



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República  
(PROPAC)

**“Producción de enzimas xilanolíticas por *Aspergillus niger* GS1, y expresión homóloga de una  $\beta$ -xilosidasa”**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**Presenta:**

M en C. Aldo Amaro Reyes

**Dirigido por:**

Dr. Carlos Regalado González

**SINODALES**

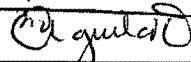
Dr. Carlos Regalado González  
Presidente

Dra. Blanca E. García Almendárez  
Secretario

Dr. Ramón G. Guevara González  
Vocal


Dr. Octavio Loera Corral  
Suplente

Dr. David Archer  
Suplente

  
Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz  
Director de la Facultad de Química

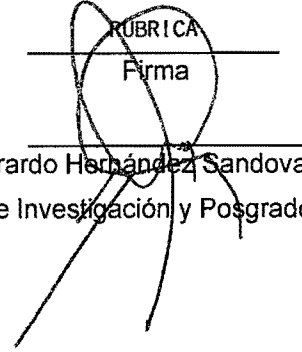
  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

RÚBRICA  
Firma

  
Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Febrero de 2011  
México

## Índice

<b>I. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>II. Abstract</b>	<b>2</b>
<b>III. Introducción</b>	<b>3</b>
<b>IV. Resumen en extenso y artículo original del primer artículo publicado</b>	<b>4</b>
<b>V. Resumen en extenso y artículo original del segundo artículo publicado</b>	<b>15</b>
<b>VI. Conclusiones generales</b>	<b>24</b>

## I. Resumen

Los subproductos agrícolas hemicelulósicos son materiales altamente disponibles, los cuales representan una oportunidad para desarrollar productos de valor agregado. El xilano constituye la segunda fuente más abundante de carbono orgánico renovable de la Tierra, y se encuentra en las paredes celulares de las plantas en forma de hemicelulosa. Las endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasas (EC 3.2.1.8) y exo  $\beta$ -xilosidasas (CE 3.2.1.37) catalizan la hidrólisis del xilano. Existe un interés creciente en la producción de enzimas xilanolíticas para aplicaciones industriales tales como la bioconversión de residuos agroindustriales a biocombustibles, edulcorantes bajos en calorías y productos farmacológicos. En este trabajo se presenta la caracterización parcial de una  $\beta$ -xilosidasa purificada de *A. niger* GS1 expresada en un sistema fúngico, y la eficiencia de la producción de xilanasas tanto en fermentación sumergida (FSm) como en estado sólido (FES) mediante la co-transformación homóloga de *A. niger* AB4.1. Ambas enzimas recombinantes se expresaron en *A. niger* AB4.1 bajo el control del promotor *gdpA* y el terminador *trpC* de *A. nidulans*. Los sistemas de expresión fueron diseñados para producir enzimas recombinantes conteniendo un péptido de seis histidinas fusionado en su extremo carboxilo para purificarlas mediante cromatografía de afinidad. La  $\beta$ -xilosidasa mostró un peso molecular de 90 kDa, y actividad de 4280 U mg de proteína<sup>-1</sup> a 70°C, pH 3.6. La vida media fue de 74 min a 70°C, la energía de activación fue de 58.9 kJ mol<sup>-1</sup>, y a 50°C se observó una estabilidad óptima a un pH de 4.0 a 5.0. Una productividad de 17,1 U L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> fue estimada para FES, y 3.2 U L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para FSm calculado en el valor máximo de los títulos de xilanasas. La xilanasas recombinante obtenida por FES con fibra de poliuretano, fue purificada 5.1 veces, con una recuperación de 35.7%, mostró un peso molecular de 30 kDa, y actividad óptima (522 U mg de proteína<sup>-1</sup>) a pH 5.5 y 50°C. La  $\beta$ -xilosidasa mantuvo actividad residual por encima de 83% en presencia de 10 mM de DTT,  $\beta$ -mercaptoetanol, SDS, EDTA y Zn<sup>2+</sup>. La producción de una xilosidasa libre de hemicelulasas podría ofrecer algunas ventajas en aplicaciones tales como la alimentación animal, la síntesis enzimática y la industria de jugos de frutas. El sistema de expresión, utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte, es una alternativa adecuada para la producción homóloga de una endo-xilanasas por FES, en condiciones de expresión selectiva.

## II. Abstract

Hemicellulosic agricultural by-products are highly available materials, which represent an opportunity to develop value added products. Xylan constitutes the second most abundant source of renewable organic carbon on Earth, and is located in the cell walls of plants in the form of hemicellulose. Endo-1,4- $\beta$ -D-xylanases (E.C. 3.2.1.8) and exo- $\beta$ -xylosidases (E.C. 3.2.1.37) catalyze the hydrolysis of xylan. There is a growing interest in the production of xylanolytic enzymes for industrial applications such as bioconversion of agro-industrial residues to biofuels, low-calorie sweeteners, and pharmacological products. This work reports the partial characterization of a purified  $\beta$ -xylosidase from *A. niger* GS1 expressed on a fungal system and the efficiency of xylanase production under submerged (SmF) and solid-state (SSF) fermentations using the homologous co-transformed *A. niger* AB4.1. Both recombinant enzymes were expressed in *A. niger* AB4.1 under control of *A. nidulans* *gpdA* promoter and *trpC* terminator. Expression systems were designed to produce the recombinant enzymes containing a six-histidine peptide fused to the carboxyl end of the proteins to be purified by affinity chromatography.  $\beta$ -xylosidase showed a molecular weight of 90 kDa, and activity of 4280 U mg protein<sup>-1</sup> at 70°C, pH 3.6. Half-life was 74 min at 70°C, activation energy was 58.9 kJ mol<sup>-1</sup>, and at 50°C optimum stability was observed at pH 4.0-5.0. A productivity of 17.1 U L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> was estimated for SSF, and 3.2 U L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> for SmF calculated at peak value of xylanase titers. Recombinant xylanase obtained by SSF on polyurethane fiber, was purified 5.1-fold, with 35.7% recovery, showed a molecular weight of 30 kDa and optimal activity (522 U mg protein<sup>-1</sup>) at pH 5.5 and 50 °C.  $\beta$ -xylosidase kept residual activity above 83% in presence of 10 mM DTT,  $\beta$ -mercaptoethanol, SDS, EDTA and Zn<sup>2+</sup>. Production of a hemicellulolytic free xylosidase could give some advantages in applications such as animal feed, enzymatic synthesis and the fruit juice industry. The expression system, using PF as inert support, is a suitable alternative for production of homologous endo-xylanase by SSF, under conditions of selective expression of a single xylanase.

### III. Introducción

La hemicelulosa es la segunda fuente renovable de carbono orgánico más abundante de la Tierra con un alto potencial en el uso de sus productos de degradación en diversas industrias. Proviene principalmente de los subproductos resultantes de la actividad agroindustrial, tales como forrajes o esquilmos; cuyas paredes celulares tienen como componentes principales a la celulosa, hemicelulosa y lignina.

El valor agregado de estos residuos puede incrementarse al utilizarlos como fuente de energía en el crecimiento de microorganismos que los biotransformen, para obtener metabolitos con posibilidad de incorporarse en el procesamiento de alimentos destinados al consumo humano o animal y para la obtención de biocombustibles.

Las endo-xilanasas y exo-xilosidasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 presentes en la hemicelulosa. El interés por las xilanasas empezó alrededor de los años 50 debido a su enorme potencial para convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles. Las endo-xilanasas y exo-xilosidasas son producidas por una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos y bacterias. La producción microbiana de estas enzimas está sujeta a diferentes mecanismos de regulación. Por un lado, la inducción que se lleva a cabo por sus sustratos naturales, xilano para las xilanasas, y por otro la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como glucosa, xilosa, arabinosa o xilobiosa para las xilanasas.

Los hongos filamentosos pueden ser huéspedes exitosos para la producción de proteínas tanto heterólogas como homólogas (ejemplo: proteínas terapéuticas, anticuerpos recombinantes). Para esto se desarrollan vectores de expresión para proteínas homo- y heterólogas que faciliten el control de la expresión tanto en pequeña como a gran escala.

Una alternativa para una mejor producción de enzimas en hongos filamentosos es la fermentación en estado sólido; ya que emula las condiciones normales de crecimiento de estos organismos.

#### IV. Resumen en extenso y artículo original del primer artículo publicado

##### Expresión homóloga de una $\beta$ -xilosidasa de una cepa nativa de *Aspergillus niger*

Amaro-Reyes, A, García-Almendárez, B E, Vázquez-Mandujano, D G, Amaya-Llano, S, Castaño-Tostado, E, Guevara-González, R G, Loera, O, Regalado, C.

2010 Noviembre 30 - Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology; ISSN: 1476-5535; DOI: 10.1007/s10295-010-0912-5. [En prensa].

El xilano constituye la segunda fuente más abundante de carbono orgánico renovable en la Tierra, y se localiza en las paredes celulares de las plantas en forma de hemicelulosa (Singh *et al.*, 2003). Las  $\beta$ -1,4-xilano xilosidasas (EC 3.2.1.37) son enzimas que hidrolizan la unidad terminal de los extremos no reductores de los xilooligosacáridos provenientes de la actividad de endo- $\beta$ -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8, Rasmussen *et al.*, 2006). Esto es importante porque la  $\beta$ -xilosidasa puede eliminar la inhibición por producto final de las endoxilanasas, mientras que también es efectiva en reacciones de transglicosilación donde unidades de monosacáridos o alcoholes se anexan e escinden de las unidades de xilosa (Knob *et al.*, 2010). Existe un creciente interés en desarrollar enzimas xilanolíticas generadas con elevados rendimientos y bajo costo de producción para aplicarlas en procesos industriales tales como bioconversión de residuos agroindustriales en biocombustibles, endulzantes de bajo contenido calórico y productos farmacéuticos (Polizeli *et al.*, 2005). El mercado mundial de estas enzimas se estima alrededor de los \$200 millones de dólares por año (Liu *et al.*, 2008).

Los hongos filamentosos como productores potenciales de enzimas resultan ser más atractivos que las bacterias debido a que poseen la habilidad natural de secretar elevados niveles de enzimas en el medio de cultivo. (Okafor *et al.*, 2007). Se ha reportado en una extensa variedad de estudios la inducción de enzimas hemicelulolíticas con diversos residuos hemicelulósicos (olote de maíz, bagaso de caña de azúcar, salvado de trigo, paja de trigo y paja de arroz) como la fuente principal de carbono usando especies de *Aspergillus* (Lenartovicz *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2007). Sin embargo, algunas

aplicaciones industriales requieren xilanasas y xilosidasas libres de otras actividades hemicelulolíticas tal como de celulasas, así como también se requiere estabilidad enzimática en un rango amplio de valores tanto de temperatura como de pH (Polizeli *et al.*, 2005).

Una cepa de *Aspergillus* fue aislada en México a partir de pasta de copra, y ha demostrado producir una gran variedad de enzimas degradadoras de paredes celulares de plantas usando diferentes sustratos por medio de fermentación en estado sólido (Regalado *et al.*, 2000). La identificación molecular de esta nueva y potencialmente útil cepa de *Aspergillus* así como sus genes no ha sido reportada aún.

Algunos inductores naturales de genes xilanolíticos en *Aspergillus* pueden ser los productos de la degradación o procesos de transglicosilación del xilano, tales como D-xilosa, xilobiosa, xilotriosa y xilotetrosa (Shallom y Shoham, 2003). Sin embargo, en presencia de fuentes de carbono fácilmente metabolizables como la D-glucosa, se ve inhibida la expresión de genes implicados en el uso de fuentes de carbono menos favorecidas, como lo es el sistema xilanolítico, debido a la represión catabólica de carbono (Prathumpai *et al.*, 2004). Por lo tanto, aquí se describe el diseño de un sistema capaz de producir una  $\beta$ -xilosidasa, incluso en presencia de su represor. Este trabajo tuvo como objetivo expresar constitutivamente y parcialmente caracterizan una  $\beta$ -xilosidasa de la cepa nativa de *A. niger* GS1 por medio de un sistema fúngico.

Se utilizó como fuente de genes de xilosidasa la cepa de *Aspergillus niger* GS1 (NCBI No. GU395669, UAQ, Querétaro, México). La conserva de esporas aisladas de *A. niger* GS1 y los cultivos frescos fueron obtenidos como lo describió Regalado *et al.* (2000). Para la propagación de los vectores se utilizaron células de *Escherichia coli* JM109 (Promega) cultivándose a 37°C en medio Luria-Bertani suplementado con 100 ml g<sup>-1</sup> ampicilina. Los vectores utilizados fueron el plásmido pGEM-T (Promega) como vector de clonación y el pAN52.1 se utilizó para construir el vector de expresión constitutiva pANJil bajo control del promotor *gpdA* y terminador *trpC* (ambos de *A. nidulans*) separados por sitios *Bam*HI y *Nco*I. La cepa de *A. niger* AB4.1 (*pyrG*<sup>-</sup>) se utilizó para la expresión homólogos del gen de xilosidasa (*xlnD*) (van Hartingsveldt *et al.*, 1978). El marcador de

selección utilizado fue el vector pAB4.1 (*pyrG*) (van Hartingsveldt *et al.*, 1978). Estos dos últimos vectores fueron amablemente proporcionados por el Dr. Punt (TNO, Holanda).

Luego de crecer *A. niger* GS1 de 2-3 d en medio conteniendo xilano de avena como principal fuente de carbono ( $\text{g l}^{-1}$ ) (xilano de avena, 25; extracto de levadura, 5; agar-agar, 15) se colectó el micelio y de este se realizó la extracción de ARN utilizando el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). La identificación molecular de *A. niger* GS1 se realizó mediante la secuenciación del ADN ribosomal 26S (GBC-IPN, México). A partir del ARN total (2  $\mu\text{g}$ ) extraído se obtuvo el cADN siguiendo las instrucciones del kit RevertAidH Minus (Fermentas). El cADN se utilizó como plantilla para amplificar mediante PCR (*Taq* recombinante, Invitrogen) el gen de la xilosidasa utilizando los cebadores adelante (JilF 5'-CCATGGATGGCGCACTCAATGTCTCG-3'), y reverso (JilR 5'-CTGGATCCCTAGTGGTGATGGTGATGCTCCTTCCCCGGCCAC-3'), diseñados utilizando secuencias reportadas en el NCBI que codifican para genes de  $\beta$ -1,4-xilano xilosidasa pertenecientes a cepas de *A. niger*. Las bases que codifican para la etiqueta de histidina se muestran en cursiva.

El producto amplificado fue ligado en el vector pGEM-T y este fue clonado mediante choque térmico en *E. coli* JM109. El inserto fue confirmado por la secuenciación (MCLab) de los plásmidos extraídos y después el marco de lectura abierta de ADN fue clonado en el vector de expresión pAN52.1 (sitios de clonación: *Nco*I y *Bam*HI) obteniendo el vector pANJil.

La transformación de la cepa de *A. niger* AB4.1 se llevó a cabo mediante el procedimiento reportado por Sánchez y Aguirre (1996) desarrollado para *A. nidulans*, con las siguientes modificaciones: caldo papa dextrosa suplementado con uridina ( $2.5 \text{ g l}^{-1}$ ) como medio de cultivo, temperatura de incubación 30° C, esporas germinadas en 15 h, tampón de electroporación (10 mM Tris-HCl [pH 7.3], 270 mM de sacarosa, 1 mM HEPES, 10 mM RbCl, LiCl 10 mM). Para la electroporación de las esporas germinadas se usaron 2  $\mu\text{g}$  de ADN total (vector de expresión pANJil con vector de selección pAB4.1 en una proporción de volumen 10:1), una cubeta de 0.2 cm y los pulsos eléctricos fueron proporcionados por un aparato MicroPulser electroporación (Bio-Rad), el ajuste de voltaje a 1.4 kV con una duración aproximada de 3.5 ms.



Las esporas electroporadas ( $100 \mu\text{l placa}^{-1}$ ) se extendieron sobre agar mínimo con sorbitol que contenía ( $\text{g l}^{-1}$ ): glucosa, 10; sorbitol, 218.64;  $\text{NaNO}_3$ , 6;  $\text{KCl}$ , 0.52,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.52; oligoelementos:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.022;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.011;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.005;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.005;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.0017;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.0016;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.0015;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0.05; sin uridina. Las esporas se incubaron a  $30^\circ\text{C}$ , durante 48 h. La estabilidad de las transformantes prototrofas a uridina fue probada por replica en placas de medio mínimo selectivo. Además, se realizó una cepa control transformada únicamente con el vector de selección.

La selección de co-transformantes y producción de la actividad  $\beta$ -xilosidasa se realizó en medio selectivo mínimo (sin uridina) incubando durante 8 d a  $30^\circ\text{C}$ . Se inocularon cultivos líquidos con medio rico en glucosa ( $\text{g l}^{-1}$ ): glucosa, 20, extracto de levadura, 0.5;  $\text{NaNO}_3$ , 7.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.5;  $\text{KCl}$ , 8.67;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8.67; y oligoelementos) con  $2 \times 10^6$  esporas  $\text{ml}^{-1}$  en tubos Falcon de 50 ml. Hasta 20 clonas individuales fueron inoculadas en medio mínimo y se revisaron diariamente para la actividad de xilosidasa por 4 d. Para realizar el ensayo de actividad, se tomaron alícuotas de un ml del medio de cultivo filtrado a través de una membrana de  $0.45 \mu\text{m}$  (Millipore). Las co-transformantes positivas se analizaron mediante la amplificación con PCR utilizando ADN genómico como molde, obtenido por el protocolo de bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) y los cebadores JilF y JilR (Ausubel *et al.*, 1999).

La cuantificación de proteína soluble se determinó de acuerdo a Bradford (1976) usando albúmina sérica bovina como estándar. La actividad de  $\beta$ -xilosidasa se midió por el método de  $p$ -nitrofenol- $\beta$ -D-xilopiranosido como lo describe Pedersen *et al.* (2007). Una unidad de actividad de  $\beta$ -xilosidasa se calculó como la cantidad de enzima que produce el equivalente a una  $\mu\text{mol}$  de  $p$ -nitrofenol por minuto, según lo calculado a partir de una curva estándar.

Se determinó la actividad tanto de endo- $\beta$ -1,4-xilanasas como de celulasas del extracto purificado usando xilano de avena y carboximetil celulosa como sustratos, respectivamente. Se determinó la liberación de azúcares reductores de acuerdo con Miller (1959) utilizando una curva estándar de xilosa y glucosa. Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima que libera un  $\mu\text{mol}$  equivalentes de xilosa o glucosa por minuto, a  $50^\circ\text{C}$ , pH 5.5.

Se determinó el perfil electroforético de los extractos enzimáticos mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) como lo describe Laemli (1970) y las bandas de proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (Ausubel *et al.*, 1999). La actividad de  $\beta$ -xilosidasa se ensayó en el gel después de la electroforesis, cortando y lavando las bandas.

