Alemania) a 4000 r.p.m. en una cámara frigorífica a 4 °C. El objetivo fue ir disminuyendo la concentración inicial de imidazol (150 mM), añadiendo tampón fosfato pH 6,5 100 mM a la columna de ultrafiltración.

La concentración de imidazol después de cada ciclo de centrifugación se fue calculando según la ecuación 1.

$$V_0 * C_0 = V_f * C_f \quad [1]$$

Donde V_0 y C_0 corresponden al volumen y concentración inicial de la muestra. El volumen final (V_f) siempre es 20 mL, por lo tanto, la concentración final (C_f) de Imidazol en la muestra va disminuyendo conforme aumentan los ciclos. Se hicieron varias centrifugaciones hasta asegurar que la concentración final de imidazol en la muestra fuera menos de 1 mM.

Se guardó una muestra de 1 mL de tampón eluido y 20 μ L de muestra de la proteína purificada para posteriormente ser analizada mediante electroforesis SDS-PAGE.

Se midió la absorbancia de la proteína resultante en un espectrofotómetro BioDrop μ Lite (Biochrom, Reino Unido) a 280 nm. El blanco se realizó con tampón fosfato pH 6,5 100 mM

El volumen restante de proteína purificada se guardó a -20°C , en alícuotas de 1 mL.

5.6. Cuantificación de proteína.

Una vez purificada y concentrada la proteína, se calculó su concentración.

5.6.1. Cuantificación de proteína mediante la herramienta ProtParam

El cálculo se llevó a cabo según la ley de Lambert-Beer [Ecuación 2], haciendo uso de la absorbancia medida a 280 nm en un espectrofotómetro He λ ios γ (Thermo Electron Corporation, Inglaterra) y del coeficiente de extinción molar de cada proteína calculado a partir de su secuencia aminoacídica, con la herramienta bioinformática ProtParam (Gasteiger y col., 2005) siendo $133.805 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para la proteína nativa y $135.970 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para la mutada. Una vez se obtuvo la molaridad, se tuvo en cuenta la masa molecular del monómero de la proteína nativa (80.654,8 g/mol) y de la proteína mutada (80.620,7 g/mol) para calcular los $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína purificada.

5.6.2. Cuantificación de proteína según el método de lowry.

Simultáneamente se realizó el cálculo de la concentración mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Se preparó una curva patrón con concentraciones crecientes de Albúmina de Suero Bovino BSA (0,5 mg/mL) (Tabla 3).

Se tomaron 25 μ L de proteína, tanto nativa como mutante, junto con 175 μ L de agua destilada. Preparados los tubos, se añadió 1 mL de Biuret compuesto por 10 mL de Solución A (CO_3Na_2 al 2% en NaOH 0,1 N) y 0,4 mL de Solución B ($\text{SO}_4\text{Cu} * 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,5% en tartrato sódico al 1%), se agitaron todos los tubos con ayuda de un agitador vertical Minishaker MS1 (IKA, Staufen, Alemania) y se dejó incubar 15 minutos. Pasado este tiempo, se añadió 0,1 mL de Folin, se agitó de nuevo y se esperó durante 20 minutos. Una vez se cumplió el tiempo, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Biodrop μ Lite (Biochrom, Reino Unido) a 640 nm.

TUBO	BSA (mL)	BSA (μL)	BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	H ₂ O d (μL)	Biuret (mL)	Folin (mL)
1	0	0	0	200	1	0,1
2	0,02	20	0,05	180	1	0,1
3	0,04	40	0,1	160	1	0,1
4	0,06	60	0,15	140	1	0,1
5	0,08	80	0,2	120	1	0,1
6	0,1	100	0,25	100	1	0,1

Tabla 3. Volúmenes de disolución patrón de proteína utilizados para obtener el coeficiente de extinción molar.

Las absorbancias nos permitieron crear una recta patrón. Se representó la absorbancia obtenida frente a la concentración de Albúmina de Suero Bovino (BSA). La recta que se obtuvo fue de forma $y = m \cdot x + n$ donde la pendiente (m) corresponde al valor del coeficiente de extinción molar de la BSA (ϵ). Con ϵ y la absorbancia obtenida a partir de la muestra de la proteína, se pudo calcular la concentración a la que se encontraba la proteína según la ley de Lambert-Beer [Ecuación 2].

$$C = \frac{Abs}{\epsilon \cdot l} \quad [2]$$

5.7. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

Las diferentes etapas de purificación se visualizaron mediante electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

5.7.1. Preparación de los geles de electroforesis.

Se preparó el gel separador al 12% acrilamida/bisacrilamida mezclando 10,7 mL de agua destilada, 7,5 mL de Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, 7,5 mL de acrilamida al 40%, 4 mL de metilen-bisacrilamida al 2%, 0,30 mL de SDS al 10%, 7,5 μL de TEMED (N, N, N', N'-Tetrametil-etilen-diamina) y 0,11 g de persulfato amónico disuelto en 505 mL de agua. Se vertió entre los cristales de electroforesis y se añadieron 200 μL de isopropanol para asegurar que el borde del gel quede recto. Una vez gelificado se eliminó el isopropanol y se procedió a preparar la mezcla del gel apilador con 2,8 mL de agua, 1 mL de Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, 1 mL de Tris/HCl 1,5 M pH 8,8, 0,6 mL de acrilamida al 40%, 0,32 mL de metilen-bisacrilamida al 2%, 0,03 mL de SDS al 10%, 2 μL de TEMED y 0,06 g de persulfato amónico disuelto en 0,1 mL de agua. Se vertió sobre el gel separador y se puso el peine para definir los pocillos en los que posteriormente se cargaron las muestras.

5.7.2. Preparación de las muestras.

Para la preparación de las fracciones obtenidas durante la purificación (PNI, PI, SIN, UN, UI) se mezclaron 30 μL de cada muestra, 8 μL de tampón de carga 4X y 2 μL de 2- β -mercaptoetanol. En el caso de las fracciones eluidas, se tomaron 15 μL de cada fracción, (un volumen menor por su alta concentración proteica), 5 μL de Tampón de carga 4X y 2 μL de 2- β -mercaptoetanol. Del marcador de peso molecular LWM (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) se tomaron 7 μL a los que se le añadieron 2 μL de 2- β -mercaptoetanol,

5.7.3. Carga de las muestras en el gel de electroforesis.

Todas las muestras antes de ser cargadas en el gel de electroforesis se llevaron a un baño Precistern (Selecta, España) a 80 °C durante 5 minutos y 1 minuto en una gradilla fría a 4 °C. Se agrupó toda la mezcla mediante centrifugación rápida (2 s a 10.000 r.p.m) en una centrífuga Spin Plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se cargaron en diferentes pocillos del gel de electroforesis de forma que cada muestra ocupó una calle. El volumen de carga fue variando según se trataba de las fracciones obtenidas durante la purificación o de las fracciones eluidas (Tabla 4). El volumen de estas últimas fue menor debido a la alta concentración de proteína que tenían.

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta de electroforesis Mini-Protean III (BIO-RAD, California, EE. UU) llenándola hasta la mitad con tampón de electroforesis 1X (Tampón Tris-Base 0,025 mM pH 8,3, Glicina 0,192 mM, SDS 0,1%). Se conectó a una fuente de alimentación Power Pac 300 (BIO-RAD, California, EE. UU) con un voltaje de 100 V durante aproximadamente 2 horas.

MUESTRA	VOLUMEN DE CARGA (μL)
NI	20
PI	20
SI	20
NU	20
LV	20
FRACCIONES	12,5
MARCADOR	7,5

Tabla 4. Volumen total de las muestras (μL) cargado en el gel de electroforesis. NI; Células no inducidas. PI; Células inducidas precipitadas. SI; células inducidas sobrenadantes. NU; Proteínas no unidas a la columna. LV; Lavado de la columna.

5.8. Preparación de los agregados de enzima. CLEAs.

Para la inmovilización se utilizaron 20 μL de proteína libre pura (a una concentración de 1,19 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para la proteína nativa y una concentración de 1,27 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para la proteína mutada) y se diluyó con 80 μL de BSA (10 mg/mL en agua). De este volumen final de 100 μL , se tomaron 2 μL para la medida de actividad y otros 2 μL para la cuantificación de proteína mediante el método de Lowry. Los restantes 96 μL se inmovilizaron y se estudiaron en las diferentes condiciones.

Para la inmovilización, primero se utilizó un agente agregante; sulfato de amonio al 78% de saturación (4,06 M) en tampón fosfato pH 6,5 100 mM. Se usó 904 μL de dicho compuesto que con los 96 μL de proteína + BSA, se obtuvo un volumen total de 1 mL.

Esta disolución se agitó levemente y se dejó reposar 24 h a 4 °C. Tras esto, se añadió el agente entrecruzante. En este caso se añadió 400 μL de glutaraldehído 100 mM en cada eppendorf, obteniéndose una concentración final de 25 mM de glutaraldehído en cada muestra (volumen de 1,4 mL).

Se mantuvo en agitación a 250 r.p.m durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador horizontal Labotron (Infors HT, Basiela, Alemania) con los tubos dispuestos horizontalmente, cambiando la orientación de dichos tubos cada 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a realizar los lavados.

Se llevaron a cabo 3 lavados. Se centrifugó a 4 °C a 14.000 r.p.m. durante 10 minutos en una centrífuga Spin plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se recogió el sobrenadante (lavado 1) y se analizó la concentración de proteína mediante el método de Lowry. El precipitado se resuspendió en 900 μL de tampón fosfato pH 6,5 100 mM y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. El sobrenadante obtenido se analizó igualmente (lavado 2) y el precipitado se volvió a resuspender en 900 μL del mismo tampón. Se llevó a cabo el tercer lavado, repitiendo el protocolo anterior y analizando el sobrenadante obtenido (lavado 3).

El precipitado (proteína inmovilizada) se resuspendió en 200 μL de tampón fosfato pH 6,5 100 mM y guardó a 4 °C para comenzar a trabajar con él. Se evaluó la etapa de precipitación determinando el porcentaje de rendimiento según la ecuación 3. El proceso de entrecruzamiento se evaluó mediante el cálculo de la actividad recuperada (%) tal y como se muestra en la ecuación 4.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{\text{Concentración de proteína en el CLEA (mg/mL)}}{\text{Concentración inicial de proteína (mg/mL)}} \right) \times 100 \quad [3]$$

$$\text{Actividad recuperada (\%)} = \left(\frac{\text{Actividad total de CLEAs}}{\text{Actividad total de enzima libre}} \right) \times 100 \quad [4]$$

Antes de someter la proteína inmovilizada a las diferentes condiciones, se estudió la temperatura y el pH óptimo de reacción de la enzima en su forma libre, además de la termoestabilidad y los parámetros cinéticos de la reacción.

5.9. Microscopía Electrónica de Barrido.

Las micrografías electrónicas de barrido realizadas a los CLEAs se registraron utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido de Alta Resolución de Emisión de Campo (FESEM, Field Emission Scanning Electron Microscope) modelo Zeiss Sigma 300 VP (Zeiss, Oberkochen, Alemania) situado en los Servicios Técnicos de la Universidad de Almería. Para preparar las muestras, las soluciones de XynB2WT-CLEAs o XynB2^{Y509E}-CLEAs se extendieron sobre un portaobjetos de microscopio. El portaobjetos se secó a temperatura ambiente y luego se colocó dentro de una cámara de desecación durante la noche. Después del secado, la muestra se recubrió con oro utilizando un recubridor por pulverización catódica BAL-TEC SCD 005 (BAL-TEC GmbH, Schalksmühle, Alemania). Se tomaron fotografías a diferentes aumentos.

