

EXPRESIÓN HETEROLOGA DE LA ENDOGLUCANASA (EglA) de *Aspergillus niger* ITV-02 EN *Escherichia coli*

Yerarli Isabel Pérez Salazar, Carolina Peña Montes, Sandra Trinidad del Moral Ventura, María Guadalupe Aguilar Uscanga, Instituto Nacional de México Campus Veracruz – UNIDA, Veracruz, Ver, cp. 2779, maria.au@veracruz.tecnm.mx

Palabras clave: endoglucanasa, Aspergillus niger ITV-02, Escherichia coli BL21.

Introducción. La endoglucanasa (E.C. 3.2.1.4) es una enzima que hidroliza los enlaces β 1-4 del polímero de celulosa que está presente en residuos lignocelulósicos. Los residuos lignocelulósicos son usados para la producción de bioetanol, sin embargo, se requiere de su hidrólisis enzimática para la obtención de azúcares fermentables como la glucosa. La etapa de hidrólisis enzimática es la etapa limitante del proceso, por lo que se requieren enzimas eficientes, como las endoglucanasas, para reducir los costos de producción. *Aspergillus niger* ITV-02 obtenido de la corteza de manera, presenta actividad endoglucanasa. El objetivo del presente trabajo fue expresar la endoglucanasa de *A. niger* ITV-02 en *E. coli* BL21 y caracterizar los productos de hidrólisis de carboximetil celulosa (CMC).

Metodología. Se clonó la endoglucanasa en pET-22b(+) y se transformó para su expresión en *E. coli* BL21. Se realizó escrutinio de las colonias transformadas a 27°C después de inducción con IPTG y se seleccionó la que mostró mayor actividad de manera cualitativa. Se produjo la enzima y se determinó su actividad enzimática a 50 °C utilizando como sustrato el CMC 1% (p/v). Se observó la expresión de la enzima por medio de geles SDS-PAGE y zimograma. Se determinaron los productos de la hidrólisis de CMC por cromatografía de capa fina.

Resultados. Se amplificó el gen que codifica para la endoglucanasa con un peso estimado de 695 pb y se clonó en pET-22, posteriormente se transformó *E. coli* BL21. De las colonias obtenidas de la transformación se seleccionaron tres, y se obtuvo la expresión de la enzima en medio líquido, siendo la colonia número 8 la que presentó mayor halo de actividad (1.6 cm), por lo que fue seleccionada. Se indujo la expresión de la enzima con IPTG y las actividades fueron de 0.154 U/mL, y 0.187 U/mg. Quay *et al.*, (2011) reportan una endoglucanasa expresada en el sistema *Pichia pastoris*. La actividad obtenida en el presente trabajo es 1.1 veces mayor que la expresada en *P. pastoris*. En trabajos previos con el sistema nativo (*A. niger* ITV-02) en el grupo de trabajo, se reporta una actividad usando como sustrato CMC en un rango de 0.006 a 1.33 U/mL, por lo que la actividad enzimática obtenida

en este trabajo es 25.66 veces mayor a lo reportado por Miranda-Sosa *et al.* (2019) y 8.63 veces menor a lo reportado por Peña *et al.* (2022). Sin embargo, para evaluar la eficiencia de la producción se comparó la productividad de actividad enzimática obtenida (0.0154 U mL⁻¹ h⁻¹) con el de Peña *et al* 2022, y resultó mayor en el presente trabajo 1.4 veces. Se realizó un zimograma y el peso molecular de la endoglucanasa corresponde al valor teórico (25 kDa).

Con respecto a los productos formados durante la hidrólisis se obtuvieron diferentes oligosacáridos apareciendo la celobiosa entre los 6 y 12 minutos aproximadamente y conforme incrementó el tiempo se formaron otros oligosacáridos de mayor tamaño, sin embargo no se observó la formación de glucosa.

Conclusiones. La endoglucanasa expresada en *E. coli* BL21 presenta una actividad enzimática mayor a la obtenida en el sistema nativo y a la de otros sistemas de expresión como *P. pastoris*. La enzima recombinante EglA cataliza la hidrólisis de los enlaces β ,1-4 del CMC a 27 °C y 50 °C, formando diferentes oligosacáridos.

Agradecimiento. A CONACYT por la beca de doctorado otorgada a Yerarli Isabel Pérez Salazar con número de CVU 737182 y por el proyecto de investigación CP 11111304 de COVEICYDET.

Bibliografía.

1. Infanzón-Rodríguez, M.I., del Moral, S., Castro-Martínez, C. *et al.* Multi-Response Optimization Using the Desirability Function of Exoglucanases, Endoglucanases and β -Glucosidases Production by *Aspergillus Niger* ITV-02 from Delignified Sugarcane Bagasse. Sugar Tech 25, 86–98 (2023).
2. Miranda-Sosa, A., del Moral-Ventura, S. T., Aguilar-Uscanga, M. G., & Domínguez-González, J. M. (2019). *Producción de celulasas de aspergillus niger itv-02 utilizando diferentes residuos lignocelulósicos*. 1.
3. Peña, C., Perez, Y., Aguilar-Uscanga, M., & moral, sandra. (2022). Cellulases production from *Aspergillus niger*-ITV-02 using corn lignocellulosic residues. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 21. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim2772>
4. Quay, D. H. X., Bakar, F. D. A., Rabu, A., Said, M., Illias, R. M., Mahadi, N. M., Hassan, O., & Murad, A. M. A. (2011). Overexpression, purification and characterization of the *Aspergillus niger* endoglucanase, EglA, in *Pichia pastoris*. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), Article 11. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i11>