La purificación de la  $\beta$ -xilosidasa recombinante se realizó a partir del caldo rico en glucosa fermentado durante 4 d por un co-transformante de *A. niger*. El fermentado fue filtrado a través de papel Whatman No. 4 y membranas de 0.2  $\mu$ m (Millipore), posteriormente fue concentrado con unidades Centricom (10 kDa, Millipore). La enzima concentrada se aplicó en una columna de DEAE-celulosa, equilibrada y lavada con 50 mM de tampón acetato, pH 3.9 y las proteínas unidas a la matriz se eluyeron utilizando el mismo tampón de lavado adicionado con 1 M de NaCl. Se colectaron fracciones de 1.5 ml las cuales fueron analizadas mediante absorbancia a 280 nm y actividad de  $\beta$ -xilosidasa. Las fracciones que mostraron actividad fueron concentradas utilizando unidades Centricon (10 kDa, Millipore) y estas fueron cargadas en una columna de Nickel (Ni) Sepharose 6 Fast Flow column (1 ml) (GE Healthcare) según el manual del fabricante.

La temperatura óptima de la  $\beta$ -xilosidasa recombinante purificada se determinó midiendo la actividad utilizando alícuotas (65 ng) de enzima purificada e incubando de 30 a 80°C. La energía de activación ( $E_a$ ) de la  $\beta$ -xilosidasa recombinante se calculó en base al comportamiento tipo Arrhenius, representando gráficamente el logaritmo natural de la actividad frente a la temperatura absoluta ( $K^{-1}$ ) en el rango de 30-60°C. La pendiente de esta gráfica indica ( $-E_a R^{-1}$ ), donde R es la constante universal de los gases. El óptimo de pH se determinó midiendo la actividad de alícuotas de la enzima (65 ng) en diferentes tampones: de acetato (50 mM) para valores de pH 3.6 a 5.0, de fosfato (50 mM) para valores de pH 6.0 a 8.0. Los experimentos se llevaron a cabo con tres repeticiones.

La estabilidad a temperatura y pH de la  $\beta$ -xilosidasa recombinante purificada se determinó ensayando la actividad de la enzima luego de incubarla en el rango de 50° a 70°C durante 5, 60 y 120 min, utilizando un baño seco AccuBlock (Labnet) y después de enfriarla a 4°C. La vida media de la enzima recombinante se calculó mediante análisis de regresión lineal de la actividad específica a la temperatura deseada en función del tiempo. El efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima recombinante purificada se estudió

mediante la incubación en tampón 50 mM de acetato (pH 4.0, 5.0), y tampón 50 mM de fosfato (pH 6.0), a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 2 h y 24 h seguido por la determinación de la actividad. Los experimentos se realizaron con tres repeticiones.

El efecto de diferentes iones metálicos y compuestos químicos sobre la  $\beta$ -xilosidasa recombinante purificada fue ensayado mediante la medición de la actividad enzimática en presencia de compuestos individuales como lo describen Kumar y Ramón, 1996; Han y Chen, 2010.

La cepa de hongo nativa de México *A. niger* GS1 fue identificada genéticamente mediante la secuenciación del gen 26S del ARN ribosomal. La secuencia de este gen ha sido ampliamente utilizada para establecer las relaciones filogenéticas y sistemática dentro de los hongos (Linton *et al.*, 2007). Se obtuvo una secuencia parcial de 552 pb la cual fue ingresada a la base de datos del NCBI con número de acceso GU395669. El análisis de esta secuencia obtenida contra las demás reportadas en el NCBI mostró 100% de similitud con la secuencia reportada para *A. niger* An03CBS clon 513.88 (NT\_166520.1). Además, utilizando la colección de nucleótidos se encontró una identidad del 99% de la secuencia parcial de genes 26S ARN de *A. niger* VTCC:F021 (GQ382274.1) y *A. niger* VTCC:CF128 26S (GQ382273.1). Así, tanto con el análisis morfológico que previamente se había realizado (Regalado *et al.*, 2000) y el molecular, se concluye que la cepa aislada fue *Aspergillus niger*.

Se obtuvo una única banda de amplificación a partir de productos de PCR con un tamaño aproximado de 2,433 pb empleando los cebadores JilR y JilF (datos no presentados). El producto de PCR insertado en el vector pGEM-T fueron identificados por secuenciación, donde se presentó el 99% de homología con *A. niger* CBS 513.88 xilosidasa (xlnD) (XM\_0013819379) ARNm parcial. Por lo tanto, nuestra secuencia corresponde a un gen estructural completo que codifica para una  $\beta$ -xilosidasa además de una cola de seis histidinas antes del codón de paro, que fue sometido a la base de datos NCBI obteniendo el número de acceso GU585573.

Nuestros resultados concuerdan con La Grange *et al.* (2001), quien reportó una  $\beta$ -xilosidasa de *A. niger* con un marco de lectura abierto de 2,412 nucleótidos, que codifica una proteína teórica de 804 aminoácidos (85 kDa).

Para evitar la represión catabólica ejercida por la glucosa en la expresión de *xlnD*, se expresó la  $\beta$ -xilosidasa de *A. niger* GS1 en pAN52.1 bajo el control del promotor constitutivo (*gpdA*) y terminador *trpC* ambos de *A. nidulans*. El promotor *gpdA* se ha expresado de manera eficiente en las cepas de *A. niger* (Pachlinger *et al.*, 2005; Kainz *et al.*, 2008). La construcción del vector pANJil incluyó la secuencia del péptido señal propia de *xlnD* (ALA-QA) de acuerdo con Bendtsen *et al.*, (2004). De aproximadamente más de 200 regenerantes Pyr<sup>+</sup> co-transformadas, quince fueron re-sembradas en placas con medio mínimo en dos ocasiones y luego se ensayaron para la actividad de  $\beta$ -xilosidasa en un medio líquido mínimo rico en glucosa (20 g l<sup>-1</sup>). Estas condiciones reprimen la síntesis de *xlnD* en la cepa nativa. Dos cepas (*gpd*-Jil-1, -2) que fueron morfológicamente estables y que mostraron actividad de  $\beta$ -xilosidasa fueron cultivadas para aislamiento de ADN genómico, que fue analizado por PCR utilizando los cebadores JilF y JilR. Una cepa, designada *gpd*-Jil-1, mostró un patrón de amplificación individual de aproximadamente 2,433 pb (Fig. 1) que corresponden a los marcos de lectura abierto reportados para *xlnD* en *A. niger* (AN Z84377). Por otro lado, no se encontró patrón de bandas en la cepa control. De 13 cepas co-transformadas seleccionadas sólo dos mostraron esta secuencia en la amplificación por PCR utilizando los cebadores mencionados. Es posible que la cepa receptora posea una variante de la secuencia del gen *xlnD* como se ha demostrado (Pérez-González *et al.*, 1999). Sin embargo, las secuencias de etiqueta de histidinas más la del sitio *Bam*H1 (29 pb) no son de origen natural y por lo tanto, estas secuencias no serían amplificadas en las condiciones astringentes utilizadas en este trabajo.

La producción de  $\beta$ -xilosidasa recombinante activa en un medio rico en glucosa fue aumentado de forma constante hasta las 24 h, luego mostró un marcado descenso de actividad después de 48 h, y se mantuvo constante hasta el final de la fermentación (96 h, Fig. 2). Este comportamiento puede deberse a la presencia de proteasas (datos no mostrados), lo cual puede correlacionarse con que el contenido de proteína se mantuvo en aumento durante el tiempo de fermentación (Fig. 2). Estos resultados están de acuerdo con el comportamiento reportado para otras  $\beta$ -xylosidasas recombinantes (Pérez-González *et al.*, 1999).

El transformante *A. niger* gpd-Jil-1 produjo una  $\beta$ -xilosidasa recombinante la cual se purificó 31.6 veces a través de la columna de cromatografía de afinidad del níquel con una recuperación de la actividad del 9%. La  $\beta$ -xilosidasa purificada mostró una actividad específica de 2,094 U mg de proteína<sup>-1</sup> a 50°C y pH 4.0, además no mostró actividad de endo- $\beta$ -xilanasas o celulasas. La tinción de SDS-PAGE mostró una banda de proteína con un peso molecular aparente de 90 kDa (Fig. 3), que fue el único que mostró actividad de  $\beta$ -xilosidasa después de ensayar la actividad en cada banda.

El tamaño mostrado por la  $\beta$ -xilosidasa purificada es similar (62 a 122 kDa) a los reportados para otras  $\beta$ -xilosidasas en especies de *Aspergillus* (Wakiyama *et al.*, 2008; Knob *et al.*, 2010). Se ha reportado una amplia gama de actividades de  $\beta$ -xilosidasa purificadas de *Aspergillus* spp. donde la más alta, mostro 55,800 U mg de proteína<sup>-1</sup> (Pedersen *et al.*, 2007) que es 27 veces más activa que la obtenida en este trabajo. Otros autores han reportado actividades menores tales como 360 U mg de proteína<sup>-1</sup> (Lenartovicz *et al.*, 2003) para una xilosidasa aislada de un hongo termotolerante *A. fumigatus*. Por otra parte, una xilosidasa de *A. japonicus* mostró 112 U mg de proteína<sup>-1</sup> (Wakiyama *et al.*, 2008). Mientras que su homólogo recombinante mostró sólo un 18.7 U mg de proteína<sup>-1</sup> la cual es 112 veces menor que la actividad de nuestra  $\beta$ -xilosidasa recombinante.

La temperatura de máxima actividad de la  $\beta$ -xilosidasa recombinante fue de 70°C, mientras que a 50° y 60°C la enzima exhibió un 57.5% y 93.6% de la actividad máxima, respectivamente (Fig. 4.). Estos resultados concuerdan con los reportados previamente por Pedersen *et al.*, 2007 y Selig *et al.*, 2008, indicando la estabilidad térmica natural de *A. niger* XlnD. Se hace evidente entonces que el sistema de expresión utilizado en este trabajo tuvo éxito en mantener la estabilidad térmica de la proteína.

Los estudios de termoestabilidad mostraron que la enzima purificada se mantuvo estable a 50°C durante 2 h, mientras que una relativamente larga vida media (74 min) se observó a 70°C. Después de la incubación a 80°C durante 10 min, la xilosidasa purificada mostró una actividad ligeramente inferior a la de la enzima incubada a 50°C en el mismo lapso de tiempo (Fig. 4). Esta propiedad puede ser útil en aplicaciones donde se requieren de altas temperaturas por un tiempo corto, como en los procesos de extrusión.

La temperatura óptima encontrada para nuestra enzima concuerda con la de una  $\beta$ -xilosidasa purificada de *A. phoenicis* que fue de 75°C (Rizzatti *et al.*, 2001). Sin embargo, la estabilidad térmica fue menor que la mostrada por nuestra enzima recombinante, ya que la actividad residual después de 1 h a 65°, 70° y 75°C disminuyó significativamente (inferior al 30%, 25% y 0%, respectivamente). Por otra parte, una  $\beta$ -xilosidasa recombinante de *A. niger* mostró el 80% de actividad residual después de su incubación a 55°C durante 2 h. Por el contrario, la estabilidad térmica fue menor que la que nosotros reportamos porque el 60% de reducción de actividad se encontró mediante la incubación a 60°C durante 20 min, y después de 2 h la actividad se redujo a menos del 10% (La Grange *et al.*, 2001). Sólo unas pocas  $\beta$ -xilosidasas de *A. niger* se reportan activas y estables a altas temperaturas (Pedersen *et al.*, 2007; Selig *et al.*, 2008). Mientras que para *A. phoenicis* si se reportan resultados similares, 100% de actividad después de 4 h a 60°C (Polizeli *et al.*, 2005).

Se calculó la energía de activación de 58.9 kJ mol<sup>-1</sup> siguiendo un comportamiento de tipo Arrhenius, con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.97. Este valor fue similar a la reportada para un  $\beta$ -xilosidasa de *Thermoanaerobacter ethanolicus* que fue de 69 kJ mol<sup>-1</sup> (Shao y Wiegel, 1992).

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la  $\beta$ -xilosidasa usando los paquetes computacionales OGPET v. 1.0 y YinOYang v. 1.2, mostró 14 sitios potenciales de glicosilación. De igual manera, la fracción de hidratos de carbono de una  $\beta$ -xilosidasa de *Aspergillus* spp. se ha estimado entre 10 y 47%, lo cual promueve una mayor estabilidad de la enzima en condiciones de desnaturalización sin afectar la actividad catalítica (Knob *et al.*, 2010).

El pH de máxima actividad de la  $\beta$ -xilosidasa recombinante purificada fue de alrededor de 3.6 (Fig. 6). Presento una disminución de la actividad a valores de pH 4.0, 5.0 y 6.0 de hasta el 85.6%, 74.9% y 44.4%, respectivamente. Esto contrastó con los resultados reportados para la  $\beta$ -xilosidasa de *A. niger* IBT-3250, donde la actividad fue similar en el rango de 3.0 a 5.0 (Pedersen *et al.*, 2007). El valor de pH óptimo fue similar al reportado para una  $\beta$ -xilosidasa de *A. pulverulentus* (2.5-3.5), lo que representó una característica

versátil en estas cepas comparadas con la mayoría de las especies de *Aspergillus* que comúnmente producen  $\beta$ -xilosidasas con un pH óptimo entre 4.0 y 6.0 (de Vries y Visser, 2001). La máxima actividad de la  $\beta$ -xilosidasa recombinante fue de 4,280 U mg de proteína<sup>-1</sup> utilizando tanto el pH (3.6) como temperatura (70°C) óptimo.

Los resultados de la estabilidad al pH de la  $\beta$ -xilosidasa purificada indican que se mantuvo estable después de 2 h de incubación en valores de pH de 4.0 y 5.0 (Fig. 7). Sin embargo, la actividad disminuyó ligeramente a un pH de 6.0 (el 58.4% de su actividad inicial). Después de incubar durante 24 h la enzima recombinante a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ , la menor actividad relativa era de 52.1% a pH 6.0 (Fig. 7). Por otra parte, una  $\beta$ -xilosidasa de *A. phoenicis* se mantuvo estable durante el intervalo de pH 4.0-6.0 durante 7 h a temperatura ambiente (Rizzatti *et al.*, 2001). Además, cuando se incubó a temperatura ambiente durante 3 h una  $\beta$ -xilosidasa recombinante de *A. japonicus* conservó más del 90% de su actividad original a pH entre 2.0 y 7.0 (Wakiyama *et al.*, 2008).

El efecto de diversos iones metálicos y otros reactivos sobre la actividad de la  $\beta$ -xilosidasa purificada se muestran en la Tabla 1. La actividad fue drásticamente inhibida (58.5% y 72.5% de la actividad residual) por  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Li}^+$ . Una ligera inhibición (alrededor del 83%) se observó en presencia de EDTA, SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol, mientras que la actividad residual en presencia de DTT fue del 91.3%. Unas  $\beta$ -xilosidasas de *E. nidulans* y *A. nidulans* mostraron cierta estabilidad con SDS, pero de alta sensibilidad al  $\text{Cu}^{2+}$  (Kumar y Ramón, 1996). Estos autores también reportaron un efecto estimulante sobre la actividad residual cuando se agregó EDTA, DTT y  $\text{Zn}^{2+}$ , lo que contrasta con el comportamiento aquí observado. Un efecto similar a lo reportado en nuestra investigación fue reportado por Rizzatti *et al.* (2001) utilizando una  $\beta$ -xilosidasa purificada de *A. phoenicis* en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , EDTA y  $\beta$ -mercaptoetanol, además observaron un efecto opuesto en la actividad cuando se añadió  $\text{Zn}^{2+}$ .

La retención de la actividad de  $\beta$ -xilosidasa (por encima del 83%) en presencia de agentes reductores, detergentes y algunas sales como el DTT,  $\beta$ -mercaptoetanol, SDS, EDTA y  $\text{Zn}^+$  muestran otra característica notable de esta enzima, lo que representa una ventaja en aplicaciones industriales donde la presencia de estos compuestos es inevitable.

En este trabajo se obtuvo con éxito una xilosidasa libre de hemicelulasas mediante el crecimiento de *A. niger* gpd-Jil-1 utilizando una única fuente de carbono. La  $\beta$ -xilosidasa recombinante producida por *A. niger* gpd-Jil-1 mostró una actividad significativa a temperaturas altas, medio ácido y en presencia de agentes reductores, y por lo tanto es probable que tenga un buen potencial en la alimentación animal, la síntesis enzimática, y la industria de los jugos de fruta.



# Homologue expression of a $\beta$ -xylosidase from native *Aspergillus niger*

A. Amaro-Reyes · B. E. García-Almendárez · D. G. Vázquez-Mandujano ·  
S. Amaya-Llano · E. Castaño-Tostado · R. G. Guevara-González ·  
O. Loera · C. Regalado

Received: 26 July 2010 / Accepted: 11 November 2010  
© Society for Industrial Microbiology 2010

**Abstract** Xylan constitutes the second most abundant source of renewable organic carbon on earth and is located in the cell walls of hardwood and softwood plants in the form of hemicellulose. Based on its availability, there is a growing interest in production of xylanolytic enzymes for industrial applications.  $\beta$ -1,4-xylan xylosidase (EC 3.2.1.37) hydrolyses from the nonreducing end of xylooligosaccharides arising from endo-1,4- $\beta$ -xylanase activity. This work reports the partial characterization of a purified  $\beta$ -xylosidase from the native strain *Aspergillus niger* GS1 expressed by means of a fungal system. A gene encoding  $\beta$ -xylosidase, *xlnD*, was successfully cloned from a native *A. niger* GS1 strain. The recombinant enzyme was expressed in *A. niger* AB4.1 under control of *A. nidulans* *gpdA* promoter and *trpC* terminator.  $\beta$ -xylosidase was purified by affinity chromatography, with an apparent molecular weight of 90 kDa, and showed a maximum activity of 4,280 U mg protein<sup>-1</sup> at 70°C, pH 3.6. Half-life was 74 min at 70°C, activation energy was 58.9 kJ mol<sup>-1</sup>,

and at 50°C optimum stability was shown at pH 4.0–5.0.  $\beta$ -xylosidase kept residual activity >83% in the presence of dithiothreitol (DTT),  $\beta$ -mercaptoethanol, sodium dodecyl sulfate (SDS), ethylenediaminetetraacetate (EDTA), and Zn<sup>2+</sup>. Production of a hemicellulolytic free xylosidase showed some advantages in applications, such as animal feed, enzymatic synthesis, and the fruit-juice industry where the presence of certain compounds, high temperatures, and acid media is unavoidable in the juice-making process.