5.10. Puesta a punto de las condiciones óptimas de actividad para la proteína inmovilizada y la proteína libre.

5.10.1. Estudio de la temperatura óptima de reacción; CLEAs vs enzima libre.

Se estudió la actividad de la enzima inmovilizada en CLEAs y de la enzima libre a 4, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 y 90 °C con ayuda de un Termoagitador Thermomixer Comfort (Eppendorf AF, Hamburgo, Alemania).

En el caso de los CLEAs, se aclimató a cada temperatura el agregado enzimático en 180 µL de tampón fosfato pH 6,5 100 mM durante 1 minuto. Transcurrido el tiempo, se añadieron 20 µL de sustrato *p*-NPX 20 mM y se comenzó la reacción en agitación constante a 500 r.p.m en un Termoagitador Thermomixer Comfort (Eppendorf AF, Hamburgo, Alemania). Una vez finalizado el tiempo de reacción (5 minutos), se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos a 14.000 r.p.m en una centrífuga Spin plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se pasó el sobrenadante a un tubo de 1,5 mL nuevo con 200 µL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 1 M. Éste detuvo la reacción y estabilizó el color que fue cuantificado en el espectrofotómetro BioDrop µLite (Biochrom, Reino Unido) a 410 nm y convertidos a valores de velocidad [Ecuación 5] ($\epsilon_{p-NP} = 18.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

En el caso de la enzima libre, el protocolo a seguir fue más sencillo. De una mezcla que contenía 80 µL de BSA con 20 µL de proteína, se tomaron 2 µL y 178 µL de tampón fosfato pH 6,5 100 mM. Se aclimató a las diferentes temperaturas durante 1 minuto y se comenzó la reacción en agitación constante a 500 r.p.m. en un Termoagitador Thermomixer Comfort (Eppendorf AF, Hamburgo, Alemania) añadiendo 20 µL de sustrato (*p*-NPX 20 mM) y dejándolo reaccionar durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se añadieron 200 µL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 1 M con fin de parar la reacción. Los valores de absorbancia fueron medidos en el espectrofotómetro BioDrop µLite (Biochrom, Reino Unido) y convertidos a valores de velocidad [Ecuación 5] ($\epsilon_{p-NP} = 18.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

$$Vel = \frac{Abs/min * Vt}{\epsilon * l} \quad [5]$$

5.10.2. Estudio del pH óptimo de reacción; CLEAs vs enzima libre.

Para determinar el pH óptimo de las enzimas inmovilizadas, se incubó el agregado proteico en tampones a diferentes pH's. Los tampones utilizados fueron; fórmico (pH's 2,35, 2,93, 3,4), acético (pH's 4, 4,55, 5, 5,55), fosfato (pH's 6, 6,5, 6,9), tris (pH's 7,6, 8,26, 8,76, 9,25) y carbonato (pH 9,93) todos ellos a una concentración 100 mM.

Se incubaron los CLEAs con 180 μ L de cada tampón a 4 °C durante 2 horas. Tras este tiempo, se incubaron a la temperatura óptima 1 minuto y se llevó a cabo la reacción en agitación constante tal y como se describe el apartado anterior.

Con respecto a la enzima libre, se llevó a cabo el mismo protocolo; se tomaron 2 μ L de una mezcla de 80 μ L de BSA con 20 μ L de proteína y se incubó a los diferentes pH's a 4 °C. Transcurrido 2 horas de incubación, se llevó a cabo la reacción a tiempo final, tal y como se describe el apartado anterior.

5.10.3. Estudio de los parámetros cinéticos (K_m , V_{max} , k_{cat}/K_m); CLEAs vs enzima libre.

Para determinar los parámetros cinéticos, se llevaron a cabo las reacciones a diferentes concentraciones de sustrato (*p*-NPX) desde 0 hasta 10 mM en un volumen final de reacción de 200 μ L. En el caso de la proteína inmovilizada, los agregados se resuspendieron en diferentes volúmenes del tampón según la tabla 5. Los agregados se incubaron durante 1 minuto a temperatura óptima según se trabajó con la proteína mutante o la nativa y se llevó a cabo la reacción a tiempo final 5 minutos en un Termoagitador Thermomixer Comfort (Eppendorf AF, Hamburgo, Alemania) a 500 r.p.m. Tras este tiempo, se centrifugó en una centrifuga Spin Plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 4 °C y se paró la reacción añadiendo el sobrenadante a otro tubo con 200 μ L de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 1 M.

Finalizado el ensayo, el agregado con la proteína inmovilizada se resuspendió en tampón fosfato pH 6,5 100 mM y se guardó a 4 °C.

$[p\text{-NPX}]_f$ mM	Vol ₀ p-NPX (μL)	CLEAs + Vol _{Tampón} (μL)
0	0	200
0,1	2	198
0,125	2,5	197,5
0,15	3	197
0,175	3,5	196,5
0,2	4	196
0,3	6	194
0,4	8	192
0,5	10	190
0,6	12	188
0,75	15	185
1	20	180
1,25	25	175
1,5	30	170
2	40	160
3	60	140
4	80	120
5	100	100
7,5	150	50
10*	100	100

Tabla 5. Volúmenes y concentraciones empleadas para la medida de actividad enzimática a tiempo final para la proteína inmovilizada.

En el caso de la enzima libre se añadió 2 μL de la mezcla de 80 μL de BSA y 20 μL de proteína, el volumen correspondiente de sustrato para dar la concentración final requerida y cantidades variables de tampón para completar 200 μL, que es el volumen final de la reacción. Se comenzó la reacción en un Termoagitador Thermomixer Comfort (Eppendorf AF, Hamburgo, Alemania) a 500 r.p.m. y a temperatura óptima. Tras esto se añadió 200 μL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 1 M (Tabla 6).

$[p\text{-NPX}]_E$ (mM)	Vol ₀ $p\text{-NPX}$ (μL)	Vol _{proteína+BSA} (μL)	Vol _{Tampón} (μL)
0	0	2	198
0,05	1	2	197
0,1	2	2	196
0,15	3	2	195
0,2	4	2	194
0,3	6	2	192
0,4	8	2	190
0,5	10	2	188
0,6	12	2	186
0,75	15	2	183
1	20	2	178
1,25	25	2	173
1,5	30	2	168
2	40	2	158
3	60	2	138
4	80	2	118
5	100	2	98
6	120	2	78

Tabla 6. Volúmenes y concentraciones empleadas para la medida de actividad enzimática a tiempo final para la proteína libre.

5.10.4. Estudio de la termoestabilidad enzimática; CLEAs vs enzima libre.

Para llevar a cabo este estudio, se incubó el agregado proteico junto con 180 μL de tampón a pH óptimo en un Termoagitador Thermomixer Comfort (Eppendorf AF, Hamburgo, Alemania) a diferentes temperaturas (40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 y 90 °C) durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se incubaron en hielo durante 5 minutos. Se aclimató durante 1 minuto a temperatura óptima y se inició la reacción añadiendo 20 μL de sustrato $p\text{-NPX}$ 20 mM. A los 5 minutos se centrifugó la mezcla con actividad enzimática en una centrífuga Spin Plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 13000 r.p.m por 5 minutos a 4 °C y se paró la reacción añadiendo el sobrenadante a 200 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 1 M. Se midió la absorbancia a 410 nm al sobrenadante y el precipitado que contenía los agregados enzimáticos se resuspendió en 200 μL de tampón fosfato pH 6,5 100 mM y se guardó a 4 °C.

Para el estudio de la enzima libre se tomaron 2 μL de la mezcla de 80 μL de BSA y 20 μL de proteína pura y se incubó durante 1 hora en un Termoagitador Thermomixer Comfort (Eppendor AF, Hamburgo, Alemania) con 178 μL de tampón a pH y temperatura correspondiente. Transcurrido el tiempo, se llevaron las muestras a 4 °C durante 5 minutos, se aclimataron 1 minuto a temperatura óptima y se llevó a cabo la reacción por 5 minutos en un Termoagitador Thermomixer Comfort (Eppendor AF, Hamburgo, Alemania) a 500 r.p.m. Se paró la reacción con 200 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 1 M y se midieron las absorbancias a 410 nm.

5.10.5. Estudio del número de ciclos reutilizables de la proteína inmovilizada.

Para determinar el número de reacciones que es capaz de soportar el agregado enzimático entrecruzado, se llevaron a cabo reacciones sucesivas manteniendo invariables los volúmenes y las concentraciones de tampón y reactivo en cada reacción.

En el caso de los agregados hechos con la enzima mutada, los ciclos se realizaron a su temperatura y pH óptimos. Se incubó la proteína inmovilizada con 180 μL de tampón a pH óptimo durante 1 minuto en un Termoagitador Thermomixer Comfort (Eppendor AF, Hamburgo, Alemania). Transcurrido el tiempo, se llevó a cabo la reacción en agitación (500 r.p.m) con 20 μL de sustrato *p*-NPX 20 mM. Tras los 5 minutos de reacción, se centrifugó a 4 °C en una centrífuga Spin Plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 10 minutos a máxima potencia (14.000 r.p.m) y se añadió el sobrenadante a 200 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 1 M.

Para los agregados de la enzima nativa se realizaron ciclos al pH óptimo (pH 5) y también a pH 6,5 que es el pH óptimo de la enzima libre con la finalidad de determinar a qué pH el complejo resiste a un número mayor de ciclos.

Los sucesivos ciclos se llevaron a cabo de la misma forma: los CLEAs de la enzima mutante o de la enzima nativa después de la reacción enzimática, se lavaron con 200 μL del tampón, se centrifugaron según lo descrito anteriormente, descartando el sobrenadante y añadiendo 180 μL más de tampón para llevar a cabo la siguiente reacción. Todos los pasos de lavado y centrifugación se llevaron a cabo en una cámara fría a 4 °C.

De todos los experimentos se realizaron tres réplicas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Purificación.

6.1.1. Inducción con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

La inducción de proteína nativa β -xilosidasa de *Geobacillus stearothermophilus* CECT43 (XynB2WT) y su mutante XynB2^{Y509E} se realizó como se describe en el punto 5.3. del apartado de Materiales y Métodos. La concentración de inductor utilizada fue de 1 mM de IPTG para la nativa mientras que para el mutante se hizo con 0,1 mM de IPTG. Los tiempos de inducción estuvieron comprendidos entre 18 y 20 h.

6.1.2. Medida cualitativa de la actividad β -xilosidasa.

Para comprobar la presencia de las proteínas de interés en el extracto celular obtenido tras el sonicado, se midió su actividad de forma cualitativa tal y como se explica en el subapartado 5.4.1. del apartado 5. de materiales y métodos, esto es, observando la coloración anaranjada a la que torna una solución con sustrato *para*-nitrofenol- β -D-xilopiranosido (*p*-NPX) cuando se añade la enzima.

En todos los casos, tras los 5 minutos de reacción, se observó como la muestra pasó de ser trasparente a tener un color amarillo anaranjado. Esto ocurre cuando la enzima (nativa o mutante) reacciona con el sustrato *p*-NPX, rompiendo el enlace glicosídico existente que une una molécula de xilosa y otra de *para*-nitrofenol (*p*-NP). La aparición de este último fue el causante de la coloración observada tras finalizar los 5 minutos de reacción.