**Keywords** *Aspergillus niger* GS1 ·  $\beta$ -xylosidase activity · Thermostability · Homologue expression

## Introduction

Xylan constitutes the second most abundant source of renewable organic carbon on earth and is located in the cell walls of hardwood and softwood plants in the form of hemicellulose [28]. Endo- $\beta$ -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8) and  $\beta$ -1,4-xylan xylosidase (EC 3.2.1.37) are key enzymes that hydrolyze xylan into xylooligosaccharides [4, 27].  $\beta$ -xylosidase hydrolyses the terminal xylose unit from the nonreducing end of the xylooligosaccharides arising from endo-1,4- $\beta$ -xylanase activity [22]. This is important, as  $\beta$ -xylosidase may relieve the end-product inhibition of endoxylanases and is also effective in transglycosylation reactions in which monosaccharide units or alcohols are attached to or cleaved from xylose units [9]. There is a growing interest in developing high-yield and low-cost production of xylanolytic enzymes for industrial applications, such as bioconversion of agroindustrial residues to biofuels, low-calorie sweeteners, and pharmacological products [20]. The worldwide market of these enzymes is

A. Amaro-Reyes · B. E. García-Almendárez ·  
D. G. Vázquez-Mandujano · S. Amaya-Llano ·  
E. Castaño-Tostado · C. Regalado (✉)  
DIPA, PROPAC. Facultad de Química, Universidad Autónoma  
de Querétaro, C.U. Cerro de las Campanas s/n. Col. Las  
Campanas, 76010 Qro. Querétaro, Mexico  
e-mail: carlosr@uaq.mx; regcarlos@gmail.com

R. G. Guevara-González  
C.A Ingeniería de Biosistemas, Facultad de Ingeniería,  
Universidad Autónoma de Querétaro, C.U. Cerro de las  
Campanas s/n. Col. Las Campanas,  
76010 Qro. Querétaro, Mexico

O. Loera  
Dpto. de Biotecnología, Universidad Autónoma  
Metropolitana-Iztapalapa, 09340 Mexico, DF, Mexico

around 200 million US dollars per annum [14]. Therefore, the search for strains with the generally recognized as safe (GRAS) status that will grow in low-cost substrates that will optimize xylanolytic enzyme production represents an ultimate goal in this field of research. Filamentous fungi are more attractive than bacteria as potential producers of these enzymes because fungi secrete higher enzyme levels into the culture medium [16]. *Aspergillus niger* is a saprophytic fungus well known for its production and secretion of a variety of hydrolytic enzymes, contributing to its ability to degrade plant polysaccharides such as cellulose, hemicellulose, pectin, starch, and inulin [31]. Several studies have reported a variety of hemicellulolytic enzymes induced with various hemicellulosic residues (corn cob, sugar-cane bagasse, wheat bran, wheat straw, and rice straw) as the main carbon source using *Aspergillus* species [12, 18]. Nevertheless, some industrial applications require xylanases and xylosidases free of cellulase, among other hemicellulolytic activities, and enzymatic stability is also required over a broad range of temperatures and pH values [20].

A strain of *Aspergillus* was isolated from Mexican copra paste that produces a variety of cell-wall-degrading enzymes using different substrates upon solid-state fermentation [23]. Molecular identification of this novel and potentially useful *Aspergillus* strain and its xylanolytic genes have not yet been reported. Natural inducers of xylanolytic genes in *Aspergillus* may be products of xylan degradation or transglycosylation processes, such as D-xylose, xylobiose, xylotriose, and xylotetrose [27]. However, in the presence of readily metabolizable carbon sources such as D-glucose, gene expression involved in the use of less-favored carbon sources, such as the xylanolytic system, is inhibited due to carbon catabolite repression [21]. We describe the design of a system capable of producing  $\beta$ -xylosidase even in presence of its repressor. The purpose of our study was to constitutively express and partially characterize a  $\beta$ -xylosidase from the native strain *A. niger* GS1 by means of a fungal system.

## Materials and methods

### Materials

All chemicals were of analytical grade and were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), except as indicated.

### Microorganisms and plasmid

*Aspergillus niger* GS1 (NCBI No. GU395669) was used as a source of xylosidase gene (UAQ, Queretaro, Mexico). Spores isolated from *A. niger* GS1 were stored in Tween 20

on silica gel at 4°C. Stock cultures were subcultured on fresh sterile potato dextrose agar (PDA; Bioxon, Cuautitlán, Mexico) plates and incubated for 72–120 h at 30°C [23]. *Escherichia coli* JM109 genotype recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-mK+), relA1, supE44,  $\Delta$ (lac-proAB) [F', traD36, proAB, lacIqZ $\Delta$ M15] (Promega, Madison, WI, USA) was used to propagate vectors and was cultured at 37°C in Luria–Bertani medium comprising (g l<sup>-1</sup>): bacto-tryptone (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA), 10; yeast extract (Difco), 5; sodium chloride (NaCl), 10; supplemented with 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> ampicillin. The pGEM-T plasmid (Promega) was used as the subcloning vector, and *A. niger* AB4.1 (*pyrG*<sup>-</sup>) strain [29] was used for homologous expression of xylosidase (*xlnD*) gene. Vector pAN52.1 was used to construct the constitutive expression vector pANJil. This vector contains the *gpdA* promoter and the terminator region of the *trpC* gene (both from *A. nidulans*) separated by *Bam*HI and *Nco*I sites. Vector pAB4.1 (*pyrG*) [29] was used as selection marker. Both vectors were kindly provided by Dr. Punt (TNO, The Netherlands).

### Induction of $\beta$ -xylosidase

*Aspergillus niger* GS1 spores were inoculated into PDA-xylan slants (glucose 15 g l<sup>-1</sup>, oat spelts xylan 5 g l<sup>-1</sup>, agar-agar (Bioxon) 15 g l<sup>-1</sup>, and potato infusion 0.5 l), pH 5.5–6.0, incubated at 30°C, for 72 h. Harvested spores were then transferred to PDA-xylan slants increasing by 5 g l<sup>-1</sup> the initial xylan concentration while decreasing initial glucose concentration by 5 g l<sup>-1</sup> until complete replacement with xylan as main carbon source (g l<sup>-1</sup>) (agar-agar, 15; oat spelts xylan, 20; and potato infusion, 0.5 l) was attained. Spores collected from the potato xylan agar were seeded in basal xylan media supplemented with yeast extract (oat spelts xylan 25 g l<sup>-1</sup>, yeast extract 5 g l<sup>-1</sup>). After incubation for 2–3 days, mycelia were collected for RNA extraction using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hamburg, Germany).

### Molecular identification of *A. niger* GS1, and *xlnD* gene

*Aspergillus niger* GS1 was genetically identified by sequencing the 26S ribosomal DNA (rDNA) (GBC-IPN, México). Collected mycelia from basal xylan media was employed for RNA extraction. Forward (JilF 5'-CCATG GATGGCGCACTCAATGTCTCG-3'), and reverse (JilR 5'-CTGGATCCCTAGTGGTGATGGTGATGATGCTCT TCCCCGGCCAC-3') primers were designed using the National Center for Biotechnical Information (NCBI)-reported sequence (ANXM\_001389379) for *A. niger*  $\beta$ -1,4-xylan xylosidase. Bases coding for His-tag are shown in italics.

The RevertAidH Minus kit (Fermentas, Ontario, Canada) was used to obtain xylosidase complementary DNA (cDNA) from total RNA (tRNA) (2 µg) following the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of *A. niger* GS1 cDNA (100 ng) was conducted using 400 mM primers; 10 mM deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), 1.5 mM magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>), 1× reaction buffer [200 mM Tris pH 8.4, 500 mM calcium chloride (KCl)] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 2 U recombinant *Taq* polymerase (Invitrogen) in a final volume of 50 µl. Reaction conditions were 5 min at 94°C, followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 65°C, 2.5 min at 72°C, and a final extension of 10 min at 72°C. The amplicon was ligated into pGEM-T vector, followed by heat-shock cloning into *E. coli* JM109. Clones containing the insert were directly identified by blue/white color screening on indicator plates, and then from Miniprep (Qiagen) extraction, the isolated plasmid was sent for sequencing (MCLab, San Francisco, CA, USA). After sequence confirmation, the DNA open-reading frame was cloned into the expression vector pAN52.1 (cloning sites *Nco*I and *Bam*HI) to obtain pANJil expression vector.

#### *Aspergillus* transformation

Fungal cotransformation was accomplished using the procedure reported by Sanchez and Aguirre [25] developed for *A. nidulans*, with modifications. Spores from *A. niger* AB4.1 were washed with 10 ml sterile distilled water, and an inoculum of  $8.6 \times 10^6$  spores ml<sup>-1</sup> was added to 50 ml of dextrose potato broth (Difco) supplemented with uridine (2.5 g l<sup>-1</sup>), followed by incubation at 30°C in a rotary shaker (300 rpm) for 15 h. Next, germinating spores (GTS) were recovered by centrifugation at 4,000×*g* for 10 min at 4°C (Eppendorf, Mod. 5804R, Hamburg, Germany). GTS were resuspended in 50 ml of ice-cold sterile water, centrifuged again, resuspended in 25 ml of ice-cold pretreatment buffer [1% yeast extract, 1% glucose; YED] plus 20 mM hydroxyethyl-1-piperazine ethanesulfonic acid (HEPES) (adjusted to pH 8.0 with 100 mM Tris), and incubated for 1 h at 30°C in a rotary shaker at 100 rpm. After this incubation, GTS were centrifuged and resuspended in 1 ml (about  $2.2 \times 10^7$  spores ml<sup>-1</sup>, final) of ice-cold electroporation buffer [10 mM Tris-HCl(pH 7.3), 270 mM sucrose, 1 mM HEPES, 10 mM rubidium chloride (RbCl), 10 mM lithium chloride (LiCl)], kept on ice, and stored at -70°C. For electroporation, 2 µg of total DNA (tDNA) (pANJil expression vector with pAB4.1 vector in a 10:1 volume ratio) was added to 50 µl of ice-cold GTS suspension. The mixture was then incubated on ice for 15 min and transferred to a 0.2-cm cuvette. Electroporation was performed using a MicroPulser Electroporation Apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), adjusting voltage to

1.4 kV and pulses lasting approximately 3.5 ms. After electroporation, 600 µl of ice-cold YED was added to the cuvette and the cell suspension transferred to a sterile 1.5-ml tube, kept on ice for 10 min, and incubated at 30°C for 90 min in a rotary shaker at 100 rpm. Electroporated spores (100 µl plate<sup>-1</sup>) were extended on sorbitol-containing minimal agar (g l<sup>-1</sup>): glucose, 10; sorbitol, 218.64; sodium nitrate (NaNO<sub>3</sub>), 6; KCl, 0.52, potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 1.52; trace elements: zinc sulfite (ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O), 0.022; boric acid (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), 0.011; manganese (II) chloride (MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O), 0.005; ferrous sulfate (FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O), 0.005; cobalt(II) chloride (CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O), 0.0017; copper(II) sulfate (CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O), 0.0016; sodium molybdate (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O), 0.0015; sodium ethylenediaminetetraacetate (Na<sub>2</sub>EDTA) 0.05; without uridine. Spores were incubated at 30°C, for 48 h. The stability of uridine prototroph transformants was tested by velvet-replica plating on selective minimal medium. In addition, a control was transformed with the *pyrG* gene but without expression vector.

#### Screening and production of β-xylosidase activity

Cotransformants were plated on the selective minimal medium (without uridine) and incubated for 8 days at 30°C. Liquid cultures were inoculated in glucose-rich medium (g l<sup>-1</sup>): glucose, 20; yeast extract, 0.5; NaNO<sub>3</sub>, 7.5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.5; KCl, 8.67; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 8.67; and trace elements) with  $2 \times 10^6$  spores ml<sup>-1</sup> in 50-ml Falcon tubes. To screen cotransformants, up to 20 individual clones were inoculated into minimal medium and checked daily for xylosidase activity for 4 days. For the activity assay, a 1-ml aliquot of culture medium was collected, and cells were removed by filtration through a 0.45-µm filter (Millipore, Billerica, MA, USA). Positive cotransformants were assayed through JilF-JilR amplification using genomic DNA as template, obtained by the cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) protocol [1].

#### Analytical methods

##### *Protein and β-xylosidase activity*

Soluble protein content was determined according to Bradford [2] using bovine serum albumin (BSA) as standard. Xylosidase activity was measured by the *p*-nitrophenol method, as described by Pedersen et al. [18], using 2.5 mM *p*-nitrophenol-β-D-xylopyranoside (PNPX) in 50 mM acetate buffer and 100 µl of enzyme solution at pH 4.0 in a total reaction volume of 1 ml. After incubation at 50°C for 10 min, the reaction was stopped by adding 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA) to a final concentration of 0.33 mM, and the released *p*-nitrophenol

was measured spectrophotometrically at 400 nm. One unit of  $\beta$ -xylosidase activity was calculated as the amount of enzyme producing 1  $\mu$ mol equivalent of *p*-nitrophenol per min, as calculated from a standard curve. Endo- $\beta$ -1,4-xylanase and cellulase activities of the purified extract was determined using 5 g l<sup>-1</sup> xylan and carboxymethyl cellulose as substrates, respectively, dissolved in 50 mM acetate buffer, pH 5.5. The reaction mixture consisted of 100  $\mu$ l of enzyme solution, 400  $\mu$ l of the corresponding substrate, and incubated at 50°C for 10 min, followed by immersion in ice-cold water. Released reducing sugars were quantified according to Miller [15] using a xylose and a glucose standard curve (1–10 mM). One activity unit (U) was defined as the amount of enzyme that released 1  $\mu$ mol of xylose or glucose equivalents per minute at 50°C.

#### *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)*

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out using a 10% (w/v) T (% acrylamide plus bis-acrylamide in gelling solution) according to Laemmli [11], and protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 [1].  $\beta$ -xylosidase activity was detected in the gel after electrophoresis by cutting bands. Each band was washed three times with high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade water, placed in a microtube containing 200  $\mu$ l substrate solution (PNPX), and incubated for 30 min at 50°C. The reaction was stopped by adding 150  $\mu$ l of 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution, and absorbance was measured at 400 nm.

#### Purification of the recombinant $\beta$ -xylosidase

To purify the recombinant  $\beta$ -xylosidase, cotransformed *A. niger* was cultivated in glucose-rich medium. Then, 600 ml of a 4-day-old culture medium was filtered through Whatman No. 4 (Whatman International, Maidstone, UK) and 0.2  $\mu$ m membrane (Millipore) and concentrated using a Centricon centrifugal filter unit with molecular mass cutoff membrane of 10 kDa (Millipore). Concentrated enzyme (2.0 ml) was applied into a diethylaminoethanol (DEAE)-cellulose column (1.5  $\times$  25 cm), equilibrated, and washed with 50 mM acetate buffer, pH 3.9, at a flow rate of 25 ml h<sup>-1</sup>. Bound proteins were eluted using the same washing buffer plus 1 M NaCl. Fractions of 1.5 ml were collected and assayed for absorbance at 280 nm and  $\beta$ -xylosidase activity, and those showing high activity were pooled and concentrated using the Centricon units (10 kDa). Concentrated fractions were then loaded onto a Nickel (Ni) Sepharose 6 Fast Flow column (1 ml) (GE Healthcare Bio-sciences, Uppsala, Sweden) following the manufacturer's manual.

#### Effect of temperature and pH on purified recombinant $\beta$ -xylosidase activity

To determine optimal temperature of purified recombinant  $\beta$ -xylosidase, activity determinations were conducted using 65-ng aliquots of purified enzyme and incubating at 30–80°C. Activation energy (*E<sub>a</sub>*) of recombinant  $\beta$ -xylosidase was calculated following an Arrhenius-type behavior by plotting ln (activity) vs (absolute temperature, K)<sup>-1</sup>, in the range of 30° to 60°C. The slope of this plot indicates ( $-E_a R^{-1}$ ), where *R* is the universal gas constant. Optimal pH was determined using same protein aliquots of the enzyme in same total reaction volume, and activity was measured using acetate buffer (50 mM) for pH values 3.6–5.0; 50 mM phosphate buffer was used for pH values 6.0–8.0. Experiments were conducted for three replicates.

#### Temperature and pH stability of the purified recombinant $\beta$ -xylosidase

Aliquots (65 ng) of purified recombinant  $\beta$ -xylosidase were preincubated in the range of 50° to 70°C for 5, 60, and 120 min using an AccuBlock dry bath (Labnet, Edison, NJ, USA). After cooling at 4°C, xylosidase activity was assayed. The recombinant enzyme half-life was calculated by linear regression analysis of specific activity at desired temperature against time. The effect of pH on the purified recombinant enzyme stability was studied by incubating in 50 mM acetate buffer (pH 4.0, 5.0) and 50 mM phosphate buffer (pH 6.0), at 10  $\pm$  2°C for 2 and 24 h, followed by activity determination. Experiments were conducted for three replicates.

#### Effect of metal ions and chemical reagents on recombinant $\beta$ -xylosidase activity

The effects of several metal ion salts and chemicals on the recombinant purified  $\beta$ -xylosidase were tested by measuring enzyme activity in the presence of individual compounds at a final concentration of 10 mM. These chemicals have been shown to affect xylanolytic activity [6, 8], and those used were CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, LiCl, ZnCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>EDTA, SDS, dithiothreitol (DTT), and  $\beta$ -mercaptoethanol. After preincubating for 10 min at room temperature (26  $\pm$  2°C), the residual enzyme activities were expressed as the percentage of enzyme activity without added chemical.

## Results and discussion

### Molecular identification of *A. niger* GS1 and *xlnD* gene

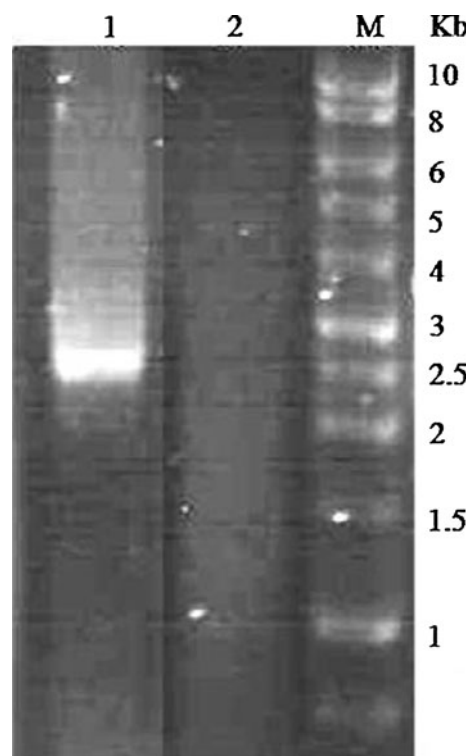
*Aspergillus niger* GS1 was isolated from copra paste. A pure culture was obtained by single streaking on PDA and



morphologically identified by microscopic visualization of its reproductive structures and main characteristics [23]. This native Mexican fungal strain was genetically identified by sequencing the 26S rRNA gene. Sequence of this gene has been extensively used to establish phylogenetic and systematic relationships within fungi [13]. A partial sequence of 552 bp was obtained and submitted to the NCBI database, with accession No. GU395669. Blast analysis against NCBI genome database showed 100% similarity with *A. niger* CBS 513.88 clone An03 (NT\_166520.1). In addition, using the nucleotide collection, a 99% identity was found for partial sequence of 26S RNA genes of *A. niger* VTCC:F021 (GQ382274.1), and *A. niger* VTCC:CF128 26 S (GQ382273.1). Thus, from both morphological and molecular analysis, we conclude that the isolated strain was *A. niger*. A single amplification band was obtained from PCR products with an approximate size of 2,433 bp when primers JilR and JilF were used (data not shown). PCR product was inserted into pGEM-T vector, and positive clones identified by sequencing showed up to 99% homology with *A. niger* CBS 513.88 xylosidase (*xlnD*) (XM\_0013819379) partial messenger RNA (mRNA). Our sequence corresponded to a complete structural gene coding for  $\beta$ -xylosidase, plus a six histidine tag before the stop codon, which was submitted to NCBI database, obtaining accession number GU585573. In addition, our findings are in agreement with La Grange et al. [10], who reported that  $\beta$ -xylosidase in *A. niger* is coded by *xlnD*, containing an open reading frame of 2,412 nucleotides, which encodes a theoretical protein of 804 amino acids (85 kDa).

#### Expression of $\beta$ -xylosidase gene from the *gpdA* promoter

To avoid catabolic repression exerted by glucose over *xlnD* expression, we expressed the  $\beta$ -xylosidase from *A. niger* GS1 into pAN52-1 under the control of the strong constitutive *A. nidulans* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpdA*) promoter and *trpC* terminator. The *gpdA* promoter is expressed efficiently in *A. niger* strains [7, 17]. The construction of pANJil included a DNA sequence encoding the first 26 amino acids of the *xlnD* signal peptide (ALA-QA), according to Bendtsen et al. [3]. The pANJil was introduced into *A. niger* AB4.1 strain by cotransformation with the plasmid pAB4.1, which contains the *A. nidulans pyrG* gene encoding orotidine 5'-phosphate carboxylase. Preliminary analysis of Pyr<sup>+</sup> regenerants from these cotransformations identified up to 200 transformants. From those transformants, 15 were streaked twice on minimal plates and then screened for  $\beta$ -xylosidase activity on minimal liquid media under glucose-rich conditions (20 g l<sup>-1</sup>) that repress *xlnD* synthesis in the wild-type

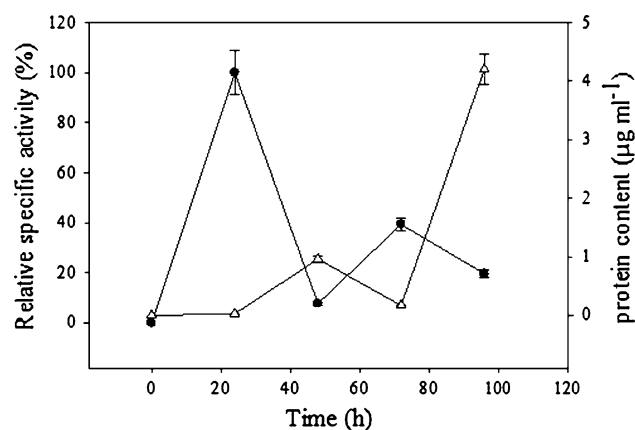


**Fig. 1** Agarose gel (1% w/v) visualization of polymerase chain reaction (PCR) products amplified with JilF and JilR primers using cotransformed genomic DNA of *Aspergillus niger* *gpd*-Jil-1 as template. Lanes: M, 1 kb DNA ladder (Promega); 1 amplicon from *gpd*-Jil-1 using primers Jil-F and Jil-R; 2 PCR from single transformant using primers Jil-F and Jil-R

strain. Two strains (*gpd*-Jil-1, -2) that were morphologically stable showed  $\beta$ -xylosidase activity and were cultured for genomic DNA isolation, which was analyzed by PCR using JilF and JilR primers. One strain, designated *gpd*-Jil-1, showed a single-band amplification pattern of about 2,433 bp (Fig. 1), corresponding to the reported *xlnD* open-reading frame in *A. niger* (AN Z84377); on the other hand, no band pattern was found in the control strain (pAB4.1 single transformant). From 13 selected possibly cotransformed strains, only two showed this sequence upon PCR amplification using the above-mentioned primers. Thus, it is possible that the recipient strain had a sequence variant for this gene, as previously shown [19]. However, added His-tag plus *Bam*H1 site sequence (29 bp) is not naturally occurring and therefore would not be amplified under the stringent conditions used in this study unless there were fully cotransformed cells.

#### Purification of the recombinant $\beta$ -xylosidase

Preliminary experiments showed that *A. niger* GS1 produced a complex of hemicellulolytic enzymes (mannanase, cellulose, xylosidase) after solid-state fermentation. These

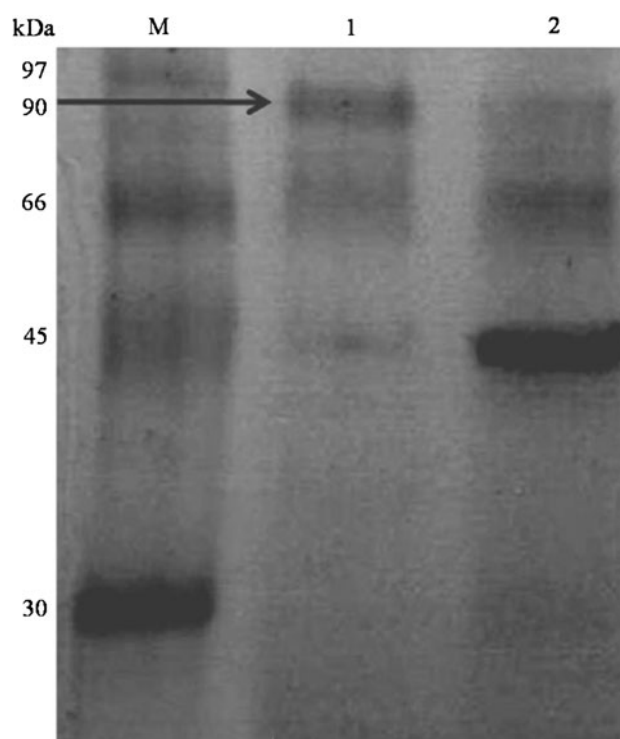


**Fig. 2** Relative (i.e., ratio of actual to maximum)  $\beta$ -xylosidase specific activity (filled circles) and protein concentration (open triangles) in fermentation broth by growing *Aspergillus niger* gpd-Jil-1 in glucose-rich medium. Each data point represents the mean of three independent experiments  $\pm$  standard deviation

results indicate that hemicellulolytic enzyme expression is subject to induction and carbon catabolic repression, according to substrate composition used for fermentation (data not shown). Therefore, the choice of an appropriate system to constitutively provide hemicellulolytic free  $\beta$ -xylosidase activity without being affected by catabolic repression is of importance for processes such as modified xylooligosaccharides production. Growth of our cotransformed strain in glucose-rich medium produced steadily increased  $\beta$ -xylosidase activity up to 24 h but showed a strong decrease after 48 h and remained constant up to the end of fermentation time (96 h) (Fig. 2). This behavior may be due to the presence of proteases (data not shown), despite the fact that protein content kept increasing during fermentation (Fig. 2). Furthermore, small  $\beta$ -xylosidase activity that might be associated with the cell wall was found from acetate buffer (50 mM, pH 3.6) extracts of crushed mycelia (832 U mg protein<sup>-1</sup>). Enzyme activity was not detected in any of the PyrG<sup>+</sup> transformants. This is in agreement with the behavior reported for other recombinant  $\beta$ -xylosidases [19].

The transformant *A. niger* gpd-Jil-1 produced one recombinant  $\beta$ -xylosidase, and from culture supernatant it was purified 31.6-fold through the Ni-affinity chromatography column, with 9% activity recovery. Purified  $\beta$ -xylosidase showed a specific activity of 2,094 U mg protein<sup>-1</sup> at 50°C and pH 4, and showed no endo- $\beta$ -xylanase or cellulase activities when tested with xylan or carboxy-methylcellulose (CMC) as substrates, respectively. SDS-PAGE showed a protein band with an apparent molecular weight of 90 kDa (Fig. 3), which was the only one showing  $\beta$ -xylosidase activity after testing each band.

The purified  $\beta$ -xylosidase showed a size similar to those reported for other *Aspergillus* spp. (62–122 kDa) [9, 30]. A

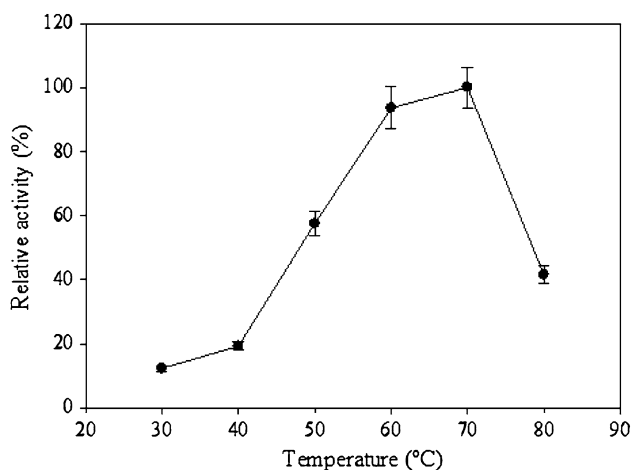


**Fig. 3** Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of purified  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus niger* gpd-Jil-1. Lanes: M, molecular weight markers: rabbit muscle phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), chicken egg white ovalbumin (45 kDa), bovine erythrocyte carbonic anhydrase (30 kDa) (GE Healthcare); 1 purified recombinant  $\beta$ -xylosidase; 2 culture supernatant proteins

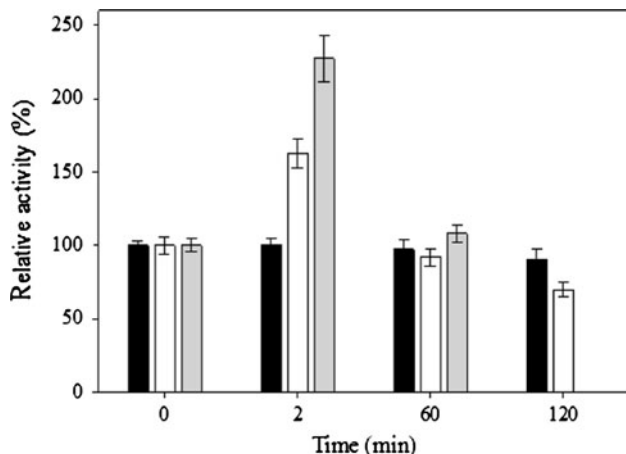
wide range of purified  $\beta$ -xylosidase activity have been reported for *Aspergillus* spp., with the highest, isolated from tannins, showed 55,800 U mg protein<sup>-1</sup> [18], which is 27 times more active than that obtained in this study (assay as depicted in section “Protein and  $\beta$ -xylosidase activity”). Other authors have reported lower activities, such as 360 U mg protein<sup>-1</sup> [12], for a xylosidase isolated from a thermotolerant *A. fumigatus*. On the other hand, a xylosidase from *A. japonicus* showed 112 U mg protein<sup>-1</sup> [30], whereas its recombinant counterpart showed only 18.7 U mg protein<sup>-1</sup>, which is 112 times lower than the activity found in our study.

#### Effect of temperature on activity and stability of recombinant $\beta$ -xylosidase

The temperature for maximum activity of the recombinant  $\beta$ -xylosidase was 70°C, whereas at 50° and 60°C, the enzyme exhibited 57.5% and 93.6% of maximum activity, respectively (Fig. 4). These results are in agreement with those previously reported, indicating the thermally stable nature of *A. niger* XlnD [18, 26]. It was evident that the



**Fig. 4** Effect of temperature on activity of recombinant  $\beta$ -xylosidase. The ordinate represents relative activity that is the ratio of the activity to the activity found at optimal temperature (70°C, 3,272 U mg protein<sup>-1</sup>) expressed as percentage. Each data point represents the mean of three independent experiments  $\pm$  standard deviation



**Fig. 5** Thermostability of recombinant  $\beta$ -xylosidase at 50°C (filled square), 60°C (open square), and 70°C (gray shaded square). The ordinate represents relative activity that is the ratio of the activity to the initial activity (1,883 U mg protein<sup>-1</sup>) expressed as percentage. Each data point represents the mean of three independent experiments  $\pm$  standard deviation

expression system used in this work was successful in retaining protein thermal stability.

Thermostability studies showed that the purified enzyme was stable at 50°C for 2 h, whereas a relatively long enzyme half-life (74 min) was observed at 70°C (Fig. 5). After incubation at 80°C for 10 min, purified xylosidase showed activity slightly lower than that of the enzyme heated at 50°C for same time (Fig. 4). This property may be useful in applications where high temperatures are required for short time, e.g., extrusion processes.

Optimal temperature of a purified  $\beta$ -xylosidase from *A. phoenicis* was 75°C [24], in agreement with our results.

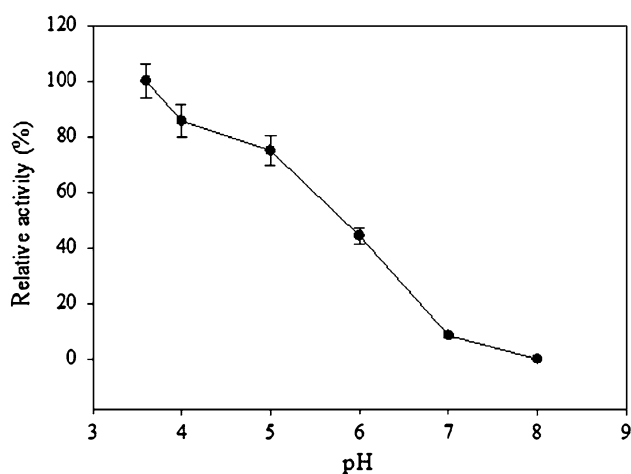
However, thermal stability was smaller than that shown by our recombinant enzyme because residual activity after 1 h at 65°, 70°, and 75°C significantly decreased (<30%, 25%, and 0%, respectively). On the other hand, recombinant  $\beta$ -xylosidase from *A. niger* showed 80% remaining activity after incubating at 55°C for 2 h. However, thermal stability was lower than that of our recombinant enzyme because 60% activity reduction was found by incubating at 60°C for 20 min, and after 2 h, activity decreased to <10% [10]. Only a few *A. niger*  $\beta$ -xylosidases are reported to be active and stable at high temperatures [18, 26], whereas similar findings are reported for *A. phoenicis*, which retained 100% activity after 4 h at 60°C [20].

Following Arrhenius type behavior, a determination coefficient ( $r^2$ ) of 0.97 was obtained, and from the slope, the activation energy was 58.9 kJ mol<sup>-1</sup>. This value is similar to that reported for a  $\beta$ -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*, which was 69 kJ mol<sup>-1</sup>. Prediction electronic tools for O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GINAc) and O- $\beta$ -GlcNAc attachment sites in eukaryotic protein sequences, OGPET v. 1.0 (<http://www.ogpet.utep.edu/ogpet/index.php>), and YinOYang v. 1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang>) respectively, using  $\beta$ -xylosidase amino acid sequence analysis showed 14 potential glycosylation sites. The carbohydrate moiety of  $\beta$ -xylosidase from most *Aspergillus* spp. has been estimated to be between 10% and 47%, which promotes further enzyme stability under denaturing conditions without affecting catalytic activity [9].

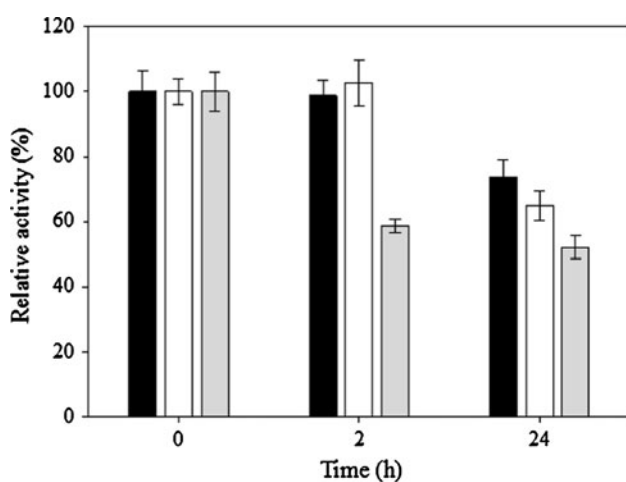
#### Effect of pH on activity and stability of recombinant $\beta$ -xylosidase

The pH of maximum activity of purified recombinant  $\beta$ -xylosidase was around 3.6 (Fig. 6). Activity decreased to 85.6, 74.9, and 44.4% of the optimum at pH values 4.0, 5.0, and 6.0, respectively. This is in contrast with the results found for  $\beta$ -xylosidase from *A. niger* IBT-3250, where activity was similar in the range 3.0–5.0 [18]. The optimum pH value was similar to that found for a  $\beta$ -xylosidase from *A. pulverulentus* (2.5–3.5), which shows a versatile feature in these strains, as the majority of other *Aspergillus* spp. produce  $\beta$ -xylosidases with optimal pH between 4.0 and 6.0 [5]. Using the optimum pH (3.6) and temperature (70°C), the recombinant  $\beta$ -xylosidase activity was found to be as high as 4,280 U mg protein<sup>-1</sup>.

Results of stability of purified  $\beta$ -xylosidase toward pH indicate that it was fairly stable after 2 h incubation at pH values of 4.0 and 5.0 (Fig. 7). Nevertheless, the activity slightly decreased at pH 6.0 (58.4% of its initial activity). After 24 h of recombinant enzyme incubation at  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ , the lowest relative activity was 52.1% at pH 6.0 (Fig. 7). On the other hand, a  $\beta$ -xylosidase from *A. phoenicis* was stable over the pH range 4.0–6.0 for 7 h at room temperature [24].



**Fig. 6** Effect of pH on recombinant  $\beta$ -xylosidase activity. Acetate buffer (50 mM) was used for pH 3.6, 4.0, and 5.0; 50 mM phosphate buffer was used for pH 6.0, 7.0, and 8.0. The *ordinate* represents relative activity that is the ratio of the activity to the activity found at optimal pH (2,694 U mg protein<sup>-1</sup>) expressed as percentage. Each *data point* represents the mean of three independent experiments  $\pm$  standard deviation



**Fig. 7** Effect of pH on recombinant  $\beta$ -xylosidase stability. The enzyme was incubated at 10°C for 2 h and 24 h. Acetate buffer (50 mM) was used for pH 4.0 (*filled square*) and pH 5.0 (*open square*), whereas 50 mM phosphate buffer was used for pH 6.0 (*gray shaded*). The *ordinate* represents relative activity that is the ratio of the activity to initial activity (2,137 U mg protein<sup>-1</sup>). Each *data point* represents the mean of three independent experiments  $\pm$  standard deviation

In addition, a recombinant  $\beta$ -xylosidase from *A. japonicus* retained >90% of its original activity between pH 2.0 and 7.0 when incubating at room temperature for 3 h [30].