6.1.3. Purificación mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados.

Se utilizó esta técnica porque, en un anterior experimento, durante el clonaje de los genes que codifican para las proteínas bajo estudio (XynB2WT y XynB2^{Y509E}), se les introdujo una secuencia nucleotídica que codifica para una cola de 6 histidinas, por lo que las proteínas recombinantes producidas XynB2WT y XynB2^{Y509E} presentaron una etiqueta de 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal. Al pasar el sobrenadante producto de la lisis celular de las bacterias inducidas por la columna TALON, solo se pegó de forma específica las proteínas que tenían la cola de histidina, es decir XynB2WT y XynB2^{Y509E}.

Si la expresión se llevó a cabo correctamente, toda la proteína debió estar soluble y, por lo tanto, estar presente en el sobrenadante y unida a la matriz. La elución con imidazol se hizo en 6 fracciones diferentes cuyas absorbancias fueron medidas a 280 nm. Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.4. de este trabajo, se realizaron varias purificaciones para la enzima nativa y mutada, en concreto 3 para la nativa y 8 para la mutada. Fue necesario un mayor número de purificaciones de XynB2^{Y509E} debido a que el rendimiento fue sensiblemente menor. Los valores de absorbancia obtenidos entre las fracciones 1 y 5 en la primera purificación aparecen en la tabla 7.

Absorbancia a 280 nm					
	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4	Fracción 5
XynB2WT	0,11	4,56	10,23	6,65	2,32
XynB2 ^{Y509E}	0,22	0,51	1,69	1,05	0,31

Tabla 7. Valores de absorbancia medidos a 280 nm correspondientes a las fracciones eluidas obtenidas a partir de la primera purificación.

Para evaluar el proceso de expresión y purificación de las proteínas XynB2WT y XynB2^{Y509E} se llevaron a cabo electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturizante (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo descrito en el subapartado 5.7. del apartado 5. de Materiales y Métodos (Figuras 6 y 7).

La figura 6 A muestra las fracciones obtenidas durante la expresión y purificación de XynB2WT. La calle 1 muestra las células no inducidas donde no se observa ninguna banda en la masa esperada para la proteína. La calle 2 muestra el precipitado inducido y la calle 3 el sobrenadante inducido antes de pasar por la columna de cromatografía de afinidad (IMAC). En esta última calle es posible observar una banda definida que se ubica por encima de la banda de 67 kDa del marcador de masa molecular y que corresponde a la proteína XynB2WT. Las calles 4 y 5 corresponden a las proteínas no unidas (NU) y lavado de la columna (LV), las cuales no contienen la proteína de interés. Finalmente, las calles 6 a 9 correspondientes a las fracciones número 1, 2, 3 y 4 provenientes de la elución con imidazol 150 mM muestran una única banda por encima de 67 kDa sugiriendo que la purificación de XynB2WT fue exitosa. Como último paso, las fracciones de las calles 7, 8 y 9 se unieron para eliminar el imidazol y su posterior concentración. El gel B de la Figura 6 se muestra la pureza de la proteína concentrada libre de imidazol (Calle 13) donde solo se ve una banda entre los marcadores 94 y 67 kDa que corresponde a XynB2WT. La calle 12 corresponde al agua obtenida de la ultrafiltración después de dializar y concentrar la proteína. La ausencia de bandas confirma el éxito de esta etapa. La proteína pura, concentrada y libre de imidazol se alicuotó y se congeló a -20 °C hasta iniciar el protocolo de inmovilización.

En la figura 7 se muestran las electroforesis resultantes después de cargar las diferentes muestras de la expresión y purificación por IMAC de la proteína mutada, la XynB2^{Y509E}. En este caso, la muestra del sobrenadante inducido se corresponde con la calle 2, mientras que el precipitado inducido se muestra en la calle 3. Las muestras de proteínas no unidas a la columna y el lavado de la columna se corresponden con las calles 4 y 5 respectivamente. Las fracciones eluidas se muestran en las calles 6, 7, 8 y 9, donde es posible apreciar una banda intensa situada entre los marcadores de 94 y 67 kDa que se corresponde con XynB2^{Y509E}.

Las calles 10, 11 y 12 del panel B de la figura 7, corresponden al marcador, la proteína XynB2^{Y509E} purificada, dializada y concentrada tras pasar por la columna de ultrafiltración y el agua de filtrado después de la ultrafiltración realizada respectivamente. La presencia de una única banda en la proteína concentrada confirma lo exitoso de esta etapa. La proteína pura, concentrada y libre de imidazol se congeló a -20 °C hasta iniciar el protocolo de inmovilización.

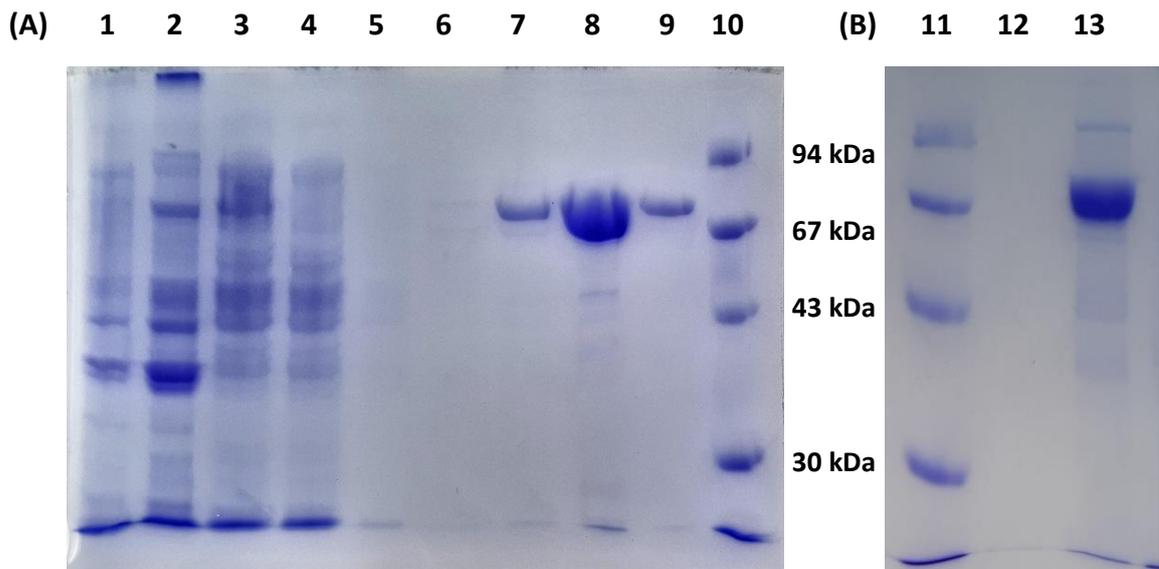


Figura 6. Gel de electroforesis SDS-PAGE de la proteína XynB2WT purificada. (A); Calle 1: células no inducidas (NI), calle 2: células inducidas precipitadas (PI), calle 3: sobrenadante inducido (SI), calle 4: proteínas no unidas a la columna (NU), calle 5: lavado de la columna (LV), calles 6 a 9: fracciones 1, 2, 3 y 4 eluidas de XynB2WT con imidazol 150 mM, calle 10: marcador de masa molecular (B); Calle 11: marcador de masa molecular (LWM), calle 12: agua de ultrafiltración, calle 13: XynB2WT concentrada.

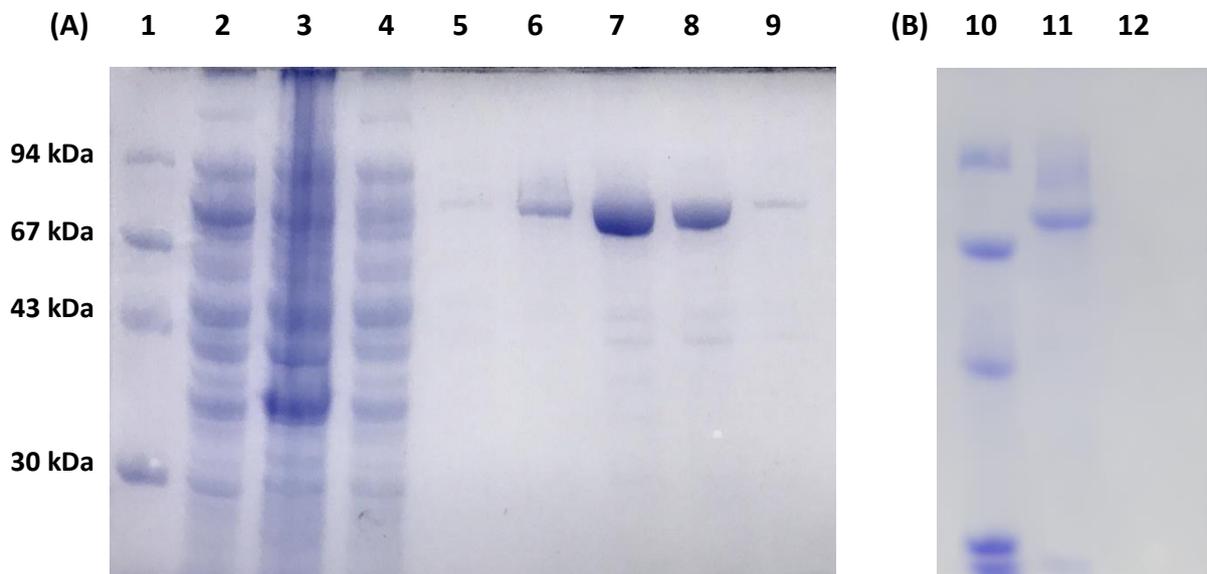


Figura 7. Gel de electroforesis SDS-PAGE para XynB2^{Y509E}. (A); Calle 1: marcador de masa molecular (LWM), calle 2: sobrenadante inducido (SI), calle 3: precipitado inducido (PI), calle 4: proteínas no unidas a la columna (NU), calle 5: lavado de la columna (LV) calle 6 a 9: fracciones 2, 3, 4 y 5 eluidas de XynB2^{Y509E} con imidazol 150 mM. (B); Calle 10: marcador de masa molecular (LWM), calle 11: XynB2^{Y509E} concentrada, calle 12: agua de ultrafiltración.

6.2. Cuantificación de proteína.

6.2.1. Cuantificación de proteína purificada mediante la herramienta ProtParam.

La cuantificación de la proteína, tanto nativa como mutante, obtenida en las diferentes purificaciones, se realizó tras la unión de las mismas. Así para la proteína nativa se unieron las fracciones que presentaron una mayor absorbancia en cada una de las 3 purificaciones y para la mutada, las fracciones de mayor absorbancia de las 8 purificaciones. Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.5. de Materiales y Métodos, para XynB2WT se obtuvo un total de 12 mL de proteína purificada con una absorbancia de 1,62 medida a una longitud de onda de 280 nm. La concentración de XynB2 nativa se estimó en 12 μM (Tabla 8).

Con respecto a XymB2^{Y509E}, se obtuvieron 9,2 mL de proteína pura con una absorbancia de 2,44 a 280 nm, lo que corresponde a una concentración de 18 μM (Tabla 8).

Proteína	Concentración final de Imidazol (mM)	Absorbancia de la proteína (280 nm)	Concentración de proteína teórica (μM)	Concentración de proteína teórica ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
XymB2WT	0,31	1,62	12	0,97
XymB2 ^{Y509E}	0,31	2,44	18	1,45

Tabla 8. Resultados obtenidos a partir de la purificación en una columna de ultrafiltración.

Para obtener los valores de concentración de las proteínas, tanto nativa como mutante, recogido en la tabla 8, se realizó lo explicado en el subapartado 5.6. de materiales y métodos. Para ello se hizo uso del coeficiente de extinción molar de cada proteína obtenido a partir de su secuencia aminoacídica, con la herramienta bioinformática ProtParam (Gasteiger y col., 2005) siendo 136.710 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para la proteína nativa y 135.970 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para la mutada. Con esto último se calculó la molaridad (Tabla 8) y con el peso molecular del monómero (80.654,8 g/mol para la proteína nativa y 80.620,7 g/mol para la mutada) se pudo calcular la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína purificada (Tabla 8).

6.2.2. Cuantificación de proteína purificada según el método de lowry.

Dado que en la preparación de los CLEAs de las dos formas enzimáticas bajo estudio se utilizó la albúmina de suero bovino (BSA) como proteína coagregante, fue necesaria cuantificar la cantidad de proteína purificada también por un método colorimétrico. A esta cuantificación se le llamó 'cálculo de la concentración de proteína experimental' y se hizo siguiendo el protocolo explicado en el subapartado 5.6.2. del apartado 5 de Materiales y Métodos.

Se elaboró una recta patrón utilizando concentraciones crecientes de BSA (0,5 mg/mL). Se tomaron 25 μL de proteína, tanto nativa como mutante, junto con 175 μL de agua destilada y se trataron con los reactivos utilizados en el método de Lowry (subapartado 5.6.2.) La concentración de XynB2WT purificada según este método fue de 14,73 μM mientras que la de XynB2^{Y509E} fue de 15,73 μM (Tabla 9). Estos valores son similares a los obtenidos por la cuantificación haciendo uso del coeficiente de extinción molar de las proteínas del apartado anterior. Finalmente, este método también confirma que se purificó mayor cantidad de proteína mutante que de la nativa.

	Absorbancia (640 nm)	Recta patrón	ϵ	[Proteína] ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Factor de dilución (F.D)	[Proteína] ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) · FD	[Proteína] (μM)
XymB2WT	0,34	$\gamma=2,29x$	2,29	0,15	8	1,19	14,73
XymB2^{Y509E}	0,34	$\gamma=2,15x$	2,15	0,16	8	1,27	15,73

Tabla 9. Resultados obtenidos a partir de la cuantificación de proteína purificada por el método de Lowry.

6.3. Preparación de los CLEAs de XynB2WT y XynB2^{Y509E}

En el contexto de las posibles aplicaciones industriales de las enzimas inmovilizadas como CLEAs, los parámetros de tamaño y morfología de las partículas son propiedades importantes, ya que podrían influir directamente en la transferencia de masa y la filtrabilidad durante sus condiciones operativas. Normalmente, el tamaño de partícula de un CLEA varía entre 0,1 y 200 μm (Velasco-Lozano y col., 2016). Los principales factores que determinan el tamaño de los CLEAs son la cantidad de enzima y la concentración del reticulante. Así la modificación de ambos parámetros ha permitido producir CLEAs de más de 50 nm completamente funcionales (Yu y col., 2006).

Dado que en el entrecruzamiento de moléculas enzimáticas agregadas implica, en gran medida, la reacción del glutaraldehído con grupos amino reactivos de residuos de lisina en la superficie de la enzima, la naturaleza de la enzima en términos de este contenido de residuo podría afectar la inmovilización mediante la técnica de los CLEAs (Talekar y col., 2013). Para proteínas con bajo contenido de residuos de lisina, Shah y col., (2006) sugieren la coagregación con ciertas proteínas ricas en este residuo como la albúmina de suero bovino (BSA). En ese sentido las enzimas bajo estudio se mezclaron con BSA en una proporción cercana a la relación 1:30 previo a su precipitación y entrecruzamiento.

La concentración de reticulante también es importante para determinar la morfología y, por tanto, las propiedades catalíticas de los CLEAs. Se conoce que aumentar en gran medida la concentración de agente entrecruzante puede originar CLEAs grandes, de grano grueso y con menos cavidades (Talekar y col., 2013). Como resultado, las limitaciones internas de transferencia de masa y, por lo tanto, la disminución de la actividad catalítica, son inevitables a altas concentraciones del reticulante. En ese sentido los CLEAs de XynB2WT o XynB2^{Y509E} fueron preparados a una concentración de glutaraldehído relativamente baja (25 mM) (ver subapartado 5.8. del apartado 5 de materiales y métodos).

Las figuras 8 y 9 corresponden a las micrografías electrónicas de los CLEAs de XynB2WT y XynB2^{Y509E} respectivamente. En ambos casos la morfología de los CLEAs formados es muy similar a los "agregados químicos clásicos" descritos en la literatura (Schoevaart y col., 2004, Shan y col., 2006, Talekar y col., 2013, Velasco-Lozano y col., 2016). De acuerdo con su morfología, los CLEAs pueden ser clasificados en tipo 1 y tipo 2. Los agregados de tipo 1 aparecen como estructuras de grano fino con muchas cavidades, mientras que los agregados de tipo 2, son estructuras de grano grueso con menos cavidades. Además, la forma del tipo 1 es esférica mientras que los del tipo 2 son ligeramente irregulares y de menor tamaño.

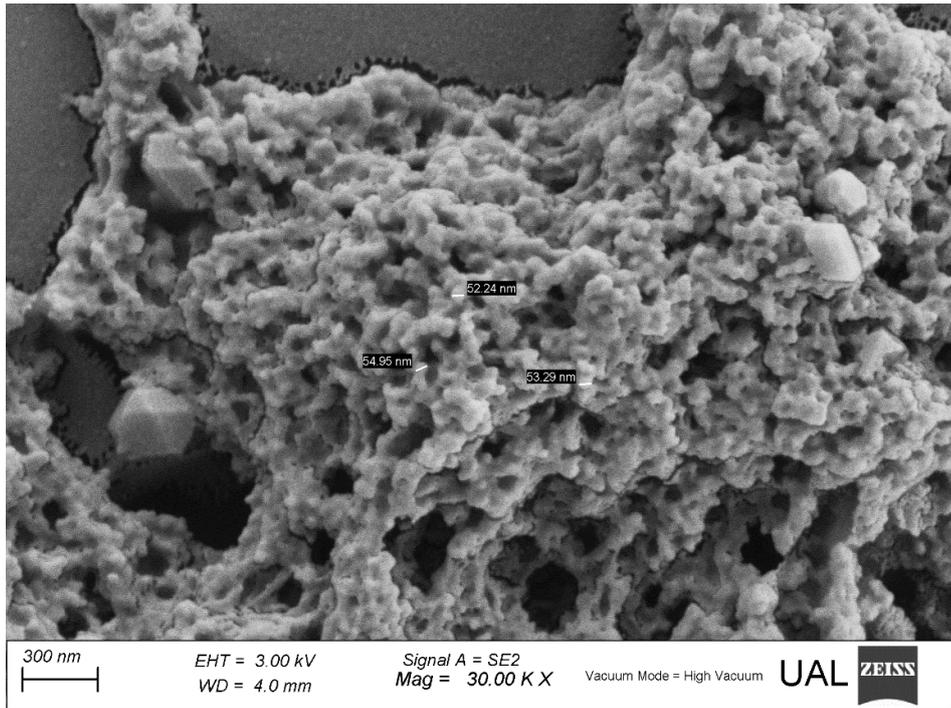


Figura 8. Imagen de microscopía electrónica de barrido (FESEM) de los CLEAs de XynB2WT preparados a 25 mM de glutaraldehído a 30.000 de aumento.

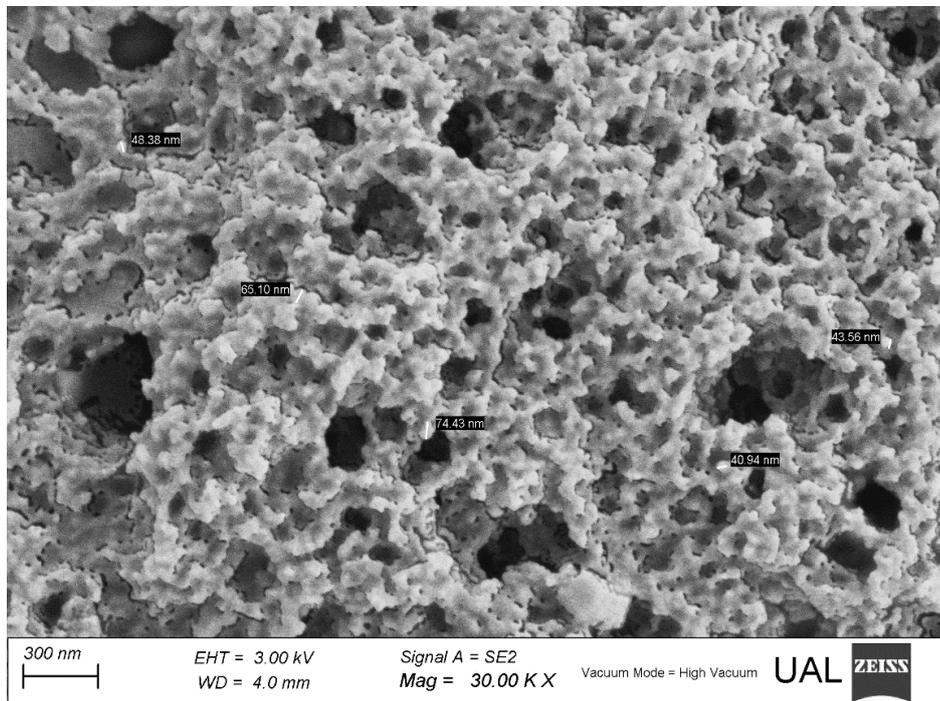


Figura 9. Imagen de microscopía electrónica de barrido (FESEM) de los CLEAs de XynB2^{Y509E} preparados a 25 mM de glutaraldehído a 30.000 de aumento.

Teniendo en cuenta las características generales de morfología de los CLEAs, podemos sugerir que los agregados de XynB2WT y XYNB2^{Y509E} en presencia de BSA se parecen más a los del tipo 1. Respecto al tamaño de las partículas se tuvo que éstas fueron más homogéneas para XynB2WT que para el mutante XynB2^{Y509E}. Los tamaños determinados para las “esferas” de XynB2WT fueron alrededor de 50 nm, mientras que los de XynB2^{Y509E} variaron desde 40 hasta 75 nm. Si se compara este tamaño de los agregados respecto a lo descrito en la bibliografía se encuentra que son bastante pequeños. Más específicamente los CLEAs de XynB2^{Y509E} preparados en este trabajo son 13 veces más pequeños que los descritos por Romero y col. en 2021. Esta diferencia en tamaño podemos atribuirla a la naturaleza de la muestra entrecruzada y a la concentración y tiempo del agente entrecruzante empleado. La muestra entrecruzada fue una mezcla de XynB2^{Y509E} con BSA en una relación de 1:30 mientras que la concentración de glutaraldehído fue del doble (25 mM) pero solo durante 30 min. Estos resultados sugieren que 30 min como tiempo de reacción de entrecruzamiento no fue suficiente para completar la reacción de nucleación de los agregados entrecruzados.

6.4. Caracterización del procedimiento de preparación de los CLEAs.

El procedimiento de preparación de los CLEAs de XynB2WT y XynB2^{Y509E} involucró las etapas de precipitación y entrecruzamiento. La etapa de precipitación se evaluó determinando el parámetro del porcentaje del rendimiento de la agregación tal y como se explica en el subapartado 5.8 del apartado 5 de materiales y métodos [Ecuación 3].