#### Effect of metal ions and chemicals on recombinant $\beta$ -xylosidase activity

Effects of various metallic ions and other reagents on the activity of purified  $\beta$ -xylosidase were investigated. As

**Table 1** Residual activity of recombinant  $\beta$ -xylosidase after incubating for 10 min at 28°C with different additives (10 mM each)

Added chemical	Residual activity (%)
No additive	100 <sup>a</sup>
Cu	58.5 $\pm$ 11 <sup>b</sup>
Li	71.3 $\pm$ 3.3
Zn	107 $\pm$ 14
EDTA	85.3 $\pm$ 9.7
SDS	85.3 $\pm$ 11
DTT	91.3 $\pm$ 11
$\beta$ -mercaptoethanol	83.8 $\pm$ 8.5

*Cu* copper, *Li* lithium, *Zn* zinc, *EDTA* ethylenediaminetetraacetate, *SDS* sodium dodecyl sulfate, *DTT* dithiothreitol

<sup>a</sup> 100% residual activity corresponded to 2,194 U mg protein<sup>-1</sup>. Values represent mean of three independent experiments

<sup>b</sup> Unstable solution, showing small precipitate

shown in Table 1, activity was dramatically inhibited (58.5% and 72.5% of residual activity) by Cu<sup>2+</sup> and Li<sup>+</sup>. A slight inhibition (around 83%) was observed in the presence of EDTA, SDS, and  $\beta$ -mercaptoethanol, whereas residual activity was 91.3% in the presence of DTT.  $\beta$ -xylosidases from *Emericella nidulans* and *A. nidulans* showed some resistance to SDS but high sensitivity to Cu<sup>2+</sup> [8]. The author of that study also reported a stimulating effect on residual activity when EDTA, DTT, and Zn<sup>2+</sup> were added, which is in contrast to the behavior reported here. An effect similar to the one found here was noted by Rizzati [24], who used a purified  $\beta$ -xylosidase from *A. phoenicis*, when Cu<sup>2+</sup>, EDTA, and  $\beta$ -mercaptoethanol were added, but an opposite effect was observed on activity when Zn<sup>2+</sup> was added.

Retention of main activity by  $\beta$ -xylosidase (>83%) in the presence of reducing agents, detergents, and some salts, such as DTT,  $\beta$ -mercaptoethanol, SDS, EDTA, and Zn<sup>+</sup> show another remarkable feature of this enzyme, which represents an advantage in industrial applications where the presence of these compounds is unavoidable.

#### Conclusion

This work successfully obtained hemicellulolytic-free xylosidase when growing *A. niger* gpd-Jil-1 using a single carbon source. Recombinant  $\beta$ -xylosidase produced by *A. niger* gpd-Jil-1 exhibited significant activity at high temperatures, in acid media, and in the presence of reducing agents. It is thus likely to have good potential in animal feed, enzymatic synthesis, and the fruit-juice industry.

**Acknowledgments** Thanks are given to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for PhD grant to AAR.



## References

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1999) Short protocols in molecular biology. Wiley, New York, pp 2–11
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: signalP 3.0. *J Mol Biol* 340:783–795. doi:10.1016/j.jmb.2004.05.028
- Collins T, Gerday C, Feller G (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* 29:3–23
- de Vries RP, Visser JAAP (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:497–522
- Han Y, Chen H (2010) A  $\beta$ -xylosidase from cell wall of maize: purification, properties and its use in hydrolysis of plant cell wall. *J Mol Catal B: Enzym* 63:135–140
- Kainz E, Gallmetzer A, Hatzl C, Nett JH, Li H, Schinko T, Pachlinger R, Berger H, Reyes-Dominguez Y, Bernreiter A, Gerngross T, Wildt S, Strauss J (2008) N-Glycan modification in *Aspergillus* Species. *Appl Environ Microbiol* 74(4):1076–1086. doi:10.1128/AEM.01058-07
- Kumar S, Ramón D (1996) Purification and regulation of the synthesis of a  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* 135:287–293
- Knob A, Terrasan CRF, Carmona EC (2010)  $\beta$ -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World J Microbiol Biotechnol* 26:389–407. doi:10.1007/s11274-009-0190-4
- La Grange DC, Pretorius IS, Claeysens M, van Zyl WH (2001) Degradation of xylan to D-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* coexpressing the *Aspergillus niger*  $\beta$ -xylosidase (*xlnD*) and the *Trichoderma reesei* xylanase II (*xyn2*) genes. *Appl Environ Microbiol* 67(12):5512–5519. doi:10.1128/AEM.67.12.5512-5519.2001
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lenartovicz V, Marques Giatti, de Souza C, Guillen Moreira F, Marina Peralta R (2003) Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable  $\beta$ -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochem* 38:1775–1780. doi:10.1016/S0032-9592(02)00261-3
- Linton CJ, Borman AM, Cheung C, Holmes AD, Szekely A, Palmer MD, Bridge PD, Campbell CK, Johnson EM (2007) Molecular identification of unusual pathogenic yeast isolates by large ribosomal subunit gene sequencing: 2 years of experience at the United Kingdom mycology reference laboratory. *J Clin Microbiol* 45(4):1152–1158. doi:10.1128/JCM.02061-06
- Liu C, Sun Z, Du J, Wang J (2008) Response surface optimization of fermentation conditions for producing xylanase by *Aspergillus niger* SL-05. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:703–711
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31(3):426–428. doi:10.1021/ac60147a030
- Okafor U, Okochi V, Onyegeme-Okerenta B, Nwodo-Chinedu S (2007) Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro-wastes. *Afr J Biotechnol* 6:1710–1714
- Pachlinger R, Mitterbauer R, Adam G, Strauss J (2005) Metabolically independent and accurately adjustable *Aspergillus* sp. expression system. *Appl Environ Microbiol* 71(2):672–678. doi:10.1128/AEM.71.2.672-678.2005
- Pedersen M, Lauritzen HK, Frisvad JC, Meyer AS (2007) Identification of thermostable  $\beta$ -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett* 29:743–748
- Pérez-González JA, van Peij NNME, Bezoen A, Maccabe AP, Ramón D, De Graaff LH (1998) Molecular cloning and transcriptional regulation of the *Aspergillus nidulans xlnD* gene encoding a  $\beta$ -xylosidase. *Appl Environ Microbiol* 64(4):1412–1419
- Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:577–591. doi:10.1007/s00253-005-1904-7
- Prathumpai W, McIntyre M, Nielsen J (2004) The effect of CreA in glucose and xylose catabolism in *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:748–753. doi:10.1007/s00253-003-1409-1
- Rasmussen LE, Sørensen HR, Vind J, Viksø-Nielsen A (2006) Mode of action and properties of the  $\beta$ -xylosidases from *Talaromyces emersonii* and *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Bioeng* 94(5):871–876. doi:10.1002/bit.20908
- Regalado C, García-Almendárez B, Venegas-Barrera L, Tellez-Jurado A, Rodríguez-Serrano G, Huerta-Ochoa S, Whitaker J (2000) Production, partial purification and properties of mannanases obtained by solid substrate fermentation of spent soluble coffee wastes and copra paste using *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *J Sci Food Agric* 80:1343–1350
- Rizzatti A, Jorge J, Terenzi H, Rechia C, Polizeli M (2001) Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 26:156–160
- Sanchez O, Aguirre J (1996) Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genet Newsl* 43:48–51
- Selig MJ, Knoshaug EP, Decker SR, Baker JO, Himmel ME, Adney WS (2008) Heterologous expression of *Aspergillus niger*  $\beta$ -D-Xylosidase (XlnD): characterization on lignocellulosic substrates. *Appl Biochem Biotechnol* 146:57–68
- Shallom D, Shoham Y (2003) Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* 6:219–228. doi:10.1016/S1369-5274(03)00056-0
- Singh S, Madlala AM, Prior BA (2003) *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiol Rev* 27:3–16
- van Hartingsveldt W, Mattern IE, van Zeijl CMJ, Pouwels PH, van den Hondel CAMJJ (1978) Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the pyrG gene. *Mol Gen Genet* 206:71–75
- Wakiyama M, Yoshihara K, Hayashi S, Ohta K (2008) Purification and properties of an extracellular  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus japonicus* and sequence analysis of the encoding gene. *J Biosci Bioeng* 106(4):398–404. doi:10.1263/jbb.106.398
- Yuan XL, van der Kaaij RM, van den Hondel CAMJJ, Punt PJ, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L, Ram AFJ (2008) *Aspergillus niger* genome-wide analysis reveals a large number of novel alpha-glucan acting enzymes with unexpected expression profiles. *Mol Genet Genomics* 279:545–561. doi:10.1007/s00438-008-0332-7

## V. Resumen en extenso y artículo original del segundo artículo publicado

### **Expresión homóloga de una endo- $\beta$ -1,4-D-xilanasas mediante fermentación sumergida y sólida**

Amaro-Reyes, A, García Almendárez, BE, Vázquez Mandujano, DG, Amaya-Llano, S, Castaño-Tostado, E, Guevara-González, RG, Loera, O, Regalado, C.

Vol. 10 (10), 2011 Marzo 7 - African Journal of Biotechnology; 1760-1767. ISSN 1684–5315.

La hemicelulosa es la segunda fuente de carbono orgánico renovable en la Tierra con un alto potencial para la recuperación de los productos finales (Park y Cho, 2010). El xilano constituye el principal componente de la hemicelulosa, mientras que la endo- $\beta$ -1,4-D-xilanasas (EC 3.2.1.8) y exo- $\beta$ -xilosidasa (EC 3.2.1.37) cataliza la hidrólisis del xilano (Polizeli *et al.*, 2011). Actualmente existe un creciente interés en la obtención de enzimas xilanólíticas mediante procesos de bajo costo y alto rendimiento para aplicaciones industriales, tales como productos farmacéuticos, bioconversión de residuos agroindustriales, producción de xilo-oligosacáridos prebióticos, entre otros (Dhiman *et al.*, 2008; Antoine *et al.*, 2010). Entre las tecnologías existentes, la fermentación en estado sólido (SSF) proporciona una técnica adecuada que requiere tanto de baja inversión de capital como de bajo suministro de energía así como también disminuye la producción de aguas residuales, en comparación con la fermentación sumergida clásica (SmF) (de Castro *et al.*, 2010). Muchos materiales inertes han sido reportados como soportes, facilitando estudios detallados y reproducibles, tales como perlita y resinas poliméricas (Gamarra *et al.*, 2010), espuma o fibra de poliuretano (Montiel-González *et al.*, 2004) y poliestireno (Gautam *et al.*, 2002). Los hongos filamentosos son potenciales productores de enzimas más atractivos que las bacterias, ya que estos microorganismos secretan niveles más altos de enzimas en el medio de cultivo (Palaniswamy *et al.*, 2008). *Aspergillus niger* se usa comúnmente en SSF con soportes inertes (Rana y Bhat, 2005) para obtener proteínas

recombinantes funcionales más estables. El objetivo de este trabajo fue comparar la expresión homóloga de una endo- $\beta$ -1,4-D-xilanasas fúngica en SSF y SmF.

*Aspergillus niger* GS1 (N ° GU395669 NCBI) fue utilizado como fuente de xilanasas (UAQ, Querétaro, México). La conserva de esporas aisladas de *A. niger* GS1 y los cultivos frescos fueron obtenidos como lo describió Regalado *et al.* (2000). Para la propagación de los vectores se utilizaron células de *Escherichia coli* JM109 (Promega) cultivándose a 37°C en medio Luria-Bertani suplementado con 100 ml g<sup>-1</sup> ampicilina (Ausubel *et al.*, 2002). Los vectores utilizados fueron el plásmido pGEM-T (Promega) como vector de clonación y el pAN52.1 se utilizó para construir el vector de expresión constitutiva pANXyl bajo control del promotor *gpdA* y terminador *trpC* (ambos de *A. nidulans*) separados por sitios *Bam*HI y *Nco*I. La cepa de *A. niger* AB4.1 (*pyrG*) se utilizó para la expresión homólogos del gen de xilanasas (*xyn5*) (van Hartingsveldt *et al.*, 1978). El marcador de selección utilizado fue el vector pAB4.1 (*pyrG*) (van Hartingsveldt *et al.*, 1978). Estos dos últimos vectores fueron proporcionados por el Dr. Punt (TNO, Holanda).

Se empleó micelio de *A. niger* GS1 crecido en cajas con medio PDA para la extracción y el aislamiento de ADN genómico (gDNA) mediante el protocolo de CTAB (Ausubel *et al.*, 2002). El gen de la endo-xilanasas fue amplificado por PCR utilizando gDNA como plantilla. Los cebadores fueron diseñados utilizando secuencias reportadas en la base de datos del NCBI para genes de endo- $\beta$ -1,4-D-xilanasas (ANU39784) en *A. niger*: XynF (delantero) 5'- *CCATGGATGAAGGTC*ACTGCGGC -3', XynR (reverso) 5'- *GGATCCTTAGTGGT*GATGGTGAAGATATCGTGACAC-3'. Las bases que codifican para una etiqueta de seis histidinas se muestran subrayadas y las secuencias que codifican los sitios de restricción (*Nco*I y *Bam*HI para cebador delantero y reverso, respectivamente) están en cursiva. El ADN amplificado se ligó en el vector pGEM-T (Promega) y se envía para la secuenciación (MCLab, San Francisco, CA, EE.UU.). Después de la confirmación de secuencia, el marco de lectura abierta de ADN fue clonado en pAN52.1 (sitios de clonación: *Nco*I y *Bam*HI), para obtener el vector de expresión pANXyl.

La co-transformación de *A. niger* AB4.1 se llevó a cabo con algunas modificaciones del protocolo descrito anteriormente por (Sánchez y Aguirre, 1996) para *A. nidulans*. Todas

las temperaturas de incubación se realizaron a 30°C, mientras que el medio de cultivo fue el caldo de papa dextrosa (Difco) suplementado con uridina (2.5 g l<sup>-1</sup>). Dos microgramos de ADN total (pANXyl más pAB4.1 en proporción volumen 3:1) se añadieron a 50 µl de suspensión de esporas. Esta mezcla se aplicó un pulso eléctrico de 7 kV cm<sup>-1</sup> utilizando un MicroPulser (Bio-Rad) con una duración aproximada de 4.3 ms. Las esporas (100 µl placa<sup>-1</sup>) se extendieron sobre agar mínimo con sorbitol que contiene: (g l<sup>-1</sup>): glucosa, 10; sorbitol, 218.64; NaNO<sub>3</sub>, 6; KCl, 0.52, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.52; agar, 15; oligoelementos: ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.022; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.011; MnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O, 0.005; FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.005; CoCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O, 0.0017; CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O, 0.0016; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 0.0015; Na<sub>2</sub>EDTA, 0.05. Las placas se incubaron a 30°C, durante 48 h. La estabilidad de las transformantes prototofas a uridina se ensayó mediante su resiembra en placa. Además, se realizó el ensayo previo sin vector de expresión para tener una cepa control un control únicamente transformada con el gen *pyrG*.

Las cepas co-transformantes se sembraron en agar mínimo (sin sorbitol) y se incubaron durante 8 d a 30°C. Hasta 20 clones individuales se inocularon (2 x 10<sup>5</sup> esporas ml<sup>-1</sup>) en 50 ml de medio mínimo y se revisaron diariamente para la actividad xilanasa durante 4 d.

La SmF se llevó a cabo en tubos de 50 ml inoculando 1.46 x 10<sup>7</sup> esporas ml<sup>-1</sup> en 10 ml de medio rico en glucosa (g l<sup>-1</sup>): glucosa, 50, extracto de levadura, 0.5; NaNO<sub>3</sub>, 7.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.5, KCl, 8.67; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 8.67 y elementos traza. La mezcla se incubó a 30°C en un agitador orbital (MRC) a 200 rpm hasta por 65 h. Para la SSF se utilizó fibra de poliuretano comercial (PF) lavada con agua hirviendo y secada en horno durante 24 h (WTC Binder) a 70°C. Diez ml de medio rico en glucosa inoculado con 1.46 x 10<sup>7</sup> esporas ml<sup>-1</sup> se añadieron en matraces conteniendo 1 g de PF estéril y finalmente se incubaron a 30°C con agitación de 250 rpm hasta por 65 h.

La biomasa y los extractos enzimáticos del caldo de fermentación obtenido por SmF y SSF, etiquetados como extracto de xilanasa (XE), se obtuvieron mediante filtración a través de papel filtro N ° 4 (Whatman) y membrana de 0.45 µm (Millipore). La biomasa se determinó como la diferencia entre los pesos inicial y final después del secado hasta peso constante a 70°C. El contenido de proteína soluble se determinó según Bradford (1976) usando albúmina sérica bovina como estándar. La actividad de endo-β-1,4-D-xilanasa se

determinó empleando  $5 \text{ g l}^{-1}$  de xilano de avena como sustrato disuelto en 50 mM de tampón acetato pH 5.5. La mezcla de reacción contenía 100  $\mu\text{l}$  de solución de la enzima, 400  $\mu\text{l}$  de sustrato y fue incubada a  $50^\circ\text{C}$  durante 10 min seguido por la inmersión en agua helada. Se cuantificaron los azúcares reductores liberados de acuerdo con Miller (1959) utilizando una curva estándar xilosa. Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de xilosa  $\text{min}^{-1}$  a  $50^\circ\text{C}$ . La actividad específica ( $\text{U mg de proteína}^{-1}$ ) se obtuvo dividiendo el producto de la actividad volumétrica multiplicada por el contenido de proteína soluble con el tiempo de fermentación.

El perfil de proteína soluble se determinó mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% (p/v) según Laemmli (1970), y las bandas de proteínas fueron teñidas con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Ausubel *et al.*, 2002). La actividad de endo-xilanasa fue detectada en el gel después de la electroforesis, cortando las bandas.

Para purificar la Xyn5 recombinante, la co-transformante de *A. niger* se cultivó en SSF con medio rico en glucosa. El XE obtenido de 600 ml de medio de cultivo después de 30 h de fermentación se concentró con una unidad de filtración YM-10 Centricon (Millipore). La enzima concentrada se cargó en una columna de cromatografía de DEAE-celulosa (1.5 x 25 cm) equilibrada y eluída con 50 mM de tampón acetato pH 4.4. Las proteínas ligadas fueron liberadas mediante un gradiente lineal del mismo tampón de elución más 1 M de NaCl. Se colectaron fracciones de un ml las cuales fueron analizadas mediante su absorbancia a 280 nm y su actividad de endo-xilanasa. Las fracciones activas fueron agrupadas, concentradas y luego fueron cargadas en una columna Ni Sepharose 6 Fast Flow de 1 ml (GE Healthcare) de acuerdo al manual del fabricante.