Para calcular este parámetro fue necesario determinar la posible pérdida de proteína en los diferentes lavados realizados. La cuantificación de proteína en la muestra inicial, así como en las diferentes etapas se hizo siguiendo el método de Lowry. Se analizaron las tres aguas de lavado, midiéndose las absorbancias a 640 nm y transformando a concentración estos valores gracias a la recta patrón de BSA. Los valores de concentración y cantidad de proteína inicial y de los lavados de los CLEAS fueron recogidos en la tabla 10. La concentración de proteína en el CLEA se calculó restando a la cantidad inicial, las cantidades de proteína presente en los lavados.

	XynB2WT/BSA		XynB2 ^{Y509E} /BSA	
	mg/mL	mg	mg/mL	mg
XynB2+BSA inicial*	8,24	0,82	8,25	0,82
Lavado 1**	0,34	0,48	0,30	0,42
Lavado 2**	0,06	0,08	0,06	0,08
Lavado 3**	0	0	0	0
Proteína en CLEA***	1,47	0,26	1,81	0,32

*El volumen de la muestra fue de 100 µL. ** El volumen de la muestra fue 1,4 mL. *** El volumen en el que se resuspendió el CLEA fue 180 µL.

Tabla 10. Datos obtenidos para el cálculo del rendimiento de la proteína durante la etapa de agregación y entrecruzamiento. Cuantificación mediante el método de Lowry de la concentración (mg/mL) de proteína y cálculo de la cantidad de proteína (mg) presente en cada uno de los lavados realizados durante la obtención de los CLEAs.

El rendimiento calculado fue del 18% para la enzima nativa y del 22% para la enzima mutada. Por lo tanto, según los resultados obtenidos, hay entre un 78 y 82% de pérdida de proteína en los lavados lo que podría ratificar la propuesta de que 30 min de entrecruzamiento no es suficiente para la acción del agente entrecruzante sobre los agregados precipitados.

La evaluación del proceso de entrecruzamiento se realizó con el cálculo de la actividad recuperada según lo explicado en el subapartado 5.8. del apartado 5. de materiales y métodos [Ecuación 4].

Para ambas proteínas inmovilizadas, se llevó a cabo la reacción enzimática con *p*-NPX y se midió la absorbancia a 410 nm que luego se transformó en actividad. Este resultado se dividió entre la actividad total de la enzima libre (Tabla 11).

	Actividad total CLEAs (U)	Actividad total enzima libre (U)	Actividad recuperada (%)
XynB2WT	8,70	20,43	43
XynB2^{Y509E}	5,84	16,96	34

Tabla 11. Datos de actividad recuperada para la proteína XynB2WT y XynB2^{Y509E}.

Se puede observar en la tabla 11 que el porcentaje de actividad recuperada para los CLEAs de XynB2WT fue del 43% mientras que para los CLEAs de XynB2^{Y509E} fue de 34%. Estos valores relativamente bajos confirman la pérdida de proteína total (XynB2+BSA) tras los lavados. Sin embargo, estos resultados de actividad parecen evidenciar que se pierde más BSA que XynB2, ya que la actividad recuperada es mayor que el porcentaje de proteína retenida en los CLEAs tras los lavados.

6.5. Estudio de la temperatura óptima de reacción; CLEAs vs enzima libre.

En los estudios de caracterización Bioquímica de las enzimas libre e inmovilizada de XynB2, en términos generales se ha determinado que la velocidad de reacción es 10 veces superior en la proteína libre respecto a la inmovilizada, tanto para la proteína nativa como para la mutada.

6.5.1. Enzima nativa.

Se llevaron a cabo tres repeticiones para el estudio de la enzima libre e inmovilizada en CLEAs a las temperaturas marcadas en el subapartado 5.10.1. del apartado 5. de materiales y métodos.

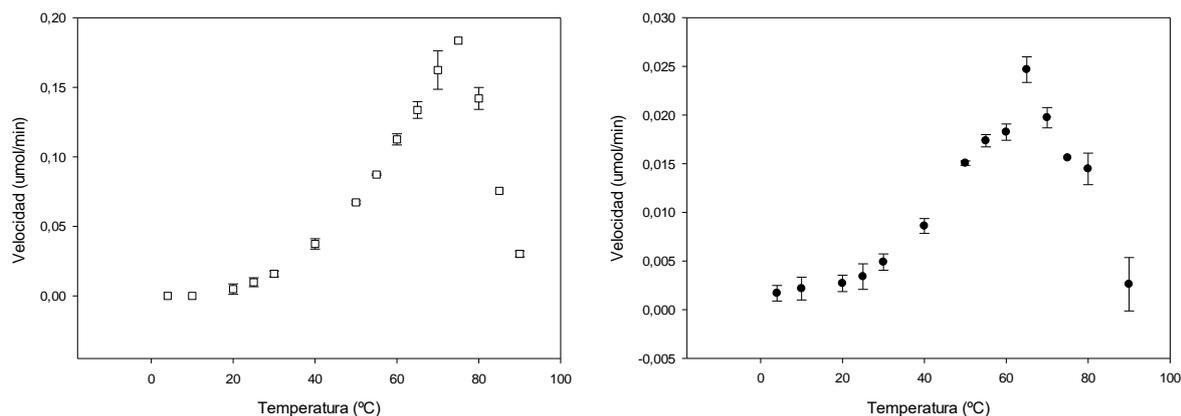


Figura 10. Representación gráfica de la velocidad de reacción de XynB2WT libre (□) y de XynB2WT inmovilizada (●) a diferentes temperaturas.

En la figura 10, se puede observar que la temperatura óptima de reacción de la enzima nativa libre es de 75 °C, lo cual es 5 °C mayor a lo reportado por Contreras y col. en 2008. Para la enzima nativa inmovilizada la temperatura óptima de reacción fue de 65 °C. A pesar de esta disminución en la temperatura óptima de la enzima inmovilizada, esta presentó actividad en un mayor rango de temperaturas (55 - 80 °C) respecto a la enzima nativa, poniendo de manifiesto que la inmovilización estabiliza el sistema térmicamente, como también informaron Romero y col., (2021) con CLEAs hechos de la enzima mutada. La curva que representa la actividad de la enzima inmovilizada muestra una pendiente sensiblemente más suave. Este hecho en la proteína inmovilizada también fue reportado en 2014 por Torabizadeh y col., en la inmovilización de la α -amilasa de *B. licheniformis* como CLEAs.

6.5.2. Enzima mutada.

Al igual que en el caso anterior, se llevaron a cabo tres repeticiones para el estudio de la enzima mutada libre. Respecto a la enzima mutada inmovilizada, se realizaron 3 repeticiones y se midió la absorbancia del primer ciclo de cada repetición (subapartado 5.10.1.). Los valores de absorbancia se transformaron en velocidad y se representaron gráficamente (Figura 11).

El efecto de la temperatura en la actividad β -xiloxidasa según lo representado en la figura 11 muestra que, la temperatura óptima de reacción para la enzima mutante en su forma libre es de 55 °C, igualmente para la enzima inmovilizada. Resultados similares se encuentran reportados en Romero y col., (2021), que concluyeron una misma temperatura óptima de reacción para ambas formas de la enzima.

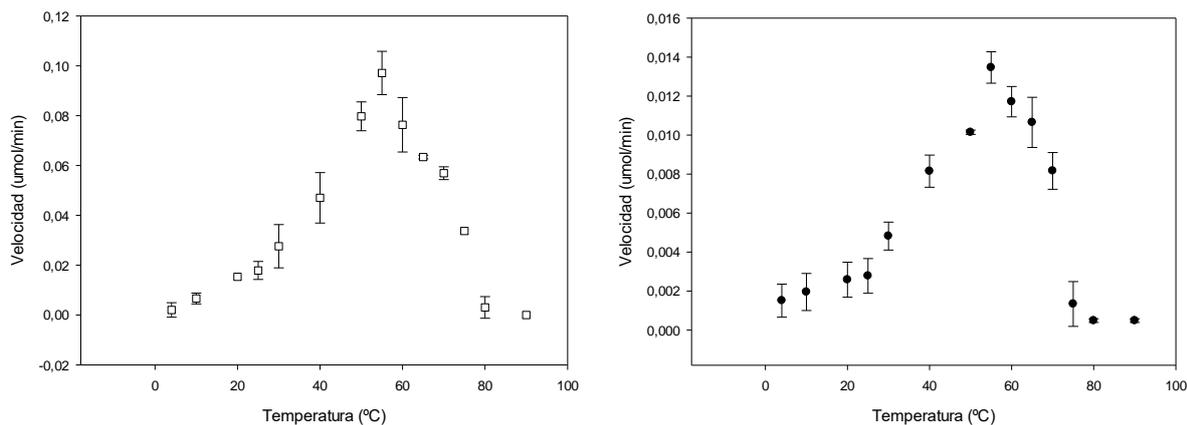


Figura 11. Representación gráfica de la velocidad de reacción de XynB2^{Y509E} libre (□) y de XynB2^{Y509E} inmovilizada (●) a diferentes temperaturas.

6.6. Estudio del pH óptimo de reacción; CLEAs vs enzima libre.

6.6.1. Enzima nativa.

Se realizaron tres repeticiones de medidas de actividad de la enzima libre e inmovilizada a los pH descritos en el subapartado 5.10.2. del apartado 5. de materiales y métodos. Los resultados obtenidos para la enzima nativa libre e inmovilizada se muestran representados en la figura 12. La enzima nativa en su forma libre presenta un pH óptimo de 6,5 tal y como ha sido reportado por Contreras y col., 2008. Sorpresivamente se encontró que la enzima nativa inmovilizada presentó un pH óptimo de 5, de hecho, a pH 6,5 que es el pH óptimo para la enzima libre, la actividad, para la inmovilizada, es un 30% menos. La disminución del pH óptimo de la enzima nativa inmovilizada de 1,5 unidades de pH respecto a la enzima libre podría reflejar algún efecto de la inmovilización sobre el comportamiento ácido-base de la enzima. Resultados similares obtuvieron Charoenwongpaiboon y col., (2019), que, mediante una caracterización bioquímica, estudiaron el efecto del pH en la enzima mutada R483A-LrInu, en su forma libre e inmovilizada, observando un pH óptimo ligeramente más ácido en R483A-LrInu-CLEA.

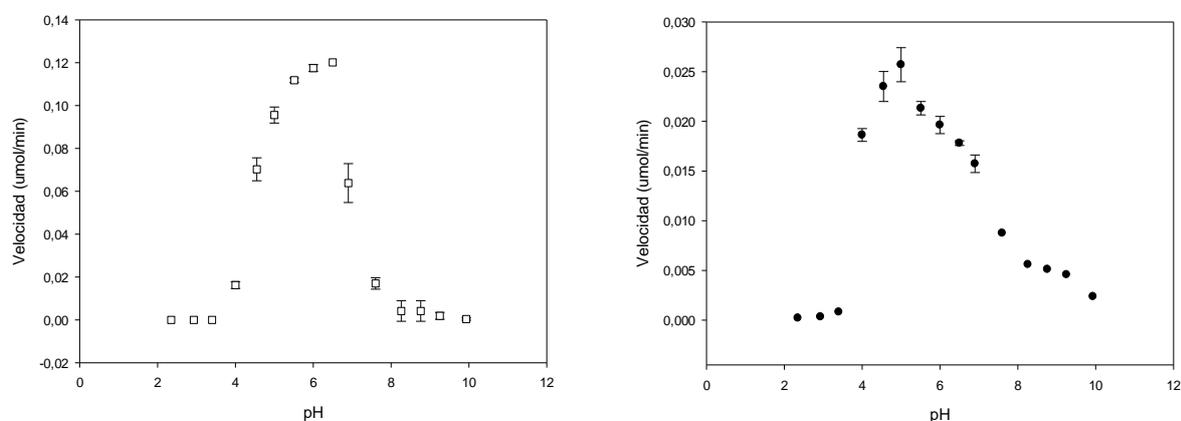


Figura 12. Representación gráfica de la velocidad de reacción enzimática de XynB2WT (□) y de XynB2WT inmovilizada (●) en función del pH.