Para determinar la temperatura óptima de la xilanasa se llevaron a cabo las determinaciones de la actividad a diferentes temperaturas de incubación ( $30\text{-}80^\circ\text{C}$ ) utilizando alícuotas de 1  $\mu\text{g}$  de Xyn5 recombinante purificada. El pH óptimo la enzima se determinó con alícuotas y volumen de reacción similares a la de temperatura óptima usando tampón acetato 50 mM de pH 3.6 hasta 5.0, tampón fosfato 50 mM de pH 6.0 a 8.0, y tampón glicina 50 mM a pH 9.0. Todos los experimentos se realizaron con tres repeticiones.

Se obtuvo una única banda de amplificación de los productos de PCR con un tamaño aproximado de 666 pb usando los cebadores XynR y XynF (datos no presentados). El producto de PCR se insertó en el vector pGEM-T y los clones positivos fueron identificados por su secuencia. Esta secuencia insertada muestra hasta el 99% de homología con la secuencia de completa ARNm de codificación para una xilanasa (*xyn5*) de *A. niger* ATCC 90196 (U39784). Nuestra secuencia correspondió a un gen estructural completo que codifica para la endo- $\beta$ -1,4-D-xilanasa, además de una etiqueta de seis residuos de histidina en el extremo carboxilo para facilitar su purificación. Esta secuencia obtenida quedó registrada en la base de datos del NCBI con el número de acceso GU585574. El análisis del marco de lectura abierto (654 pb) realizado usando el software ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) indicó que codifica para un polipéptido de 217 aminoácidos con un peso molecular de 23.6 kDa con pI de 5.47. La construcción del pANXyl contenía una secuencia de codificación de 16 aminoácidos del péptido señal propio de Xyn5 (AFA-AP) de acuerdo con Bendsten *et al.* (2004).

Aproximadamente trescientos co-transformantes fueron identificados como regenerantes PyrG<sup>+</sup> con los plásmidos pAB4.1 y pANXyl, de los cuales cincuenta fueron sembrados dos veces en placas de medio mínimo y luego se ensayó su actividad de endo-xilanasa. Cinco cepas morfológicamente estables mostraron actividad de endo-xilanasa y aquella que mostró una actividad ligeramente superior a las demás (nombrada *gpd-Xyl-1*) fue elegida para los siguientes estudios. La expresión de proteínas recombinantes mediada por el promotor *gpdA* que permite la expresión de proteínas recombinantes utilizando glucosa como fuente de carbono ya ha sido reportada (Pachlinger *et al.*, 2005; Kainz *et al.*, 2008).

En la Figura 1a se muestran los perfiles de producción de biomasa de *A. niger gpd-Xyl-1* utilizando SmF y SSF. Las curvas de crecimiento mostraron un aumento constante hasta un valor máximo después de 41 h tanto para SSF (30.3 g de biomasa seca l<sup>-1</sup>) como para SmF (15.8 g de biomasa seca l<sup>-1</sup>). Este comportamiento, con la ausencia aparente de una fase de adaptación puede atribuirse a la utilización de una fuente de carbono fácilmente asimilable (glucosa). Después de las 41 h la biomasa no mostró cambios significativos (p

<0.05) para ambos sistemas de cultivo, probablemente asociado al agotamiento de algunos nutrientes y/o la falta de espacio para el crecimiento. En la Figura 1 (b y c), se muestran los perfiles de los títulos extracelulares de proteína soluble y la actividad específica de endo-xilanasas respectivamente, obtenidos durante el crecimiento de *A. niger* gpd-Xyl-1 en SSF y SmF.

El crecimiento de esta cepa co-transformada en un medio rico en glucosa produjo un aumento constante en la actividad de endo-xilanasas hasta las 28 h y 41 h para la SSF y SmF, respectivamente. Después de esos tiempos, ambos sistemas de fermentación mostraron una fuerte disminución en la actividad específica hasta el final del cultivo (65 h) (Fig. 1c). Este comportamiento se debe probablemente a la liberación de proteasas (datos no mostrados) ya que el contenido de proteína se mantuvo en aumento durante el tiempo de fermentación hasta las 50 h (fig. 1b). Este aumento en la concentración de proteínas a través del tiempo de fermentación se observó también por SDS-PAGE (Fig. 2, carriles 2 y 4 contra 3 y 5). En el sistema SSF, se observó un máximo nivel de actividad endo-xilanasas ( $123.2 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ ) después de 28 h, mientras que la mayor actividad en SmF ( $50.4 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ ) se observó después de 41 h de fermentación (Fig. 1c). La actividad de endo-xilanasas no se detectó en ninguna de las cepas control. Adicionalmente, nuestros resultados concuerdan con Oda *et al.* (2006), quienes informaron de que *A. oryzae* secreta de 4.0 a 6.4 veces más proteína por mg de micelio a 32 h y 40 h en SSF, en comparación con la SmF. Un problema comúnmente citado sobre la expresión de proteínas heterólogas en hongos son las proteasas del hospedero (Gasser y Mattanovich, 2007), así como la morfología celular y el medio ambiente del biorreactor (Talabardon y Yang, 2007). El genoma de *A. niger* codifica para 198 proteínas involucradas en la degradación proteolítica incluyendo aspartil endoproteasas, serina carboxipeptidasas, di- y tri-peptidilaminopeptidasas (Pel *et al.*, 2007). Las proteasas extracelulares aumentan de forma considerable cuando el crecimiento de la célula entra en la fase estacionaria (Talabardon y Yang, 2007). Este efecto se puede correlacionar con los datos de la Figura 1 (a-c), donde la concentración de proteínas va en aumento y cuando la biomasa llega a la fase estacionaria disminuye la actividad específica. Lu *et al.* (2010) reportaron que el cultivo con agitación de *A. niger* con xilosa y maltosa como fuente de carbono son menos favorables para la producción de proteínas recombinantes, porque las chaperonas y foldasas del retículo

endoplásmico se encuentran presentes en cantidades más bajas, mientras que las proteasas vacuolares se acumulan a niveles más altos.

El pH inicial de la SSF con *A. niger* gpd-Xyl-1 fue de 6.5 disminuyendo a 5.5 a las 17 h de fermentación, luego fue llegando a 5.8 después de 65 h. Para la SmF de la cepa recombinante se observó una disminución del pH 6.5 a 5.6 después de 17 h, terminando en 6.2 después de 65 h de fermentación. Algunos reportes han demostrado que la producción de proteasas fúngicas está estrictamente regulada con el pH, alcanzando un máximo de producción a un pH de 5.5 (McKelvey y Murphy, 2010; Sarao *et al.*, 2010). En el pico máximo de títulos de enzima se estimó una productividad de  $17.1 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para SSF, y de  $3.2 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para SmF. Por lo tanto, la productividad en SSF fue 5.3 veces superior a la de SmF probablemente asociada a que la cantidad de biomasa seca fue casi el doble. Estos resultados también pueden ser explicados por un aumento en el número de puntas activas de las hifas en crecimiento durante la SSF, que son más porosas y proporcionan un paso más fácil de las exoenzimas a través de la pared celular (Wang *et al.*, 2005). *A. niger* GS1 no fue capaz de crecer en SSF cuando la glucosa no estuvo presente en el medio, lo que indica que la PF por sí solo no aportó ninguna fuente de carbono para mantener el crecimiento. En general, los rendimientos de producción enzimática son más altos en SSF que en SmF (Ishida *et al.*, 2006; Antoine *et al.*, 2010). Esto podría estar relacionado con el hecho de que en este sistema el hongo crece en condiciones similares a las que se encuentran de forma natural (Dhiman *et al.*, 2008). Díaz-Godínez *et al.* (2001) y Biesebeke *et al.* (2002) desarrollaron la hipótesis de que los fenómenos de transferencia de oxígeno, gradientes de concentración de los sustratos, temperatura y contenido de agua en soportes sólidos, son factores fundamentales que explican las diferencias en la fisiología microbiana cuando se compara la SSF con SmF.

*A. niger* gpd-Xyl-1 produjo una endo-xilanasa extracelular, que con la cromatografía de afinidad se purificó de 5.1 veces con recuperación de la actividad del 35.7%. La endo-xilanasa purificada mostró actividad específica de  $522 \text{ U mg de proteína}^{-1}$  con un peso molecular aparente de 30 kDa (Fig. 2). La actividad de endo-xilanasa se confirmó ensayándola en un fragmento aislado del gel que contiene esta banda única. Otras endo-xilanasas de *Aspergillus* spp. han mostrado un tamaño similar (de 6 a 50 kDa, Polizeli



*et al.* 2011) al de nuestra enzima purificada. A partir de *Aspergillus* spp. se han purificado varias endo-xilanasas siendo de las más activas una inducida con salvado de trigo y xilano (5,870 U mg de proteína<sup>-1</sup>) (Krisana *et al.*, 2005) que es 11 veces más activa que la obtenida en este reporte. Resultados similares a nuestro estudio fueron encontrados por Wakiyama *et al.* (2010) quienes determinaron actividad específica de 566 U mg de proteína<sup>-1</sup> para una endo-β-1,4-xilanasas purificada de *A. japonicus* MU-2 cultivado en xilano de avena. Sin embargo, se informó de una endo-xilanasas aislada de *A. ficuum* AF-98 crecido en SSF con salvado y bagazo de trigo con aproximadamente la mitad de la actividad que se obtuvo aquí (288.7 U mg de proteína<sup>-1</sup>, Lu *et al.*, 2008). Por otro lado, la xilanasas obtenida utilizando *A. carneus* M34 en SmF suplementada con xilano de avena mostró 245.9 U mg de proteína<sup>-1</sup> (Fang *et al.*, 2008). Además, Yang *et al.* (2010) purificaron y caracterizaron una xilanasas extracelular de *A. niger* C3486 cultivado en SmF que mostró actividad de 123.4 U mg de proteína<sup>-1</sup>. En relación con xilanasas recombinantes de *Aspergillus*, uno de los primeros informes para la expresión heteróloga de genes xilanasas fúngicas fue el realizado por Luttig *et al.* (1997) quienes consiguieron clonar los genes *xyn4* y *xyn5* de *A. niger* ATCC 90196 en *Saccharomyces cerevisiae*. Por otra parte, se logró la expresión heteróloga del gen de xilanasas de *A. niger* F19 en *P. pastoris* mediante crecimiento en SmF con una alta actividad de 3,330 U mg de proteína<sup>-1</sup> (Chen *et al.*, 2010). Yi *et al.* (2010) reportaron la expresión heteróloga de una XYNA1 y XYNB en *E. coli* BL21 que mostraron actividades específicas de 16.58 U mg de proteína<sup>-1</sup> y 1,201.7 U mg de proteína<sup>-1</sup>, respectivamente. Un gen de endo-xilanasas de *A. usarii* E001 fue expresado en *E. coli* BL21 y la enzima purificada mostró 49.6 U mg de proteína<sup>-1</sup> (Zhou *et al.*, 2008). El uso de una cepa de *A. niger* BRFM281 proteasa-negativa permitió la expresión de *xynB* mediante SmF con actividad de 691 U mg de proteína<sup>-1</sup> (Levasseur *et al.*, 2005), que es aproximadamente 1.3 veces más activa que la que presentamos.

La temperatura óptima para la actividad de la endo-xilanasas purificada fue de 50°C, mientras que a 40°C y 60°C la enzima exhibió un 56.2% y 55.3% de actividad relativa, respectivamente (Fig. 3a). El pH óptimo de la endo-xilanasas fue de 5.5 (Figura 3b). Se observó una actividad relativa de 49.7% y 21.6% a valores de pH de 5.0 y 7.1, respectivamente. Estos resultados se encuentran dentro del rango de temperatura (40-70°C)

y pH óptimo (4.0-6.0) para endo-xilanasas reportadas de especies de *Aspergillus* (Dhiman *et al.*, 2008; Polizeli *et al.*, 2011.).

Endo-xilanasas producidas por *A. niger*, *A. niveus* y *A. ochraceus*, usando SSF con salvado de trigo y mazorca de maíz como sustrato mostraron una temperatura óptima de 55°C, mientras que los valores óptimos de pH fueron 6.0, 5.0 y 5.5, respectivamente (Betini *et al.*, 2009). Una xilanasas recombinante reportada por Li *et al.* (2010) mostro valores similares de actividad óptima, que fueron a 50°C y pH 5.0. Una XYNB recombinante mostro actividad óptima a 50°C que disminuyó rápidamente a 25% de la actividad inicial a 70°C. El pH óptimo de la actividad de esta proteína recombinante fue de 5.5 y sólo el 25% del máximo se alcanzó en pH inferior a 3.5 y por encima de 7.5 (Levasseur *et al.*, 2005). Este comportamiento es comparable a nuestra endo-xilanasas recombinante. Un perfil similar se observó para una endo-xilanasas de *A. niger* BRFM281 expresada en *E. coli*. La actividad óptima se encontró a un pH de 4.6 con retención de la actividad del 50% en el rango de pH 4.2-5.3, mientras que la temperatura óptima a pH 4.6 fue de 50°C (Zhou *et al.*, 2008).

Se concluye que el sistema de expresión empleado en este estudio, usando PF como soporte inerte, es una alternativa adecuada para la producción homóloga de una endo-xilanasas por medio de SSF en condiciones de expresión selectiva. Este sistema proporciona mayor rendimiento de la enzima, menor riesgo de contaminación y un proceso ecológico, en comparación con el sistema de SmF. Este enfoque podría utilizarse para expresar proteínas individuales de familias de genes que se encuentran regulados coordinadamente. Sin embargo, otros aspectos de la biotecnología, como la optimización del diseño de biorreactor, transferencia de calor y de masa, deben ser desarrollados para hacer de la SSF una tecnología viable para obtener productos de valor agregado a escala comercial.

Full Length Research Paper

# Homologue expression of a fungal endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase using submerged and solid substrate fermentations

Amaro-Reyes, A.<sup>1</sup>, García-Almendárez, B. E.<sup>1</sup>, Vázquez-Mandujano, D. G.<sup>1</sup>, Amaya-Llano, S.<sup>1</sup>, Castaño-Tostado, E.<sup>1</sup>, Guevara-González, R. G.<sup>2</sup>, Loera, O.<sup>3</sup> and Regalado, C.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>DIPA, PROPAC. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario s/n. Col. Las Campanas. Querétaro, 76010 Qro. México.

<sup>2</sup>C.A Ingeniería de Biosistemas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario s/n. Col. Las Campanas. Querétaro, 76010 Qro. México.

<sup>3</sup>Dpto. de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340 México, D.F. México.

Accepted 25 January, 2011

The *xyn5* gene, which encodes an endo- $\beta$ -1,4-xylanase (Xyn5), in *Aspergillus niger* GS1 was cloned into an expression cassette under the control of constitutive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. The expression system was designed to produce the recombinant enzyme containing a six-histidine peptide fused to the carboxyl end of the protein. The efficiency of Xyn5 production under submerged (SmF) and solid-state (SSF) fermentation was investigated using the homologous co-transformed *A. niger* AB4.1. A productivity of 17.1 U/(l·h) was estimated for SSF and 3.2 U/(l·h) for SmF calculated at peak value of enzyme titers. Recombinant Xyn5 obtained by SSF on polyurethane fiber, was purified 5.1-fold by anion exchange and immobilized metal affinity chromatography, with 35.7% recovery. The purified recombinant enzyme showed an apparent molecular weight of 30 kDa and optimal activity (522 U/mg protein) at pH 5.5 and 50°C.

**Key words:** *Aspergillus niger* GS1, xylanolytic activity, solid-state fermentation, homologue expression, polyurethane fiber.

## INTRODUCTION

Hemicellulose is the second source of renewable organic carbon on earth, with a high potential for the recovery of useful end products (Park and Cho, 2010). Xylan constitutes the major component of hemicellulose, while endo-1,4- $\beta$ -D-xylanases (E.C. 3.2.1.8) and exo- $\beta$ -xylosidases

(E.C. 3.2.1.37) catalyze the hydrolysis of xylan (Polizeli et al., 2011).

In order to obtain xylanolytic enzymes, there is a growing interest in developing both high yield and low cost processes for industrial applications, such as pharmaceutical products, bioconversion of agro-industrial residues, production of prebiotic xylo-oligosaccharides, among others (Dhiman et al., 2008; Antoine et al., 2010). In fact, xylanases are an important group of carbohydrases, with a worldwide market of around US \$200 million per annum (Mullai et al., 2010). Therefore, the search of strains showing generally recognized as safe status, able to grow in low cost substrates to optimize enzymes production is a highly relevant goal. Among existing technologies, solid-state fermentation (SSF) provides a suitable technique requiring low capital investment and energy supply, while a characteristic decrease in wastewater output as compared with classical sub-

\*Corresponding autor. E-mail: carlosr@uaq.mx, regcarlos@gmail.com. Tel: +52 442 1921307. Fax: +52 442 1921304.

**Abbreviations:** CTAB, Cetyl trimethylammonium bromide; DEAE, diethyl aminoethyl; NCBI, National center of biotechnology information; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; PDA, potato dextrose agar; PF, polyurethane fiber; SmF, submerged fermentation; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SSF, solid-state fermentation; XE, xylanase extract.

merged fermentation (SmF) (de Castro et al., 2010). Additionally, SSF promotes a relatively low water activity environment favoring growth of fungi inoculated into a liquid medium impregnated in the solid substrate (Kapilan and Arasaratnam, 2011). Many inert materials have been reported for use in SSF, facilitating reproducible and detailed studies, involving perlite and polymeric resins (Gamarra et al., 2010), polyurethane foam or fiber (Montiel-González et al., 2004) and polystyrene (Gautam et al., 2002).

Filamentous fungi are more attractive than bacteria as potential enzyme producers since these microorganisms secrete higher levels of enzymes into the culture medium (Palaniswamy et al., 2008). *Aspergillus niger* is commonly used in strategies of SSF using inert supports (Rana and Bhat, 2005), to achieve functional and more stable recombinant proteins. The aim of this work was to compare the homologous expression of an endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase under SSF and SmF using a fungal system.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

All chemicals were of analytical grade and were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), except those indicated.

### Microorganisms and plasmid

*A. niger* GS1 (NCBI no. GU395669) was used as a source of xylanase (UAQ, Querétaro, Mexico). *A. niger* GS1 was stored in Tween 20 on silica gel at 4°C. Stock cultures were sub-cultured on fresh sterile potato dextrose agar (PDA; Bioxon, Cuautitlán, Mexico) plates and incubated for 72 to 120 h at 30°C. *Escherichia coli* JM109 (Promega, Madison, WI, USA) was used for propagation of vectors and was cultured in Luria-Bertani medium (Ausubel et al., 2002) supplemented with 100 mg/l ampicillin at 37°C. The pGEM-T plasmid (Promega) was used as the subcloning vector. *A. niger* AB4.1 (*pyrG*) strain (van Hartingsveldt et al., 1987) was used for homologous expression of xylanase (*xyn5*) gene. Vector pAN52.1 was used to construct the constitutive expression vector pANXyl. This vector contains the constitutive *gpdA* promoter and the terminator region of the *trpC* gene (both from *Aspergillus nidulans*) separated by *Bam*HI and *Nco*I sites. Vector pAB4.1 which contains the *A. nidulans pyrG* gene (van Hartingsveldt et al., 1987) was used as selection marker. Both vectors were kindly provided by Dr. Punt (TNO, The Netherlands).