6.6.2. Enzima mutada.

Se realizaron tres réplicas tanto para la enzima libre como para la inmovilizada. La actividad enzimática de la enzima mutada se estudió a valores de pH a partir de 4 ya que, hasta ese valor de pH no se observó actividad. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 13.

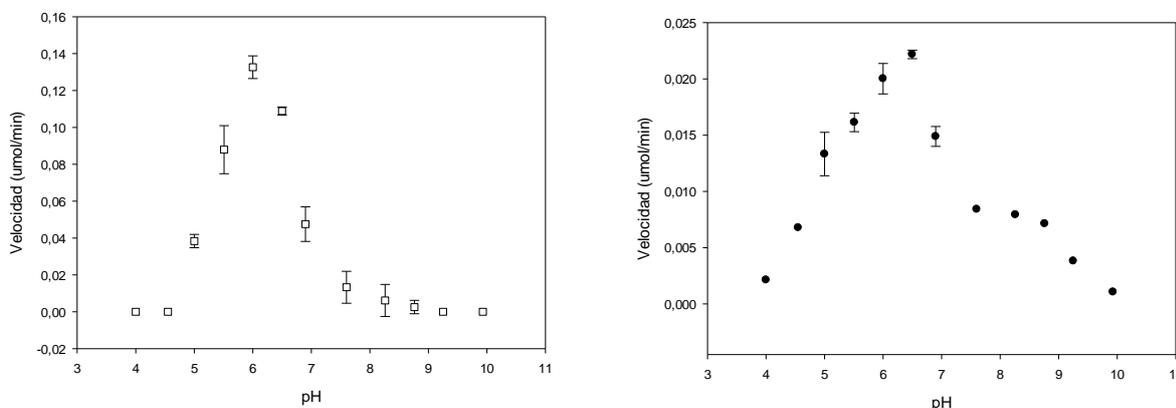


Figura 13. Representación gráfica de la velocidad de reacción enzimática a diferentes pH de XynB2^{Y509E} libre (\square) y de XynB2^{Y509E} inmovilizada (\bullet).

Como se puede observar en la figura 13, el valor de pH óptimo para la enzima mutada libre es de 6 mientras que para la enzima inmovilizada la mayor actividad se observó a pH 6,5. La enzima inmovilizada presentó mayor actividad a pH más alcalino que la enzima libre. Resultados similares fueron obtenidos por Romero y col., (2021), al estudiar el pH óptimo para esta misma enzima mutante.

En general, la inmovilización enzimática mejora la estabilidad de la enzima mutada permitiendo que ésta tenga actividad a valores de pH en los que la enzima libre no la presenta. Así en la figura 13 se puede apreciar como a partir del pH óptimo, la actividad cae más rápidamente en el caso de la proteína libre en comparación con la inmovilizada, poniendo de manifiesto la estabilización de la enzima. De la misma forma, Yu y col., (2013) en un estudio de inmovilización de epóxido hidrolasas de judía mungo observaron que los CLEAs de epóxido hidrolasas eran estables en un rango más amplio de pH que la enzima libre.

6.7. Estudio de los parámetros cinéticos (K_m , V_{max} , k_{cat}/K_m); CLEAs vs enzima libre.

Para este estudio, se tuvo en cuenta las condiciones óptimas de reacción de pH y temperatura descritas en los subapartados 6.5. y 6.6. de este mismo apartado y que están recogidas en la tabla 12.

	Condiciones óptimas	pH	Temperatura (°C)
Enzima XynB2WT	Libre	6,5	75
	Inmovilizada	5	65
Enzima XynB2^{Y509E}	Libre	6	55
	Inmovilizada	6,5	55

Tabla 12. Condiciones óptimas de pH y temperatura para XynB2WT y XynB2^{Y509E} en su forma libre e inmovilizada.

Los parámetros cinéticos obtenidos o calculados fueron la velocidad máxima (V_{max}), la constante de disociación de Michaelis (K_m), la constante catalítica (k_{cat}) y la constante de especificidad (k_{cat} / K_m).

La V_{max} y la K_m se obtuvieron a partir de los coeficientes mostrados en el ajuste hiperbólico realizado usando SigmaPlot (versión 12.0) al representar la velocidad enzimática frente a la concentración creciente de sustrato. La k_{cat} se define como el valor de V_{max} partido la concentración de catalizador presente en la reacción. Por último, la eficiencia catalítica se calculó dividiendo la k_{cat} entre la K_m .

Conocer el parámetro k_{cat} para las enzimas libres e inmovilizadas requiere conocer la concentración de enzima utilizada en el ensayo. La concentración de las proteínas XynB2WT y XynB2^{Y509E} utilizadas para preparar la mezcla de inmovilización fue de 1,19 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para la nativa y de 1,27 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para la mutada (Tabla 9). Dada que la mezcla utilizada para inmovilizar contenía 20 μL de proteína y 80 μL de BSA (10 mg/mL), fue posible conocer que la concentración total de proteína que se utilizó para elaborar los CLEAs fue de 8,24 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en la nativa y 8,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en la mutada (Tabla 10).

Tras los lavados de los CLEAs, disminuyó la cantidad de proteína por lo que la concentración de proteínas en los CLEAs producidos fue de 1,47 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para la nativa y 1,81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para la mutada (Tabla 10). Sabiendo que se tomó 2 μL para el estudio de la enzima libre y 96 μL para el de la enzima inmovilizada y que la proporción de BSA es 30 veces mayor que la de proteína, se calculó la concentración de catalizador en la reacción haciendo posible, por lo tanto, calcular los parámetros cinéticos para cada enzima (Tablas 13 y 14).

6.7.1. Enzima nativa.

XynB2WT libre se estudió a concentraciones de sustrato *p*-NPX que oscilaron entre 0 y 6 mM (ver tabla 6 del apartado 5.10.3.). Se realizaron tres repeticiones del ensayo, obteniéndose los resultados representados en la figura 14.

La enzima nativa inmovilizada precisó estudiar la actividad enzimática a valores superiores de concentración de sustrato, llegando hasta 10 mM según se muestra en la figura 14.

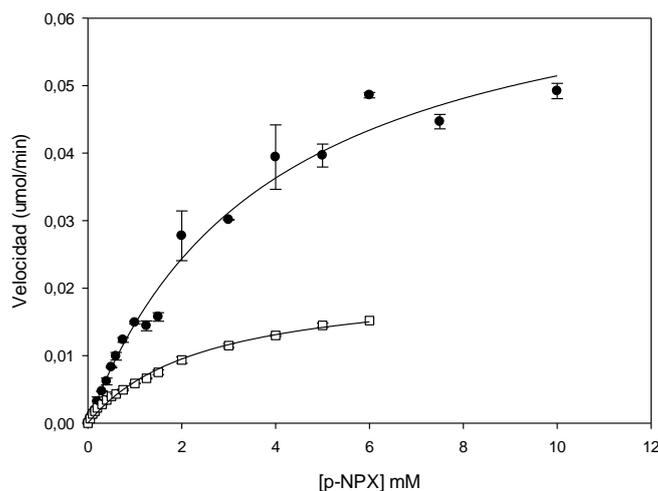


Figura 14. Estudio de la velocidad de hidrólisis del sustrato *p*-NPX de la enzima nativa libre (□) y para la enzima nativa inmovilizada (●)

Los parámetros cinéticos para la enzima nativa libre e inmovilizada que se obtuvieron, se recogen en la tabla 13.

XynB2WT	V_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_m (mM)	concentración de catalizador en la reacción (μmol)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Libre	0,02	2,44	$6,82 \cdot 10^{-6}$	48,88	20,03
CLEA	0,07	3,86	$1,12 \cdot 10^{-4}$	10,41	2,70

Tabla 13. Parámetros cinéticos de XynB2WT libre e inmovilizada.

El valor de K_m de la enzima libre resultó ser menor que el de la enzima inmovilizada, lo que demuestra que la interacción del sustrato con la enzima cuando ésta está libre es ligeramente mayor. El incremento del valor de K_m de XynB2WT-CLEAs puede ser parcialmente atribuido a la existencia de resistencia en la transferencia de masa entre el sustrato y la enzima inmovilizada, así como a la menor libertad conformacional de la β -xilosidasa causada por la reticulación y la adición de BSA. El aumento en el valor de K_m de la enzima inmovilizada también se ha observado previamente para otras enzimas inmovilizadas como CLEAs (Dong y col., 2010; Li y col., 2015; Xu y col., 2020).

La eficiencia catalítica k_{cat} para la enzima libre resultó de 49 s^{-1} , un valor intermedio a lo reportado por Bravman y col., 2001 ($14,6 \text{ s}^{-1}$) y por Contreras y col., 2008 (107 s^{-1}). Según la tabla 13, la k_{cat} de la enzima nativa inmovilizada fue de $10,41 \text{ s}^{-1}$ provocando que la eficiencia catalítica de la enzima inmovilizada sea menor a la enzima libre. Esta disminución en la eficiencia catalítica puede deberse a la diferencia de concentración de proteína utilizada en la reacción de enzima libre e inmovilizada, siendo la enzima libre casi 20 veces menor.

6.7.2. Enzima mutada.

XynB2^{Y509E} tanto libre como inmovilizada se estudió a concentraciones de sustrato de entre 0 y 5 mM. Se realizaron tres repeticiones del ensayo, obteniéndose los resultados representados en la figura 15.

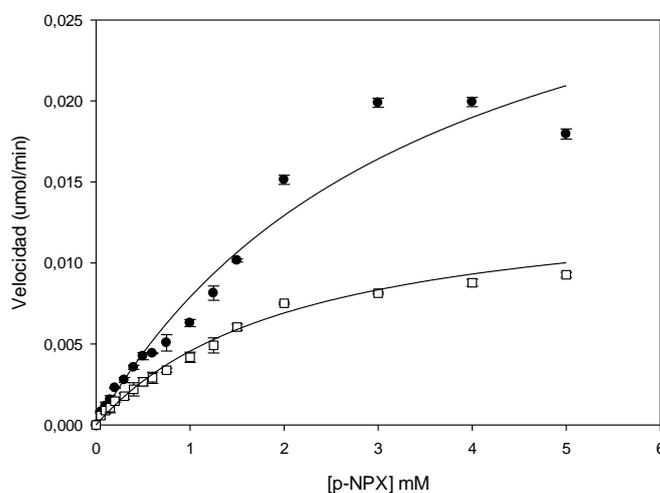


Figura 15. Estudio de la velocidad de hidrólisis del sustrato *p*-NPX para la enzima mutada libre (□) y para la enzima mutada inmovilizada (●)

Los parámetros cinéticos para la enzima mutada obtenidos como se explica en el subapartado 6.7. de este mismo apartado, se recogen en la tabla 14.