### Molecular identification of *A. niger* GS1 endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase gene

Mycelia from *A. niger* GS1 grown in PDA slants were employed for genomic DNA (gDNA) extraction and isolation using the CTAB protocol (Ausubel et al., 2002). The endo-xylanase gene was amplified by PCR using gDNA as template. Primers were designed using NCBI reported sequences for *A. niger* endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase gene (ANU39784): XynF (forward) 5'-CCATGGATGAAGGTCA CTGCGGC-3', XynR (reverse) 5'-GGATCCTTAGTGGTGATG GTGATGATGAAGATATCGTGACAC-3'. Bases coding for His<sub>6</sub>-tag are shown underlined and those coding for restriction sites (*Nco*I and *Bam*HI for forward and reverse primers, respectively) are in

italics. The amplified DNA was ligated into pGEM-T (Promega) vector and sent for sequencing (MCLab, San Francisco, CA, USA). After sequence confirmation, the DNA open reading frame was then, cloned into the expression vector pAN52.1 (cloning sites: *Nco*I and *Bam*HI), to obtain pANXyl expression vector.

### *Aspergillus* AB4.1 transformation

*A. niger* AB4.1 co-transformation was accomplished as previously reported (Sánchez and Aguirre, 1996) developed for *A. nidulans*, with modifications. All incubation temperatures were performed at 30°C, while growing medium was potato dextrose broth (Difco) supplemented with uridine (2.5 g/l). 2  $\mu$ g total DNA (pANXyl expression vector plus pAB4.1 vector in a 3:1 volume ratio) was added to 50  $\mu$ l of ice cold spore suspension. This mixture was electroporated using a MicroPulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), adjusting voltage to 7 kV/cm and pulses lasting approximately 4.3 ms. Spores (100  $\mu$ l/plate) were extended on sorbitol-containing minimal agar (g/l): glucose, 10; sorbitol, 218.64; NaNO<sub>3</sub>, 6; KCl, 0.52; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.52; agar, 15; trace elements: ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.022; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.011; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.005; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.005; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.0017; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0016; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.0015; Na<sub>2</sub>EDTA, 0.05; without uridine. Spores were incubated at 30°C, for 48 h. Uridine prototrophy transformants stability was tested by velvet-replica plating on minimal medium. In addition, a control was transformed with the *pyrG* gene but without expression vector.

### Screening and production of xylanase activity

Co-transformants were placed on minimal agar (without sorbitol) and incubated for 8 days, at 30°C. To screen co-transformants, up to 20 individual clones were inoculated (2×10<sup>5</sup> spores/ml) into 50 ml minimal medium and checked daily for xylanase activity during 4 days.

### Fermentation systems

SmF was carried out in 50 ml tubes, inoculating 1.46×10<sup>7</sup> spores/ml in 10 ml glucose-rich medium (g/l): glucose, 50; yeast extract, 0.5; NaNO<sub>3</sub>, 7.5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.5; KCl, 8.67; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 8.67; trace elements. The mixture was incubated at 30°C in an orbital shaker (MRC, Hagavish, Holon, Israel) at 200 rpm, for up to 65 h. For SSF, locally produced commercial polyurethane fiber (PF) was washed with boiling water and oven dried for 24 h (WTC Binder, Tuttingen, Germany) at 70°C. Glucose-rich medium and 1 g of dry PF placed in 250 ml flasks, were sterilized separately at 121°C for 15 min. 10 ml of medium inoculated with 1.46×10<sup>7</sup> spores/ml were added to each flask, homogenized and incubated at 30°C using 250 rpm, for up to 65 h.

### Biomass and enzyme extracts

Fermentation broth from SmF was filtered through Whatman no. 4 filter (Maidstone, England). After SSF, extracts containing extracellular xylanase were obtained by compressing PF in a Buchner funnel lined with a Whatman no. 4 filter. Biomass was determined as the difference between initial and final weights after drying to constant weight at 70°C. Both filtrates were passed through a 0.45  $\mu$ m pore size membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) to remove any insoluble material and were labeled as xylanase extract (XE).

### Protein and xylanase activity

Soluble protein content was determined according to Bradford

(1976), using bovine serum albumin as standard. Endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase activity was determined using 5 g/l oats spelt xylan as substrate, dissolved in 50 mM acetate buffer, pH 5.5. The reaction mixture contained 100  $\mu$ l enzyme solution, 400  $\mu$ l substrate and was incubated at 50°C for 10 min, followed by immersion in ice cold water. Released reducing sugars were quantified according to Miller (1959), using a xylose standard curve. One activity unit (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1  $\mu$ mol of xylose equivalents/min at 50°C. Specific activity (U/mg protein) was obtained dividing volumetric activity by soluble protein content. Endo-xylanase productivity was calculated as the product of specific activity multiplied by soluble protein content and dividing by fermentation time.

#### Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was carried out using 12% (w/v) polyacrylamide gels, according to Laemmli (1970) and protein bands were stained with Coomassie brilliant blue R-250 (Ausubel et al., 2002). Endo-xylanase activity was detected in the gel after electrophoresis, by cutting the bands.

#### Purification of the recombinant endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase

To purify the recombinant Xyn5, co-transformed *A. niger* was cultivated on SSF in glucose-rich medium. XE from 600 ml culture medium after 30 h fermentation was concentrated using a YM-10 Centricon filter unit (Millipore). Concentrated enzyme was applied into a DEAE-cellulose chromatography column (1.5 x 25 cm) equilibrated and eluted with 50 mM acetate buffer, pH 4.4, at a flow rate of 15 ml/h. Bound proteins were released by using a linear gradient of same elution buffer plus 1 M NaCl. 1 ml fractions were collected and assayed for absorbance at 280 nm and endo-xylanase activity. Active fractions were pooled, concentrated and loaded onto a Ni Sepharose 6 fast flow column (1 ml) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) following manufacturers manual.

#### Effect of temperature and pH on endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase activity

To determine optimal temperature of xylanase, activity determinations were conducted using 1  $\mu$ g aliquots of purified recombinant Xyn5 and incubating at 30 to 80°C. Optimal pH was determined using same protein aliquots and total reaction volume. Activity was determined using 50 mM acetate buffer for pH values 3.6 to 5.0, 50 mM phosphate buffer for pH values 6.0 to 8.0 and 50 mM glycine buffer for pH 9.0. All experiments were conducted using three replicates.

## RESULTS AND DISCUSSION

#### Molecular identification of endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase gene from *A. niger* GS1

A single amplification band was obtained from PCR products with an approximate size of 666 bp when primers XynR and XynF were used (data not shown). PCR product was inserted into pGEM-T vector and positive clones were identified by sequencing, showing up to 99% homology with *A. niger* ATCC 90196 xylanase (*xyn5*) mRNA complete coding sequence (U39784). Our se-

quences corresponded to a complete structural gene coding for endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase, plus a His<sub>6</sub> tag at the carboxyl end for rapid purification. This sequence obtained the NCBI database accession number GU585574. The ORF (654 bp) was predicted to code for a polypeptide of 217 amino acids with a molecular mass of 23.6 kDa and pI of 5.47 using ProtParam software (Gasteiger et al., 2005). The construction pANXyl contained a sequence coding for 16 amino acids of the own *xyn5* signal peptide (AFA-AP), according to Bendtsen et al. (2004).

#### Expression of endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase gene from the *gpdA* promoter

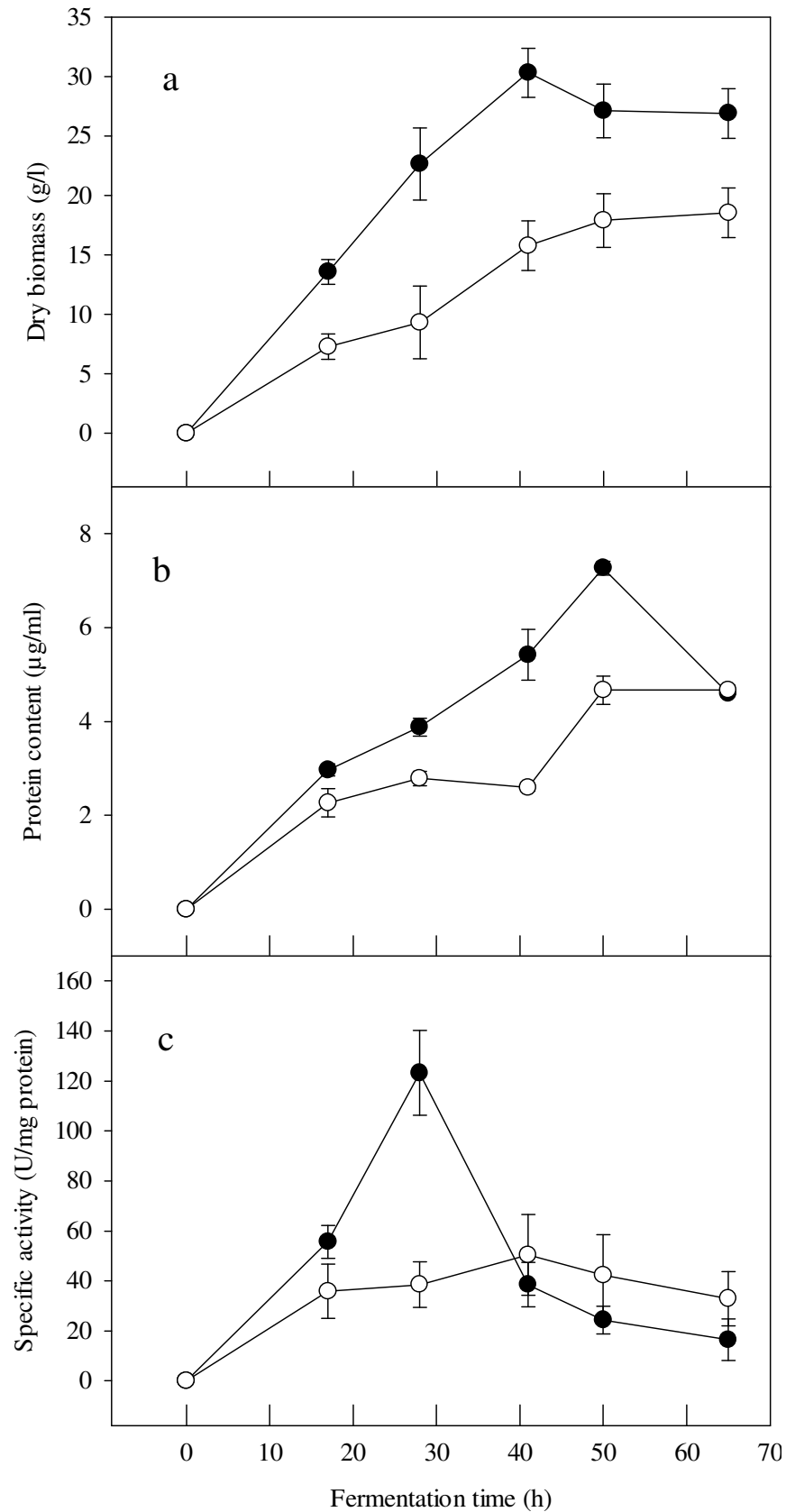
From Pyr<sup>+</sup> regenerants co-transformed with plasmid pAB4.1 and pANXyl, up to three hundred transformants were identified. Fifty of those transformants were streaked twice on minimal plates and then, screened for endo-xylanase activity by growing in glucose-rich medium that represses Xyn5 synthesis in the wild-type strain. Five morphologically stable strains showed endo-xylanase activity and that showing slightly higher activity was chosen for further studies (*gpd-Xyl-1*).

Expression of recombinant proteins mediated by *gpdA* promoter has been reported (Pachlinger et al., 2005; Kainz et al., 2008). This promoter also allows recombinant protein expression by using glucose as carbon source instead of other inducing molecules such as xylan.

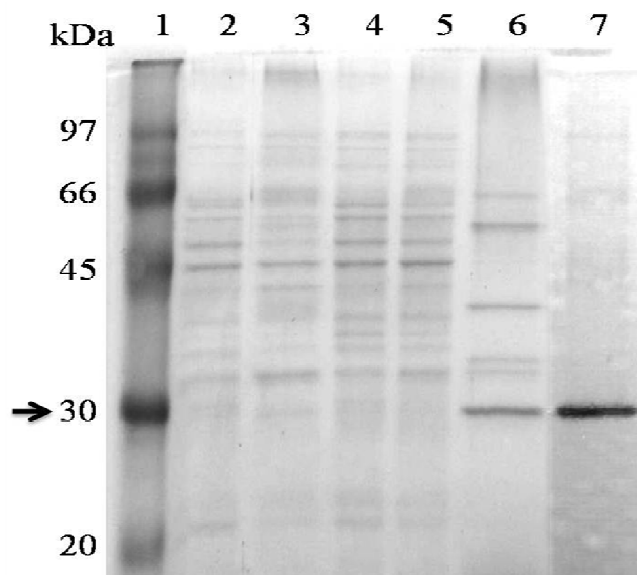
#### Effect of fermentation system on biomass and endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase production

Figure 1a shows biomass production profiles by *A. niger* *gpd-Xyl-1* either under SmF or SSF. Growth curves showed a steady increase up to a maximum value after 41 h in SSF (30.3 g dry biomass/l) and in SmF (15.8 g dry biomass/l). This behavior without apparent presence of lag phase could be attributed to the use of the readily available carbon source (glucose). After about 41 h biomass did not show significant changes ( $p < 0.05$ ) for both culture systems, probably associated to the exhaustion of some nutrients and/or lack of growth space.

Figure 1b and c, shows the profiles of extracellular soluble protein titers and endo-xylanase specific activity, respectively, obtained during growth of co-transformant *A. niger* *gpd-Xyl-1* on SSF and SmF. Growth of this co-transformed strain in glucose rich medium, produced steadily increased endo-xylanase activity up to 28 and 41 h for SSF and SmF, respectively. After those times, both fermentation systems showed a strong specific activity decrease until the end of culture (65 h) (Figure 1c). This behavior is probably due to the presence of increased proteases release (data not shown), since protein content



**Figure 1.** Growth profiles of *A. niger* gpd-Xyl-1 under SmF (○) and SSF (●). a) dry biomass; b) extracellular soluble protein titers; c) endo-xylanase specific activity.



**Figure 2.** SDS-PAGE of xylanolytic extracts from *A. niger* gpd-Xyl-1 growth under different fermentation systems. Lanes: 1, low molecular weight markers (GE Healthcare); lane 2, extracellular proteins at 28 h of SSF; lane 3, extracellular proteins at 41 h of SmF; lane 4, extracellular proteins at 41 h of SSF; lane 5, extracellular proteins at 50 h of SmF; lane 6, semi-purified endo-xylanase after DEAE-cellulose chromatography; 7, purified endo-xylanase.

kept increasing during fermentation time up to 50 h (Figure 1b). An increase in proteins concentration with fermentation time was also noticed by SDS-PAGE (Figure 2, lanes 2 and 4 versus 3 and 5). In the SSF system, high level of endo-xylanase activity (123.2 U/mg protein) was noticed after 28 h, while the highest activity under SmF (50.4 U/mg protein) was observed after 41 h of fermentation (Figure 1c). Endo-xylanase activity was not detected in any of the PyrG<sup>+</sup> transformants. Additionally, our results are in agreement with Oda et al. (2006) who reported that *Aspergillus oryzae* secreted 4.0- to 6.4-fold more protein per mg mycelium at 32 and 40 h under SSF when compared with SmF.

A commonly cited problem regarding expression of heterologous proteins in fungi are host proteases (Gasser and Mattanovich, 2007) as well as cell morphology and bioreactor environment (Talabardon and Yang, 2007). The *A. niger* genome encodes 198 proteins involved in proteolytic degradation including a variety of secreted aspartyl endoproteases, serine carboxypeptidases and di- and tripeptidylaminopeptidases (Pel et al., 2007). The extracellular proteases sharply increase when cell growth enters the stationary phase (Talabardon and Yang, 2007). This effect may be correlated with data shown in Figure 1a to c, where protein concentration is rising and when biomass reaches stationary phase the specific activity decreases. Lu et al. (2010) reported that, *A. niger* shake cultures using xylose and maltose as carbon source are less favorable for recombinant protein production

because endoplasmic reticulum-resident chaperones and foldases are present in lower amounts, while vacuolar proteases accumulate to higher levels.

The initial pH of SSF using *A. niger* gpd-Xyl-1 was 6.5 decreasing to 5.5 at 17 h of fermentation, to end at 5.8 after 65 h. SmF of same recombinant strain decreased pH from 6.5 to 5.6 after 17 h, ending at 6.2 after 65 h of fermentation. Some reports have shown that, fungal proteases production is strictly pH regulated reaching a maximum at pH 5.5 (McKelvey and Murphy, 2010; Sarao et al., 2010).

A productivity of 17.1 U/(l·h) was estimated for SSF and 3.2 U/(l·h) for SmF calculated at times of highest enzyme titers. Thus, productivity from SSF was 5.3 times higher than that from SmF, probably associated to about twice dry biomass. These results may also be explained by an increased number of active tips of growing hyphae during SSF, which are more porous, providing an easier pass of exoenzymes through the cell wall (Wang et al., 2005). Furthermore, te Biesebeke et al. (2005) suggest that, a higher number of wheat kernels penetrating hyphae per hyphal growth unit may explain the higher secretion of enzyme activities on *A. oryzae* mutant strains altered in the number of hyphal tips.