XynB2 ^{Y509E}	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_m (mM)	Concentración de catalizador en la reacción (μmol)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Libre	0,01	2,13	$6,82 \cdot 10^{-6}$	24,43	11,47
CLEA	0,04	3,53	$1,36 \cdot 10^{-4}$	4,90	1,39

Tabla 14. Parámetros cinéticos correspondientes a XynB2^{Y509E} libre e inmovilizada.

La K_m del mutante libre fue de 2,13 mM, un valor similar a lo reportado previamente para esta forma enzimática por Huang y col., 2014 y Romero y col., 2021. El valor de K_m cuando se inmovilizó el mutante aumentó de 2,13 mM a 3,53 mM, este aumento puede atribuirse como en el caso de la forma nativa inmovilizada, a una reducción en la accesibilidad del sustrato debido al entrecruzamiento tal y como ha sido reportado para muchas otras enzimas inmovilizadas como CLEAs. La eficiencia catalítica del mutante inmovilizado también fue menor a su forma libre debido la diferencia de concentración de proteína utilizada en la reacción de enzima libre e inmovilizada, siendo la enzima libre casi 25 veces menor.

6.8. Estudio de la termoestabilidad enzimática; CLEAs vs enzima libre.

Aunque los parámetros cinéticos determinados para las dos formas inmovilizadas sugieren una pérdida de la eficiencia catalítica debido a la inmovilización, se quiso estudiar si la inmovilización de las enzimas aumenta su resistencia a la temperatura. Las reacciones enzimáticas para el estudio de la termoestabilidad se llevaron a cabo a las temperaturas y pH óptimos para cada enzima (Tabla 12). Se incubó el agregado proteico con 180 μL de tampón óptimo durante 1 hora a diferentes temperaturas y se llevó a cabo la reacción siguiendo el protocolo descrito en el subapartado 5.10.4. del apartado 5. de materiales y métodos.

6.8.1. Enzima nativa.

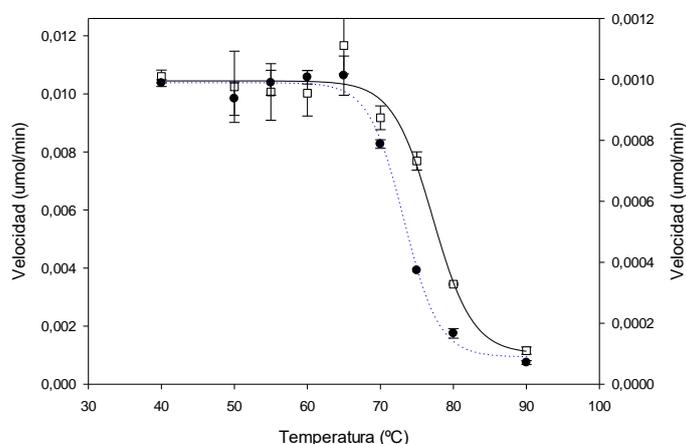


Figura 16. Estudio de la termoestabilidad para XynB2WT libre (lado izquierdo del eje de ordenadas) (□) y para XynB2WT inmovilizada (lado derecho del eje de ordenadas) (●).

En la figura 16 se muestran las dos curvas obtenidas para la enzima nativa en sus formas libre e inmovilizada en los CLEAs, donde se observa que ambas formas enzimáticas son termoestables hasta pasados los 70 °C. A partir de aquí, la actividad enzimática comenzó a disminuir a medida que aumentaba la temperatura de incubación. La enzima libre muestra una transición con un punto medio (T_m) de 77,1 °C, lo cual está en correspondencia con lo reportado por Contreras y col., 2008 (77 °C). La curva de la enzima nativa inmovilizada en CLEAs muestra una transición que comienza antes, con un punto medio a menor temperatura. La T_m para la enzima nativa inmovilizada resultó ser de 73,2 °C, es decir casi 4 °C menos que la observada para la enzima nativa en su forma libre. Este resultado sugiere que la inmovilización en CLEAs no mejora la estabilidad térmica de la β -xilosidasa bajo estudio.

6.8.2. Enzima mutada.

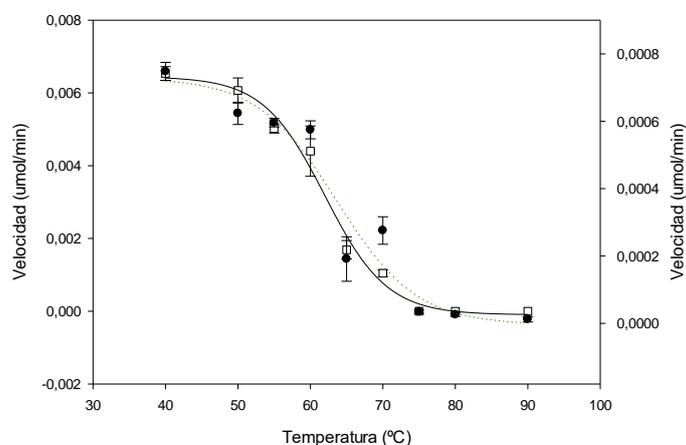


Figura 17. Estudio de la termoestabilidad para la enzima mutada libre (lado izquierdo del eje de ordenadas) (\square) y para la enzima mutada inmovilizada (lado derecho del eje de ordenadas) (\bullet).

Para el caso de la XynB2^{Y509E} libre se encontró una T_m de 62 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 17). Este parámetro es la primera vez que se reporta para este mutante. Huang y col en 2014 reportaron que la enzima pierde más del 80% de su actividad después de ser incubada 1 h a 65 $^{\circ}\text{C}$, por lo que el valor de T_m obtenido en este TFG está en concordancia. El valor de T_m para el mutante inmovilizado fue de 63 $^{\circ}\text{C}$, por lo que se puede indicar que en el caso del mutante la inmovilización si le protege de la inactivación térmica. Este último resultado está en concordancia con lo reportado por Romero y col., 2021 donde vieron que a 70 $^{\circ}\text{C}$ XynB2^{Y509E} CLEA se mantuvo estable mientras que XynB2^{Y509E} libre perdió hasta el 80% de actividad a esta temperatura.

6.9. Estudio del número de ciclos reutilizables de la proteína inmovilizada.

Una de las principales ventajas de cualquier método de inmovilización es que permite tener una preparación enzimática reutilizable. En nuestro caso, dado que la inmovilización realizada no produjo un aumento en la resistencia térmica y química de las dos enzimas bajo estudio, quisimos evaluar la estabilidad operacional de los CLEAs a través de sucesivos ciclos de reutilización.

6.9.1. Enzima nativa.

La figura 18 muestra la caída de la actividad de los CLEAs de la enzima nativa a pH 5 y pH 6,5. Se hizo a estos dos pH's ya que el pH óptimo de la enzima nativa libre fue de 6,5 mientras que la de su forma inmovilizada fue 5. Se observa que el primer ciclo del CLEAs a pH 5 presentó más actividad que cuando se hizo a pH 6,5 lo cual ratifica el resultado de que el pH óptimo de la enzima nativa inmovilizada es de 5. De forma general se puede observar que la actividad de la enzima inmovilizada independientemente del pH disminuye mientras el número de ciclos de reúso aumenta. Esta pérdida de actividad puede ser principalmente atribuida a los lavados y centrifugación realizados para preparar al catalizador para un nuevo ciclo de actividad tal y como ha sido reportado por Li y col., (2015) que del mismo modo observaron una bajada de actividad catalítica al lavar y centrifugar los CLEAs de Bgal1-3.

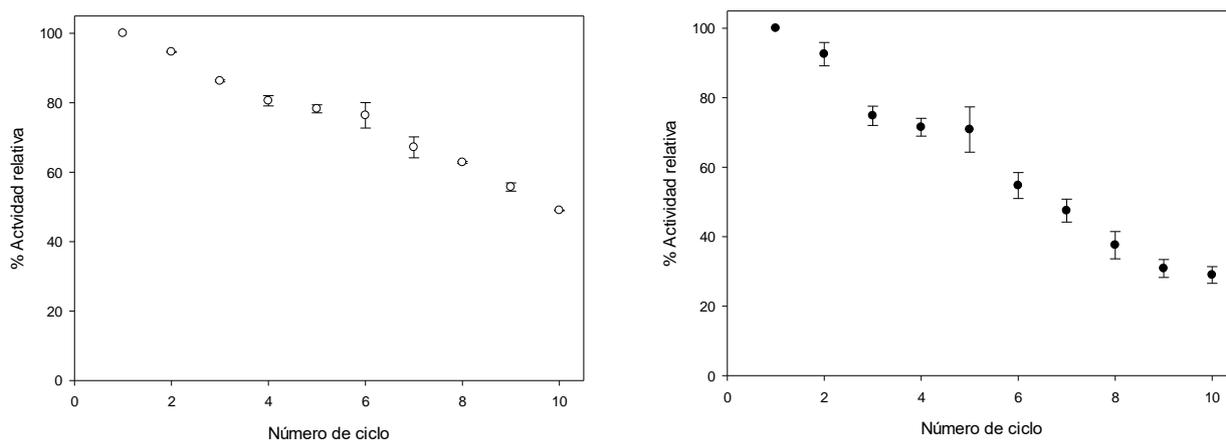


Figura 18. Estudio del número de ciclos reutilizables para XynB2WT inmovilizada. Los blancos (○) se corresponden a la actividad medida a pH 6.5. Los puntos negros (●) corresponden a la actividad medida a pH 5.

Si se hace un análisis más detallado de la caída de la actividad, se puede concluir que los CLEAs a pH 6,5 son más estables que a pH 5. En ese sentido se puede observar que en el ciclo n° 5, el porcentaje de la actividad relativa del CLEA a pH 6,5 fue del 78% mientras que a pH 5 fue del 73%. En el ciclo número 10 esta diferencia se aprecia mejor, ya que la actividad relativa a pH 6,5 fue de 50% mientras que a pH 5 fue solo del 25%. El hecho de que el CLEAs a pH 6,5 mantenga un 50% de su actividad después de diez ciclos de reutilización confirma su elevada utilidad en futuras aplicaciones biotecnológicas de esta enzima, en comparación a la enzima libre, que, si bien es más activa, solamente puede ser utilizada una única vez. Además de esta circunstancia, indicar que el producto de la reacción puede ser separado del biocatalizador inmovilizado de una forma más sencilla que si se utiliza una proteína libre en la reacción.

6.9.2. Enzima mutada.

La actividad de los diferentes ciclos de reutilización para los CLEAs de XynB2^{Y509E} se estudió a pH 6,5, según lo explicado en el subapartado 5.10.5. del apartado 5. de materiales y métodos. En la figura 19 se puede observar un comportamiento similar a lo observado para los CLEAs de la enzima nativa, ya que la actividad disminuye conforme aumentan los ciclos. En el ciclo 5, la actividad es de un 72% respecto a la actividad del primer ciclo, mientras que en el ciclo 10, la actividad cae hasta un 42%, lo cual es un 18% menos que lo reportado por Romero y col. 2021 para CLEAs preparados con esta misma forma enzimática. El que en este TFG se obtenga una pérdida mayor de la actividad en el ciclo 10, puede deberse al hecho que los CLEAs producidos en este trabajo son trece veces más pequeños, lo cual afecta a la transferencia de masa durante la reacción catalítica y a la recuperación tras cada ciclo de reutilización.

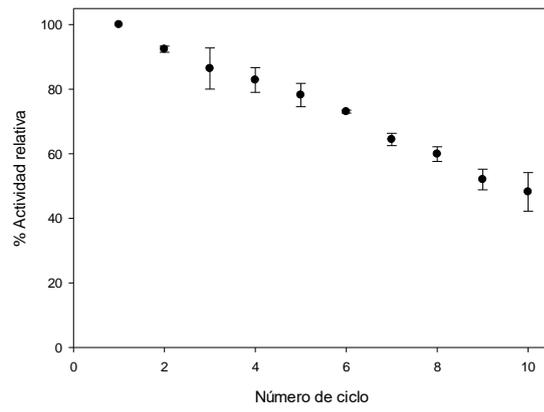


Figura 19. Estudio del número de ciclos con lavado reutilizables para XynB2^{Y509E} inmovilizada.

7. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio, se han purificado a homogeneidad y de forma activa las enzimas recombinantes β -xilosidasa de *Geobacillus stearothermophilus* en su forma nativa (XynB2WT) y mutada en el aminoácido tirosina 509 por un ácido glutámico (XynB2^{Y509E}).
2. Se han inmovilizado ambas enzimas mediante la técnica de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs). La técnica de Microscopia Electrónica de Barrido ha evidenciado la homogeneidad de la muestra con agregados de pequeño tamaño. Esto puede ser debido al corto periodo de entrecruzamiento con el agente glutaraldehído.
3. Los biocatalizadores producidos mostraron una elevada pérdida de proteína, aunque el porcentaje de actividad recuperada fue sensiblemente mayor.
4. Los biocatalizadores inmovilizados mostraron características bioquímicas similares a las enzimas libres, en cuanto a los parámetros óptimos de reacción y termoestabilidad. Por el contrario, la eficiencia catalítica de los agregados fue significativamente menor que la exhibida por las enzimas libres.
5. Los biocatalizadores preparados después de 10 ciclos de reutilización conservan un 50% de su actividad catalítica inicial, lo cual sugiere una buena estabilidad operacional y su potencial en aplicaciones prácticas futuras.
6. El estudio llevado a cabo en este TFG avala que una de las grandes ventajas de los métodos de inmovilización es su utilidad para recuperar formas enzimáticas activas libres del sustrato y producto de la reacción enzimática.

8. BIBLIOGRAFÍA

Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharm*, 39(2), 23-39.

Ben-David, A., Bravman, T., Balazs, Y. S., Czjzek, M., Schomburg, D., Shoham, G., & Shoham, Y. (2007). Glycosynthase activity of *Geobacillus stearothermophilus* GH52 β -xylosidase: efficient synthesis of xylooligosaccharides from α -D-xylopyranosyl fluoride through a conjugated reaction. *Chembiochem*, 8(17), 2145-2151.

Bhattacharya, A., & Pletschke, B. I. (2014). Magnetic cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): a novel concept towards carrier free immobilization of lignocellulolytic enzymes. *Enzyme Microb Technol*, 61, 17-27.

Bhattacharya, A., & Pletschke, B. I. (2015). Strategic optimization of xylanase–mannanase combi-CLEAs for synergistic and efficient hydrolysis of complex lignocellulosic substrates. *J Mol Catal B Enzym*, 115, 140-150.

Bravman, T., Zolotnitsky, G., Belakhov, V., Shoham, G., Henrissat, B., Baasov, T., & Shoham, Y. (2003). Detailed kinetic analysis of a family 52 glycoside hydrolase: a β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Biochemistry*, 42(35), 10528-10536.

Bravman, T., Zolotnitsky, G., Shulami, S., Belakhov, V., Solomon, D., Baasov, T., Shoham, G., & Shoham, Y. (2001). Stereochemistry of family 52 glycosyl hydrolases: a β -xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6 is a retaining enzyme. *FEBS Lett.*, 495(1-2), 39-43.

Bribiesca, B. L. C. (2013). Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *VERTIENTES Revista especializada en ciencias de la salud*, 16(1), 19-22.

Charoenwongpaiboon, T., Pichyangkura, R., A Field, R., & Prousoontorn, M. H. (2019). Preparation of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) of an inulosucrase mutant for the enzymatic synthesis of inulin-type fructooligosaccharides. *Catalysts*, 9(8), 641.

Contreras, L. M., Gómez, J., Prieto, J., Clemente-Jiménez, J. M., Las Heras-Vázquez, F. J., Rodríguez-Vico, F., Blanco, F. J. & Neira, J. L. (2008). The family 52 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* is a dimer: Structural and biophysical characterization of a glycoside hydrolase. *Biochim Biophys Acta*, 1784(12), 1924-1934.

Dalal, S., Kapoor, M., & Gupta, M. N. (2007). Preparation and characterization of combi-CLEAs catalyzing multiple non-cascade reactions. *J Mol Catal B Enzym*, 44(3-4), 128-132.

Dann, R., Lansky, S., Lavid, N., Zehavi, A., Belakhov, V., Baasov, T., Dvir, H., Manjasetty, B., Belrhali, H., Shoham, Y., & Shoham, G. (2014). Preliminary crystallographic analysis of Xyn52B2, a GH52 β -d-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T6. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 70(12), 1675-1682.

Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotechnol*, 3(1), 1-9.

- Dong, T., Zhao, L., Huang, Y., & Tan, X. (2010). Preparation of cross-linked aggregates of aminoacylase from *Aspergillus melleus* by using bovine serum albumin as an inert additive. *Bioresour Technol*, 101(16), 6569-6571.
- Drula, E., Garron, M. L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B., & Terrapon, N. (2022). The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Res*, 50(D1), D571-D577.
- Espina, G., Eley, K., Pompidor, G., Schneider, T. R., Crennell, S. J., & Danson, M. J. (2014). A novel β -xylosidase structure from *Geobacillus thermoglucosidasius*: the first crystal structure of a glycoside hydrolase family GH52 enzyme reveals unpredicted similarity to other glycoside hydrolase folds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 70(5), 1366-1374.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. En: Walker J.M. (eds) *The Proteomics Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Totowa, NJ:Humana Press, pp. 571-607.
- Huang, Z., Liu, X., Zhang, S., & Liu, Z. (2014). GH52 xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*: characterization and introduction of xylanase activity by site-directed mutagenesis of Tyr509. *J Microbiol Biotechnol*, 41(1), 65-74.
- Javier-Pastor, F.I, Óscar, G., Sanz-Aparicio, J., & Díaz, P. (2007). Xylanases: molecular properties and applications. En: Polaina J., MacCabe A.P. (eds) *Industrial Enzymes*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_5 pp 65-82.
- Li, L., Li, G., Cao, L. C., Ren, G. H., Kong, W., Wang, S. D., Guo, G. S & Liu, Y. H. (2015). Characterization of the cross-linked enzyme aggregates of a novel β -galactosidase, a potential catalyst for the synthesis of galacto-oligosaccharides. *J Agric Food Chem*, 63(3), 894-901.
- López-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Alonso, N., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2005). Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: a simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase. *Biomacromolecules*, 6(4), 1839-1842.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
- Matheus, P. R., Abad, J. M., & Fernández, V. M. (2007). Modification of gold surfaces for the oriented immobilization of recombinant form of horseradish peroxidase. *Rev Téc Ing Univ Zulia*, 30(3), 225-235.
- McKee, L. S., Peña, M. J., Rogowski, A., Jackson, A., Lewis, R. J., York, W. S., Krogh, K. B. R. M, Vikso-Nielsen, A., Skjot, M., Gilbert, H. J. & Marles-Wright, J. (2012). Introducing endo-xylanase activity into an exo-acting arabinofuranosidase that targets side chains. *Proc Natl Acad Sci*, 109(17), 6537-6542.
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 29(2), 205-220.
- Pchelintsev, N. A., Youshko, M. I., & Švedas, V. K. (2009). Quantitative characteristic of the catalytic properties and microstructure of cross-linked enzyme aggregates of penicillin acylase. *J Mol Catal B Enzym*, 56(4), 202-207.

Ramírez-Tapias, Y. A. (2018). Desarrollo de biocatalizadores inmovilizados y su aplicación en la industria alimentaria y ambiental. Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes, Universidad Nacional de Quilmes, 1-167 <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/1941>

Rodríguez-Alegría M.E. & Castillo-Rosales E. (2014). Enzimas aplicadas en procesos industriales. *Revista digital universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México*, 15(12), 1-11 <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art96/>

Rohman, A., Dijkstra, B. W., & Puspaningsih, N. N. T. (2019). β -Xylosidasas: structural diversity, catalytic mechanism, and inhibition by monosaccharides. *Int J Mol Sci*, 20(22), 5524.

Romero, G., Contreras, L. M., Aguirre, C., Wilkesman, J., Clemente-Jiménez, J. M., Rodríguez-Vico, F., & Javier, F. (2021). Characterization of Cross-Linked Enzyme Aggregates of the Y509E Mutant of a Glycoside Hydrolase Family 52 β -xylosidase from *G. stearothermophilus*. *Molecules*, 26(2), 451.

Sardar, M., Roy, I., & Gupta, M. N. (2000). Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer Eudragit™ L-100. *Enzyme Microb Technol*, 27(9), 672-679.

Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A. P. G., Van Rantwijk, F., van der Wielen, L. A.M & Sheldon, R. A. (2004). Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol Bioeng*, 87(6), 754-762.

Shah, S., Sharma, A., & Gupta, M. N. (2006). Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Anal Biochem*, 351(2), 207-213.

Sheldon, R. A. (2011). Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl Microbiol Biotechnol*, 92(3), 467-477.

Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev.*, 42(15), 6223-6235.

Sirisha, V. L., Jain, A., & Jain, A. (2016). Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *Adv Food Nutr Res*, 79, 179-211.

Talekar, S., Joshi, A., Joshi, G., Kamat, P., Haripurkar, R., & Kambale, S. (2013). Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). *RSC Adv*, 3(31), 12485-12511.

Torabizadeh, H., Tavakoli, M., & Safari, M. (2014). Immobilization of thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* by cross-linked enzyme aggregates method using calcium and sodium ions as additives. *J Mol Catal B Enzym*, 108, 13-20.

Velasco-Lozano, S., López-Gallego, F., Mateos-Díaz, J. C., & Favela-Torres, E. (2016). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement—a review. *Biocatalysis*, 1(1), 166-177.

Verma, R., Kumar, A., & Kumar, S. (2019). Synthesis and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of thermostable xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* X1. *Process Biochem*, 80, 72-79.

Wilson, L., Illanes, A., Pessela, B. C., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2004). Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: evaluation of a novel biocatalyst in organic media. *Biotechnol Bioeng*, *86*(5), 558-562.

Xu, M. Q., Li, F. L., Yu, W. Q., Li, R. F., & Zhang, Y. W. (2020). Combined cross-linked enzyme aggregates of glycerol dehydrogenase and NADH oxidase for high efficiency in situ NAD⁺ regeneration. *Int J Biol Macromol*, *144*, 1013-1021.

Yu, C. Y., Li, X. F., Lou, W. Y., & Zong, M. H. (2013). Cross-linked enzyme aggregates of Mung bean epoxide hydrolases: a highly active, stable and recyclable biocatalyst for asymmetric hydrolysis of epoxides. *J Biotechnol*, *166*(1-2), 12-19.

Yu, H. W., Chen, H., Wang, X., Yang, Y. Y., & Ching, C. B. (2006). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: application to *Candida rugosa* lipase. *J Mol Catal B Enzym*, *43*(1-4), 124-127.