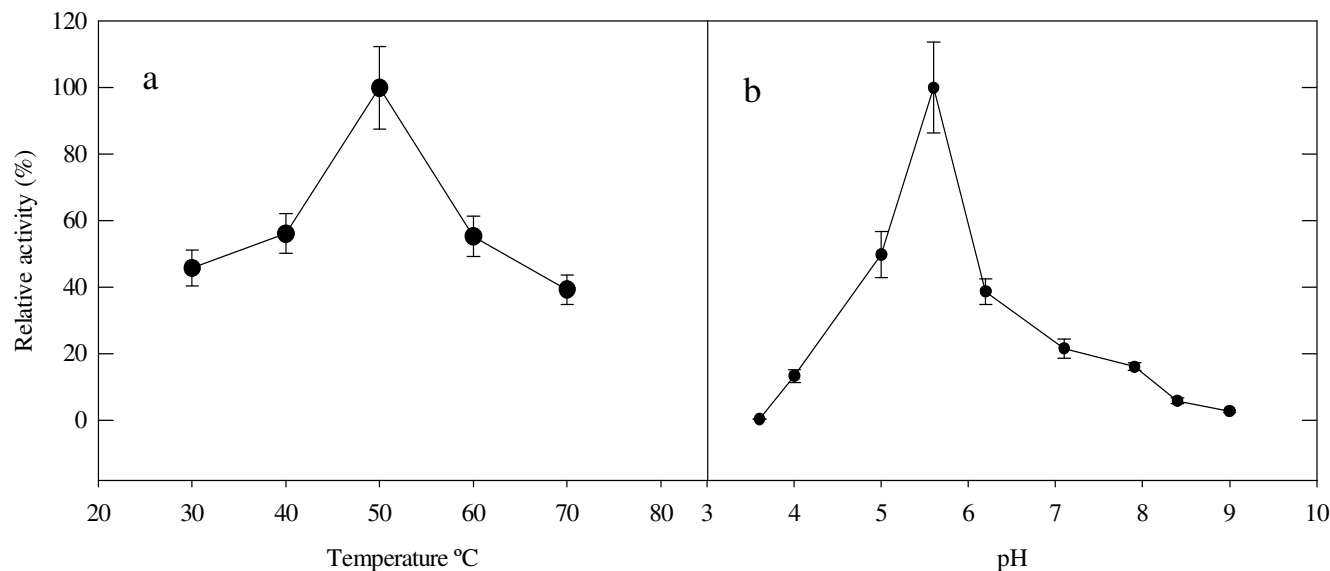
*A. niger* GS1 was not able to grow on SSF when glucose was not present in the medium, indicating that PF alone did not provide any carbon source to sustain growth.

It is generally agreed that, enzymatic yields are higher in SSF in comparison to SmF (Ishida et al., 2006; Antoine et al., 2010). This might be related to the fact that, the fungus grows in similar conditions to those found in natural habitats (Dhiman et al., 2008). Díaz-Godínez et al. (2001) and te Biesebeke et al. (2002) hypothesized that, oxygen transfer phenomena, substrates concentration gradients, temperature and water content in solid supports are fundamental factors that account for differences on microbial physiology when SSF is compared with SmF.

#### Purification of the recombinant endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase

*A. niger* gpd-Xyl-1 produced one endo-xylanase in culture supernatants, which after affinity chromatography was purified 5.1-fold, with 35.7% activity recovery. Purified endo-xylanase showed a specific activity of 522 U/mg protein; showing a single protein band with an apparent molecular weight of 30 kDa (Figure 2). Endo-xylanase activity was confirmed from an isolated fragment of the gel containing this single band. Other *Aspergillus* spp. endo-xylanases have shown a similar size (6 to 50 kDa) as that of our purified enzyme (Polizeli et al., 2011).

Several endo-xylanases have been purified from *Aspergillus* spp., where the most active was one induced with wheat bran and xylan (5,870 U/mg protein) (Krisana et al., 2005), which is 11 times more active than that obtained here. Results similar to our study were found by



**Figure 3.** Effect of temperature and pH on purified endo-xylanase activity. (a) Effect of temperature on endo-xylanase activity in 50 mM acetate buffer, pH 5.5 (●). The ordinate represents relative activity that is the ratio of the activity at each tested temperature value to the activity found at optimal temperature 50 °C (530 U/mg protein), expressed as percentage; (b), effect of pH on endo-xylanase activity (●). The ordinate represents relative activity that is the ratio of the activity at each tested pH value to the activity found at optimal pH (480 U/mg protein), expressed as percentage. Each data point represents the mean of three independent experiments  $\pm$  standard deviation.

Wakiyama et al. (2010) for an extracellular endo-1,4- $\beta$ -xylanase with specific activity of 566 U/mg protein, purified from *Aspergillus japonicus* MU-2 grown on oat spelt xylan. However, about half the activity of the one showed here (288.7 U/mg protein) was reported for an endo-xylanase isolated from *Aspergillus ficuum* AF-98 on SSF of wheat bran and bagasse (Lu et al., 2008). On the other hand, using *Aspergillus carneus* M34 a xylanase obtained by SmF supplemented with oats spelt xylan showed 245.9 U/mg protein (Fang et al., 2008). In addition, Yang et al. (2010) purified and characterized an extracellular xylanase from *A. niger* C3486 grown under SmF showing activity of 123.4 U/mg protein. In relation to *Aspergillus* recombinant xylanases, one of the first reports for heterologous expression of fungal xylanase genes was done by Luttig et al. (1997), who successfully cloned *xyn4* and *xyn5* genes from *A. niger* ATCC 90196 in *Saccharomyces cerevisiae*. Moreover, high activity (3,330 U/mg protein) was achieved by heterologous expression of the xylanase gene from *A. niger* F19 in *Pichia pastoris* using SmF growth (Chen et al., 2010). Yi et al. (2010) reported a heterologous expression of a XYNA1 and XYNB in *E. coli* BL21 showing specific activities of 16.58 and 1201.7 U/mg protein, respectively. An endo-xylanase gene from *Aspergillus usarii* E001 was expressed in *E. coli* BL21 and the purified enzyme showed only 49.6 U/mg protein (Zhou et al., 2008). The use of a protease-negative strain of *A. niger* BRFM281 allowed *xynB* gene expression by SmF, obtaining 691 U/mg protein (Levasseur et al., 2005), which is about 1.3 times more active than the one reported here.

### Effect of temperature and pH on recombinant endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase activity

The optimum temperature for activity by our purified endo-xylanase was 50°C, while at 40 and 60°C, the enzyme exhibited 56.2 and 55.3% relative activity, respectively (Figure 3a). Optimum pH of purified endo-xylanase was 5.5 (Figure 3b). A relative activity of 49.7 and 21.6% was observed for pH values 5.0 and 7.1, respectively. These results are within the range of optimal temperature (40 to 70°C) and pH (4.0 to 6.0) of previously reported *Aspergillus* spp. endo-xylanases (Dhiman et al., 2008; Polizeli et al., 2011). Endo-xylanases produced by *A. niger*, *A. niveus*, and *A. ochraceus*, using SSF, wheat bran and corn cob as substrates showed same optimal temperature of 55°C, while optimum pH values were 6.0, 5.0 and 5.5, respectively (Betini et al., 2009). A recombinant xylanase reported by Li et al. (2010) showed similar values of optimal activity which were 50°C and pH 5.0.

A recombinant XynB showed an optimal activity at 50°C decreasing rapidly to 25% initial activity at 70°C. The pH of optimal activity of this recombinant protein was 5.5 and only 25% of the maximum was reached at pH below 3.5 and above 7.5 (Levasseur et al., 2005). This behavior is comparable to our recombinant endo-xylanase. A similar profile was observed for *A. niger* BRFM281 recombinant endo-xylanase expressed in *E. coli*. Optimal activity was found at pH 4.6, with 50% activity retention in the pH range 4.2 to 5.3, while optimal temperature at pH 4.6 was 50°C (Zhou et al., 2008).



We conclude that the expression system employed here, using PF as inert support, is a suitable alternative for production of homologous endo-xylanase by SSF, under conditions of selective expression of a single xylanase. This system provided higher enzyme yield, lower risk of contamination and an ecologically friendly process when compared with SmF system. This approach could be used to express individual proteins from gene families which are coordinately regulated. However, other biotechnological aspects such as optimization of bioreactor design and heat and mass transfer should be developed to make SSF a feasible technology to obtain value added products at commercial scale.

## ACKNOWLEDGEMENT

Thanks are given to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) for PhD fellowship to AAR.

## REFERENCES

- Antoine AA, Jacqueline D, Thonart P (2010). Xylanase production by *Penicillium canescens* on soya oil cake in solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160(1): 50-62.
- Ausubel FM, Brent RE, Kingston R, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (2002). Short protocols in molecular biology. Wiley, USA, pp. 2-10, 10-38, 10-39.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004). Improved prediction of signal peptides: signalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340(4): 783-795.
- Betini JHA, Michelin M, Peixoto-Nogueira SC, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MLTM (2009). Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32(6): 819-824.
- te Biesebeke R, Ruijter G, Rahardjo YSP, Hoogschagen MJ, Heerikhuisen M, Levin A, van Driel KGA, Schutyser MAI, Dijksterhuis J, Zhu Y, Weber FJ, de Vos WM, van den Hondel KAMJJ, Rinzema A, Punt PJ (2002). *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations. Progress report on a multi-disciplinary project. *FEMS Yeast Res.* 2(2): 245-248.
- te Biesebeke R, Record E, van Biezen N, Heerikhuisen M, Franken A, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ (2005). Branching mutants of *Aspergillus oryzae* with improved amylase and protease production on solid substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69(1): 44-50.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1-2): 248-254.
- de Castro AM, Carvalho DF, Freire DMG, dos Reis Castilho L (2010). Economic analysis of the production of amylases and other hydrolases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babassu cake. *Enzyme Res.* 2010: 1-9. Article ID 576872.
- Chen X, Xu S, Zhu M, Cui L, Zhu H, Liang Y, Zhang Z (2010). Site-directed mutagenesis of an *Aspergillus niger* xylanase B and its expression, purification and enzymatic characterization in *Pichia pastoris*. *Process Biochem.* 45(1): 75-80.
- Dhiman SS, Sharma J, Battana B (2008). Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. *BioResources*, 3(4): 1377-1402.
- Díaz-Godínez G, Soriano-Santos J, Augur C, Viniegra-González G (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26(5): 271-275.
- Fang HY, Chang SM, Lan CH, Fang TJ (2008). Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. *Process Biochem.* 43(1): 49-55.
- Gamarra NN, Villena GK, Gutiérrez-Correa M (2010). Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(2): 545-551.
- Gasser B, Mattanovich D (2007). Review. Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale? *Biotechnol. Lett.* 29(2): 201-212.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In Walkered JM (ed) *The Proteomics Protocols Handbook*, protein identification and analysis tools on the ExPASy server, Humana, New Jersey, pp. 571-607.
- Gautam P, Sabu A, Pandey A, Szakacs G, Soccol CR (2002). Microbial production of extra-cellular phytase using polystyrene as inert solid support. *Bioresour. Technol.* 83(3): 229-233.
- van Hartingsveldt W, Mattern IE, van Zeijl CMJ, Pouwels PH, van den Hondel CAMJJ (1987). Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *Mol. Gen. Genet.* 206(1): 71-75.
- Ishida H, Hata YY, Kawato A, Abe Y (2006). Improvement of the *glab* promoter expressed in solid-state fermentation (SSF) of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(5): 1181-1187.
- Kainz E, Gallmetzer A, Hatzl C, Nett JH, Li H, Schinko T, Pachlinger R, Berger H, Reyes-Dominguez Y, Bernreiter A, Gerngross T, Wildt S, Strauss J (2008). N-Glycan modification in *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(4): 1076-1086.
- Kapilan R, Arasaratnam V (2011). Paddy husk as support for solid state fermentation to produce xylanase from *Bacillus pumilus*. *Rice Sci.* 18(1) available online <http://www.ricescience.org/qikan/manage/wenzhang/2010042.pdf>
- Krisana A, Rutchadaporn S, Jarupan G, Lily E, Sutipa T, Kanyawim K (2005). Endo-1, 4-β-xylanase B from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 isolated in Thailand: purification, characterization and gene isolation. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38(1): 17-23.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Levasseur A, Asther M, Record E (2005). Overproduction and characterization of xylanase B from *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.* 51(2): 177-183.
- Li Y, Zhang B, Chen X, Chen Y, Cao Y (2010). Improvement of *Aspergillus sulphureus* endo-β-1,4-xylanase expression in *Pichia pastoris* by codon optimization and analysis of the enzymic characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160(5): 1321-1331.
- Lu F, Lu M, Lu Z, Bie X, Zhao H, Wang Y (2008). Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresour. Technol.* 99(13): 5938-5941.
- Lu X, Sun J, Nimtz M, Wissing J, Zeng AP, Rinas U (2010). The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microb. Cell Fact.* 9(23): 1-13.
- Luttig M, Pretorius IS, van Zyl WH (1997). Cloning of two β-xylanase-encoding genes from *Aspergillus niger* and their expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 19(5): 411-415.
- McKelvey SM, Murphy RA (2010). Analysis of wide-domain transcriptional regulation in solid-state cultures of *Aspergillus oryzae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37(5): 455-469.
- Miller GL (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3): 426-428.
- Montiel-González AM, Viniegra-González G, Fernández FJ, Loera O (2004). Effect of water activity on invertase production by improved diploids strains of *Aspergillus niger*. *Process Biochem.* 39(12): 2085-2090.
- Mullai P, Fathima NSA, Rene ER (2010). Statistical analysis of main and interaction effects to optimize xylanase production under submerged cultivation conditions. *J. Agric. Sci.* 2(1): 144-153.
- Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O, Iwashita K (2006). Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(5): 3448-3457.
- Pachlinger R, Mitterbauer R, Adam G, Strauss J (2005). Metabolically independent and accurately adjustable *Aspergillus sp.* expression

- system. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2): 672-678.
- Park I, Cho J (2010). Partial characterization of extracellular xylanolytic activity derived from *Paenibacillus* sp. KIJ1. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4(12): 1257-1264.
- Palaniswamy M, Pradeep BV, Sathya R, Angayarkanni J (2008). Isolation, identification and screening of potential xylanolytic enzyme from litter degrading fungi. *Afr. J. Biotechnol.* 7(11): 1978-1982.
- Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albang R, Albermann K, Andersen MR, Bendtsen JD, Benen JAE, van den Berg M, Breestraat S, Caddick MX, Contreras, R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EGJ, Debets AJM, Dekker P, van Dijk PWM, van Dijk A, Dijkhuizen L, Driessen AJM, d'Enfert C, Geysens S, Goosen C, Groot GSP, de Groot PWJ, Guillemette T, Henrissat B, Herweijer M, van den Hombergh JPTW, van den Hondel CAMJ, van der Heijden RTJM, van der Kaaij, RM, Klis FM, Kools HJ, Kubicek CP, van Kuyk PA, Lauber J, Lu X, van der Maarel MJEC, Meulenber R, Menke H, Mortimer MA, Nielsen J, Oliver SG, Olsthoorn M, Pal K, van Peij NNME, Ram AFJ, Rinas U, Roubos JA, Sags CMJ, Schmoll M, Sun J, Ussery D, Varga J, Vervecken W, van de Vondervoort PJJ, Wedler H, Wosten HAB, Zeng AP, van Ooyen AJJ, Visser J, Stam H (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.* 25(2): 221-231.
- Polizeli MLTM, Corrêa ECP, Polizeli AM, Jorge JA (2011). Hydrolases from microorganisms used for degradation of plant cell wall and bioenergy. In: Buckeridge MS, Goldman GH (Eds.). *Routes to Cellulosic Ethanol*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Rana NK, Bhat TK (2005). Effect of fermentation system on the production and properties oftannase of *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51(4): 203-212.
- Sánchez O, Aguirre J (1996). Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genet. Newslett.* 43: 48-51.
- Sarao L, Arora M, Sehgal VK, Bhatia S (2010). Production of protease by submerged fermentation using *Rhizopus microsporus* var *oligosporus*. *Internet J. Microbiol.* 9(1): 1-10.
- Talabardon M, Yang ST (2007). Production of GFP and glucoamylase by recombinant *Aspergillus niger*: effects of fermentation conditions on fungal morphology and protein secretion. *Biotechnol. Prog.* 21(5): 1389-1400.
- Wakiyama M, Yoshihara K, Hayashi S, Ohta K (2010). An extracellular endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Aspergillus japonicus*: purification, properties, and characterization of the encoding gene. *J. Biosci. Bioeng.* 109(3): 227-229.
- Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M (2005). Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnol. Adv.* 23(2): 115-129.
- Yang Y, Zhang W, Huang J, Lin L, Lian H, Lu Y, Wu J, Wang S (2010). Purification and characterization of an extracellular xylanase from *Aspergillus niger* C3486. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4(21): 2249-2256.
- Yi X, Shi Y, Xu H, Li W, Xie J, Yu R, Zhu J, Cao Y, Qiao D (2010). Hyperexpression of two *Aspergillus niger* xylanase genes in *Escherichia coli* and characterization of the gene products. *Braz. J. Microbiol.* 41(3): 778-786.
- Zhou C, Bai J, Deng S, Wang J, Zhu J, Wu M, Wang W (2008). Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usamii* and its expression in *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.* 99(4): 831-838.

## VI. Conclusiones generales

La producción de enzimas xilanolíticas parcial o totalmente purificadas y los productos derivados de la acción xilanolítica son bienes que pueden tener beneficios económicos a la sociedad. Como se discutió en el presente trabajo, el uso de herramientas de biología molecular nos brinda oportunidades para crear, modificar, sustituir o eliminar procesos de gran impacto en diversas industrias y demás áreas productivas.

En este trabajo se obtuvo con éxito una xilosidasa libre de hemicelulasas que mostró actividad significativa a temperaturas altas, medio ácido y en presencia de agentes reductores, y por lo tanto es probable que tenga un buen potencial en la alimentación animal, la síntesis enzimática, y la industria de los jugos de fruta.

El uso de espuma de poliuretano como soporte inerte es una alternativa para la producción homóloga de una endo-xilanasas por medio de fermentación en estado sólido, en condiciones de expresión selectiva. Este sistema proporciona mayor rendimiento de la enzima, menor riesgo de contaminación y un proceso ecológico en comparación con el sistema de fermentación sumergida.

Se estimó una productividad de  $17.1 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para la fermentación en estado sólido y  $3.2 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para la fermentación sumergida calculada en el valor máximo de los títulos de xilanasas. La xilanasas recombinante obtenida por fermentación en estado sólido con fibra de poliuretano fue purificada 5.1 veces con una recuperación de 35.7%, mostró un peso molecular de 30 kDa, y actividad óptima de  $522 \text{ U mg de proteína}^{-1}$  a pH 5.5 y  $50^\circ\text{C}$ .

Santiago de Querétaro, 21 de Febrero de 2011

**H. CONSEJO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
PRESENTE**

Por este conducto me permito solicitar a este Consejo su aprobación para iniciar el proceso de titulación del estudiante de Doctorado en Ciencia de los Alimentos **M.C. Aldo Amaro Reyes**, con No. de Expediente **165388**. Esto en base a la publicación de dos artículos en revistas indexadas, que a continuación se describen:

**Amaro-Reyes, A.**, García-Almendárez, B.E., Vázquez-Mandujano, D.G., Amaya-Llano, S., Castaño-Tostado, E., Guevara-González, R.G., Loera, O, Regalado, C. 2011. Homologue expression of a  $\beta$ -xylosidase from native *Aspergillus niger*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. DOI 10.1007/s10295-010-0912-5. ISSN 1367-5435.

**Amaro-Reyes, A.**, García-Almendárez, B.E., Vázquez-Mandujano, D.G., Amaya-Llano, S., Castaño-Tostado, E., Guevara-González, R.G., Loera, O, Regalado, C. 2011. Homologue expresión of a fangal endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase using submerged and solid substrate fermentations. African Journal of Biotechnology. ISSN: 1684-5315.

Dichos artículos respaldan el tema de su tesis doctoral.

Sin otro particular, quedo de ustedes.

Atentamente,



Dr. Carlos Regalado González  
Director de tesis